

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN CARDIOCHIRURGIA

CICLO XX: TISSUE ENGINEERING NELLE VALVOLE CARDIACHE

BIOLOGICHE

**“CONCETTI BASE DI INGEGNERIA TISSUTALE NELLE VALVOLE
CARDIACHE E VALUTAZIONE DI STRUTTURE CARDIOVASCOLARI
UMANE ADULTE COME POTENZIALE FONTE CELLULARE”**

Coordinatore: **Prof. Tiziano Gherli**

Dottorando: **Dott. Andrea Agostinelli**

INDICE

1 INTRODUZIONE.....	3
1.1 Struttura anatomica e funzionalità delle valvole cardiache native.....	7
1.2 Concetti base dell'ingegneria tissutale nelle valvole cardiache.....	12
1.3 Gli Scaffold.....	15
<u>Scaffold sintetici biodegradabili.....</u>	<u>15</u>
<u>Scaffold biologici.....</u>	<u>16</u>
<u>Gel naturali di collagene o fibrina.....</u>	<u>18</u>
1.4 Le cellule utilizzate in ingegneria tissutale.....	23
2 VALUTAZIONE DI STRUTTURE CARDIOVASCOLARI UMANE ADULTE COME POTENZIALE FONTE CELLULARE.....	26
2.1 Background e obiettivi.....	26
2.2 Materiali e metodi.....	28
<u>Trattamento dei campioni.....</u>	<u>29</u>
<u>Immunoistochimica.....</u>	<u>29</u>
<u>Analisi ultrastrutturale.....</u>	<u>30</u>
2.3 Risultati.....	31
<u>Microscopia ottica.....</u>	<u>31</u>
<u>Analisi ultrastrutturale.....</u>	<u>32</u>
2.4 Discussione.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	39

1. INTRODUZIONE

Al giorno d'oggi le malattie valvolari cardiache costituiscono una importante causa di mortalità e morbilità in tutto il mondo. Solo negli Stati Uniti ogni anno, muoiono circa 20000 persone per disfunzione valvolare e circa 60000 vengono sottoposte ad intervento di sostituzione valvolare (1). Attualmente, i sostituti valvolari a disposizione per pazienti con indicazione ad intervento chirurgico sono le valvole meccaniche, le valvole biologiche (valvole aortiche porcine o xenograft in pericardio bovino fissate in glutaraldeide), gli Homograft da cadavere criopreservati, o gli autograft polmonari. Tutti questi sostituti, nonostante si siano dimostrati efficaci nel migliorare la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti sottoposti all'intervento chirurgico, presentano delle specifiche limitazioni (2): le valvole meccaniche richiedono la scoagulazione completa del sangue e comportano rischi trombo-emorragici non trascurabili; di contro, le valvole biologiche, così come gli homograft e gli autograft, vanno incontro a degenerazione strutturale che ne comporta una durabilità limitata nel tempo, per non menzionare i problemi di ridotta disponibilità ed applicabilità degli homograft (3,4,5).

L'ingegneria tissutale ha conosciuto un enorme sviluppo nel campo delle patologie cardiovascolari in questi ultimi anni, rivolgendo le sue attenzioni dapprima a vasi sanguigni (6,7,8,9,10,11), quindi al miocardio (12,13,14,15,16) ed alle valvole cardiache (17, 18, 19,20). I potenziali vantaggi di una valvola cardiaca di ingegneria tissutale sarebbero molteplici, ed includerebbero la non trombogenicità, la ridotta suscettibilità alle infezioni, e, non ultima la vitalità cellulare intesa come capacità di riparare gli eventuali insulti, rimodellarsi ed adattarsi alle varie condizioni fisiopatologiche e, potenzialmente di crescere con l'individuo ospite. Capacità queste

ultime, che risultano particolarmente interessanti ai fini di una futura applicazione clinica in pazienti pediatriche, nei quali i risultati delle varie opzioni chirurgiche attualmente a disposizione sono nettamente inferiori a quelli ottenuti nella popolazione adulta (21,22). Infatti una protesi valvolare con potenzialità rigenerative e di crescita consentirebbe di superare definitivamente il tallone di Achille della chirurgia valvolare in età pediatrica, costituito dalla necessità di sottoporre i pazienti a numerosi reinterventi nel tempo. Attualmente questi requisiti sono posseduti solo dagli Autograft polmonari che vengono reimpiantati in posizione aortica durante la Ross Procedure (23); tuttavia questa tecnica chirurgica è più indagosa, indicata solo in numero ristretto di pazienti e mantiene problemi irrisolti quali quello dell'individuazione di un sostituto ideale da montare in posizione polmonare. Nella tabella 1 vengono elencate e messe a confronto le principali caratteristiche delle valvole di ingegneria tissutale e dei sostituti valvolari attualmente a disposizione.

TABELLA 1. *Principali caratteristiche delle valvole di ingegneria tissutale e delle protesi convenzionali*

	Protesi Convenzionali	Valvole di ingegneria tissutale
Tecnica di impianto	A volte complessa (Ross Operation)	Semplice e definitiva
Trombogenicità	Sì, specialmente le protesi meccaniche	No; la superficie endoteliale inibisce la trombogenesi spontanea
Degenerazione strutturale	Sì, nelle valvole biologiche e negli Homograft	Resistenza alla calcificazione ed alla degenerazione
Suscettibilità Infezione	Sempre presente	Resistenti alle infezioni
Vitalità	No	Sì, potenzialità di riparazione del danno, di rimodellamento e crescita

L'obiettivo che si delinea all'orizzonte delle tecniche di ingegneria tissutale nella costituzione di una protesi valvolare cardiaca, appare dunque molto ambizioso e carico di sfide.

Infatti le valvole cardiache native sono strutture uniche , vitali e dinamiche costituite da cellule specializzate e matrice extracellulare (MEC), in grado di reagire e rimodellarsi in base alle condizioni ed agli stress meccanici cui sono sottoposte (24,25). Circa 40 milioni di volte l'anno la continua e ripetitiva apertura e chiusura delle cuspidi induce cambiamenti di forma, dimensioni e stress meccanici sulle cuspidi stesse e sulle altre strutture valvolari (Figura 1) (26).

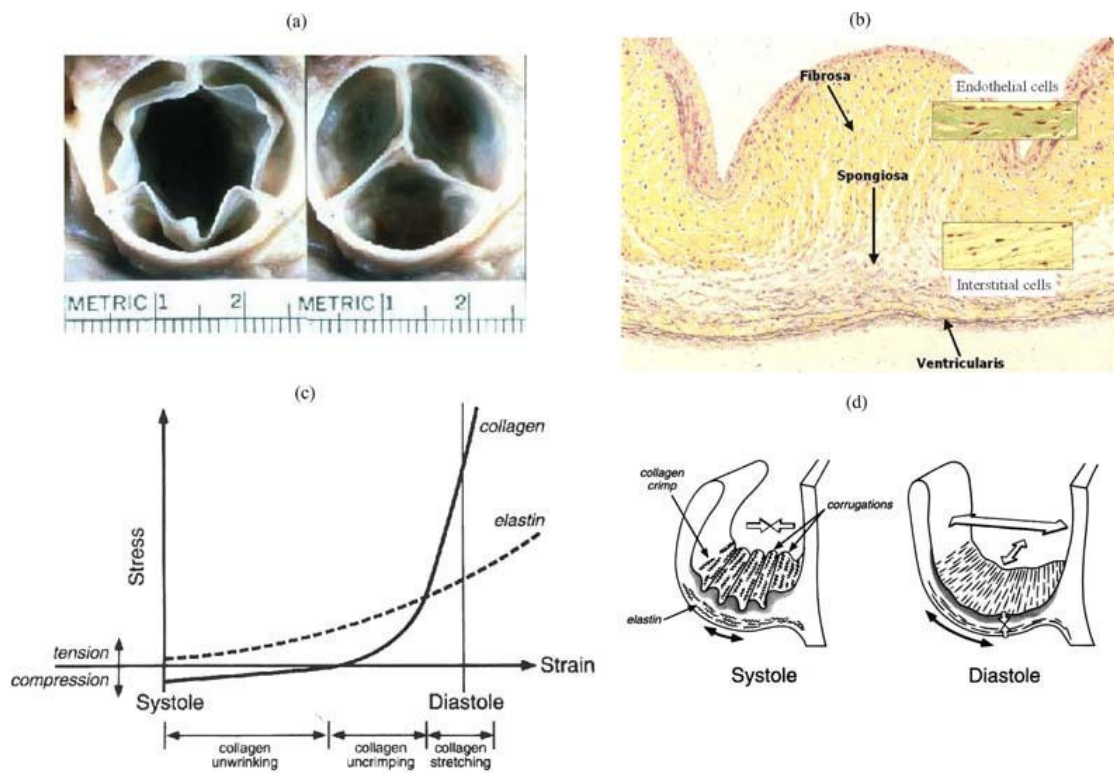


Figura 1. (a) Visione della valvola aortica in apertura ed in chiusura. (b) Sezione istologica di cuspidi aortica con tipica organizzazione trilaminare (c) Interazioni biomeccaniche tra elastina e collagene durante il ciclo cardiaco (d) Rappresentazione schematica della disposizione delle fibre collagene della fibrosa e delle fibre elastiche della ventricolare in sistole ed in diastole. Modificato da "Valvular heart disease: General principles and stenosis," IN: *Cardiovascular Pathology, 3rd Ed*, Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ (eds.), WB Saunders 2001, pp. 402–442 e da Schoen FJ. *Aortic valve structure-function correlations: Role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. J Heart Valve Dis* 6: 1–6, 1997.

Risulta evidente che una valvola di ingegneria tissutale deve saper riprodurre queste caratteristiche in maniera duratura nel tempo.

L'esatta comprensione dei principi base dell'ingegneria tissutale non può pertanto prescindere da una accurata comprensione della struttura e del funzionamento delle valvole native.

1.1 Struttura anatomica e funzionalità delle valvole cardiache native

Come descritto in precedenza le valvole cardiache umane sono strutture funzionali dinamiche che garantiscono l'unidirezionalità del flusso ematico e che posseggono delle caratteristiche uniche: la vitalità, una consistenza e resistenza tali da permettere loro di supportare degli stress meccanici ripetitivi, la capacità di adattarsi alle varie condizioni fisiopatologiche e di riparare gli eventuali danni mediante il rimodellamento del tessuto connettivo.

Le valvole tricuspidi semilunari sono costituite, oltre che dalle cuspidi, anche da un insieme di strutture che, interagendo fra di loro, vengono a costituire delle vere e proprie unità anatomo-funzionali: le radici aortiche e polmonari. Anche le valvole atri-ventricolari sono complesse unità anatomo-funzionali costituite, oltre che dai lembi e dagli anelli valvolari, dagli apparati sottovalvolari (corde tendinee e muscoli papillari), e dalle pareti ventricolari ed atriali.

Lembli e cuspidi valvolari non sono dotati di vasi sanguigni, fatta eccezione per alcune piccole porzioni adiacenti al miocardio; il nutrimento necessario perviene alle cellule per diffusione dal flusso ematico attraverso la parete stessa delle cuspidi e dei lembli che risulta sufficientemente sottile.

Le 4 valvole cardiache hanno una microstruttura molto simile e pertanto descriveremo la valvola aortica che ben riassume le caratteristiche ultrastrutturali e cellulari necessarie al funzionamento di tutte le valvole.

Come tutte le valvole, la valvola aortica è composta principalmente da collagene, elastina e glicosaminoglicani (GAG). Questi elementi vanno a costituire i 3 principali strati delle cuspidi valvolari: la ventricolare, contigua alla superficie ventricolare di afflusso del sangue e ricca di elastina; la fibrosa o arteriosa, contigua alla superficie aortica di efflusso e principalmente costituita da fibre collagene; la spongiosa, posta nel mezzo e ricca di glicosaminoglicani. Collagene, elastina e GAG costituiscono la matrice extracellulare (MEC). Secondo gli studi di Schoen condotti su valvole sane e patologiche, la MEC è un componente fondamentale ai fini della qualità e della durabilità di una valvola; a sua volta quantità e qualità della MEC dipendono dalle cellule interstiziali valvolari (CIV) (27). Le continue interazioni tra la matrice extracellulare e le cellule sono regolate dagli stimoli meccanici pressori cui le cuspidi sono sottoposte (28). Infatti, durante il ciclo cardiaco, le cuspidi sono sottoposte a continue sollecitazioni meccaniche, come l'estensione e la flessione durante l'apertura e la chiusura della valvola, le forze colonnari esercitate dal flusso ematico, e la tensione esercitata sulle cuspidi durante la chiusura delle valvole. Questi stimoli esercitati a livello macroscopico determinano delle risposte biomeccaniche, degli adattamenti a livello tissutale i quali si traducono a livello cellulare determinando una modificazione della trascrizione genica che induce, ad esempio, l'incremento di sintesi di catene alfa dell'actina e l'incremento della sintesi di matrice extracellulare stessa, l'aumento di rigidità della cellula ecc.

Come illustrato in figura 1, il collagene della fibrosa, detta anche fibrosa corrugata, è disposto in maniera circonferenziale, parallela al margine libero delle cuspidi, ed essendo

non elastico si adatta alle continue flessione-estensioni della cuspidi ora compattandosi ed increpandosi (sistole), ora dispiegandosi al minimo stimolo pressorio, fino dispiegarsi del tutto per supportare l'imponente pressione della colonna ematica durante la diastole. Al contrario le fibre di elastina della ventricolare, disposte in maniera radiale, si allungano e si contraggono rispettivamente durante sistole e diastole, sfruttando le loro qualità elastiche (25). La spongiosa presumibilmente, grazie ai glicosaminoglicani, svolge un ruolo protettivo assorbendo gli urti pressori.

La componente cellulare delle valvole cardiaca è rappresentata da 2 tipi cellulari: le cellule endoteliali (CEV) disposte sulla superficie delle cuspidi e dei lembi, e le cellule interstiziali all'interno, che presentano caratteristiche e proprietà variabili di cellule muscolari lisce, fibroblasti e miofibroblasti (29,30,31). Come tutte le altre cellule endoteliali, quelle valvolari assicurano la non trombogenicità della superficie valvolare e regolano la risposta immunitaria ed infiammatoria. Tuttavia le cellule endoteliali valvolari sembrano avere un orientamento diverso rispetto a quelle vascolari: infatti mentre queste ultime si allineano parallele al flusso ematico, le prime si allineano perpendicolari allo stesso. Secondo Deck (32) questo comportamento è dovuto al fatto che le cellule endoteliali si orientano sempre secondo il maggior stress meccanico e che quest'ultimo sia parallelo al flusso ematico nei vasi, ma ortogonale allo stesso sulle cuspidi valvolari. Secondo altri autori questo diverso comportamento sarebbe dovuto ad una diversità dei 2 fenotipi cellulari (33,34). Infatti cellule endoteliali valvolari e vascolari, così come quelle ventricolari e quelle della fibrosa, presenterebbero delle differenze nell'espressione genica (35). Se ciò fosse vero avrebbe delle importanti ripercussioni sull'ingegneria tissutale di valvole cardiache; infatti la scelta di una fonte cellulare autologa con cui seminare le neopotesi non potrebbe prescindere da questa osservazione.

Le cellule interstiziali sono in grado di sintetizzare la matrice extracellulare e di provvedere al suo rimodellamento grazie alla sintesi di enzimi litici come le metalloproteinasi e i loro inibitori (29,31).

Inoltre le cellule interstiziali sono una popolazione dinamica, in grado cioè di esprimersi in un'ampia gamma di fenotipi, che spaziano dai fibroblasti ai miofibroblasti, a seconda degli stimoli ambientali cui sono sottoposte(29,30,31,24). Infatti alcuni autori hanno evidenziato come in valvole cardiache umane adulte sane, le cellule interstiziali abbiano un fenotipo fibroblastico caratterizzato dalla presenza di vimentina, bassissimi livelli di catene α di actina muscolare liscia (α -SMA), metalloproteinasi MMP-13 e altri markers tipici; inoltre sembrano essere quiescenti. Solo il 2-5% delle cellule interstiziali adulte esprime quantità significative di catene α di actina, che è un marker miofibroblastico (29,24,36,37). I miofibroblasti sono fibroblasti attivati in grado di mediare il rimodellamento della matrice extracellulare giocando un ruolo fondamentale nei processi fisiopatologici e nelle capacità di adattamento, rimodellamento e riparazione del tessuto. Al contrario, altri studi hanno dimostrato come, la concentrazione di miofibroblasti (α -SMA positive), salga al 56-78% dopo coltura in vitro di cellule isolate da valvole adulte; questo dimostrerebbe che la semplice rimozione delle cellule dal loro ambiente naturale o la loro manipolazione, determinerebbe la loro attivazione e trasformazione in fenotipo miofibroblastico..

Inoltre, anche il trattamento con Trasforming Grow Factor β è in grado di attivare le cellule interstiziali e indurle ad esprimere il fenotipo miofibroblastico (38).

In conclusione si può asserire che gli stimoli biochimici e biomeccanici del contesto ambientale in cui sono inserite le cellule, concorrono sinergicamente ad attivare le cellule interstiziali stesse. Alcuni studi in vitro hanno dimostrato che la stimolazione meccanica e quella citochinica (TGF- β 1) sono in grado di modificare lo stato contrattile

e biosintetico delle cellule interstiziali in maniera maggiore quando agiscono sinergicamente rispetto a quando agiscono singolarmente. La necessità di un adeguato contesto in cui si possa esercitare una stimolazione meccanica e biochimica appropriata per poter mantenere lo stato di attività delle cellule interstiziali valvolari, è di particolare importanza ai fini dell'ingegneria tissutale. Infatti, un metodo che si prefigga di costituire un sostituto valvolare vitale non potrà prescindere dal ricreare un ambiente simile.

Informazioni preziosissime per l'ingegneria tissutale potranno anche derivare dalla comprensione dei meccanismi biologici e fisiologici che regolano lo sviluppo delle valvole cardiache adulte.

Il cuore si sviluppa dal foglietto embrionale mesodermico. L'indirizzo differenziativo delle cellule progenitrici mesodermiche verso una linea cellulare miocardica specializzata, dipende da una serie complessa di stimolazioni.

Durante lo sviluppo cardiaco, le cuspidi ed i lembi valvolari originano come escrescenze (cuscinetti endocardici) dal connettivo mesodermico: il mesenchima (39).

Le cellule endoteliali della superficie interna dei cuscinetti endocardici, subiscono una differenziazione fenotipica da epiteliali a mesenchimali e migrano negli strati più interni per dar luogo ai precursori delle cellule interstiziali valvolari. Questa trasformazione implica una serie di complesse interazioni intercellulari e tra matrice extracellulare e cellule, in grado di conferire alle cellule epiteliali la capacità di abbandonare lo strati superficiali, migrare all'interno della matrice extracellulare e sintetizzare la matrice stessa. La differenziazione delle cellule è testimoniata dall'espressione di catene α di actina che normalmente le cellule endoteliali non esprimono. Complessi segnali biochimici e fattori di crescita come il Vascular Endothelial Growth Factor, regolano lo sviluppo delle cuspidi valvolare adulte (40,41,42,43).

Studiando i processi evolutivi delle valvole semilunari nel feto, si è visto che queste ovviamente sono strutture molto dinamiche ed adattabili, e che contengono cellule interstiziali attivate in grado di rimodellare continuamente la matrice extracellulare. Queste cellule esprimono markers tipici del fenotipo miofibroblastico. Nella valvola post-natale queste cellule diventano quiescenti, testimoniando l'adattamento al cambiamento dell'ambiente circostante che, nella fase post-natale, fornisce probabilmente stimolazioni in prevalenza biomeccaniche (emodinamiche). Inoltre durante tutta la vita adulta, la cellularità valvolare cala di circa il 90% (29).

Nelle valvole adulte in condizioni patologiche, le cellule interstiziali adulte sono in grado nuovamente di attivarsi ad uno stato miofibroblastico simile a quello caratteristico delle cellule interstiziali della vita fetale. Infatti alcuni studi hanno dimostrato che sia valvole mixomatose, quindi patologiche, sia autograft polmonari in posizione aortica di pazienti recentemente sottoposti ad intervento di Ross (44), sia valvole di ingegneria tissutale preconditionate in vitro, o appena impiantate in vivo, presentano cellule interstiziali miofibroblastiche attivate simili a quelle fetali.

Quindi le valvole adulte rispondono ai cambiamenti ambientali ed agli stimoli attraverso una attivazione fenotipica reversibile delle loro cellule interstiziali residenti, le quali giocano pertanto un ruolo fondamentale nei meccanismi di adattamento, riparazione e rimodellamento delle valvole stesse.

1.2 Concetti base dell'ingegneria tissutale nelle valvole cardiache

Sulla base di queste conoscenze e considerazioni, l'industria ha cercato di sviluppare le tecniche di ingegneria tissutale per creare un nuovo tipo di sostituto valvolare che possedesse le sopracitate caratteristiche e fosse il più possibile simile in struttura e funzione, alle valvole native.

Due sono i requisiti fondamentali di un simile manufatto:

1. la necessità di uno scheletro, una struttura di origine biologica che supporti la crescita cellulare e della matrice extracellulare necessarie alla formazione di una protesi valvolare: il cosiddetto “scaffold”
2. la necessità di individuare una linea cellulare adeguata che, in vitro o in vivo, sia in grado di ripopolare lo scaffold.

Forse il primo esempio di ingegneria tissutale nel campo delle valvole cardiache, risale al 1991 quando Grimm e coll.(45) riuscirono a far crescere cellule endoteliali su pericardio bovino fissato in glutaraldeide. Il pericardio era stato precedentemente trattato con acido L.glutamico per neutralizzare i residui tossici dei gruppi aldeidici.

Da allora sono andati delineandosi tre principali approcci nell'intento di realizzare valvole di ingegneria tissutale:

- Utilizzo di scaffold biologici, come xenograft porcini o homograft criopreservati, decellularizzati direttamente impiantati nell'ospite e ricellularizzati in vivo ad opera di cellule residenti o circolanti dell'ospite stesso.
- Utilizzo di scaffold biologici decellularizzati, seminati in vitro con componenti cellulari autologhe di diversa origine, preconditionate in un apposito bioreattore e solo successivamente impiantati nell'ospite.
- Utilizzo di scaffold biologici sintetici di natura biodegradabile, seminati in vitro con componenti cellulari autologhe di diversa origine, preconditionate in un apposito bioreattore e solo successivamente impiantati nell'ospite (Figura 2).

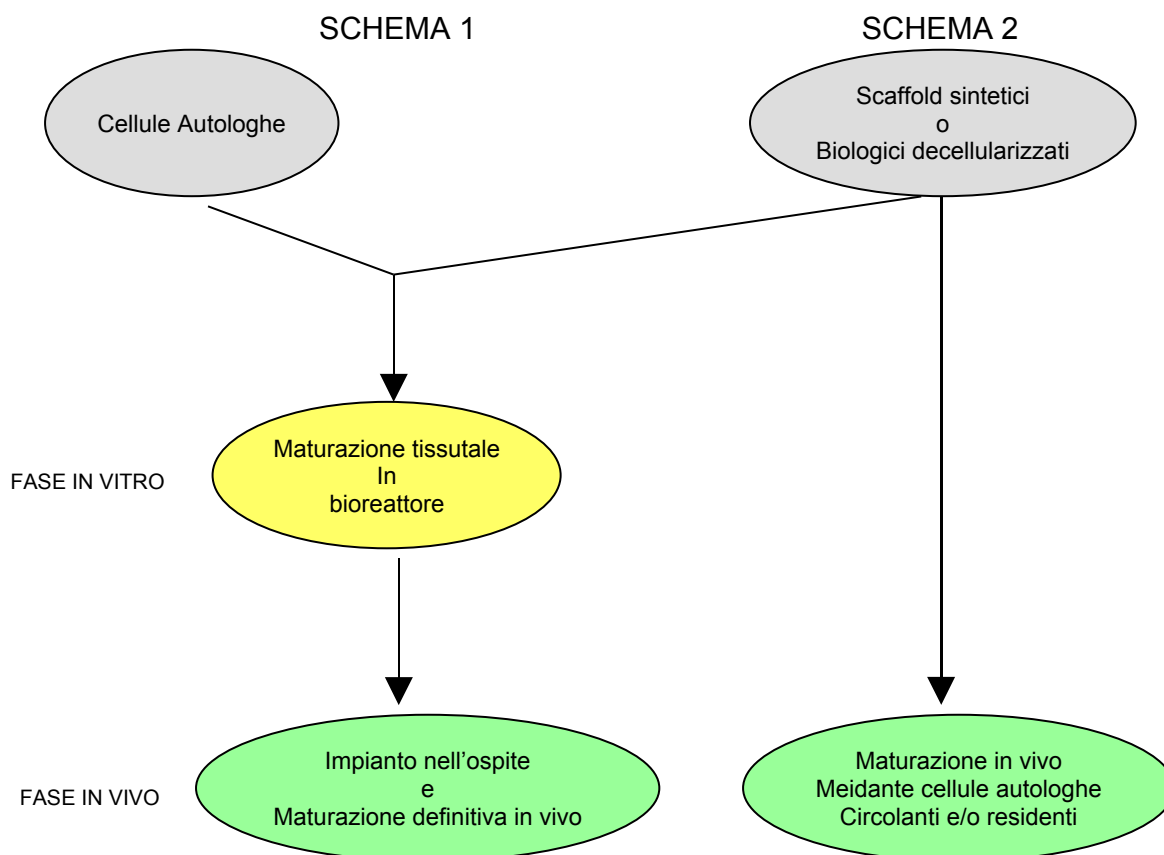


FIGURA 2. Schema 1: scaffold sintetici biodegradabili o scaffold biologici decellularizzati vengono seminati con cellule autologhe di varia origine. Successivamente la protesi subisce una fase di maturazione in vitro in appositi bioreattori che hanno il compito di creare un ambiente biometabolico e biomeccanico adeguato alla formazione ed organizzazione tissutale. Infine la protesi subisce una fase di rimodellamento finale in vivo successiva all’impianto nell’ospite. **Schema 2:** Scaffold biologici (xenograft o homograft criopreservati) opportunamente decellularizzati vengono direttamente impiantati in vivo nella convinzione che subiscano una colonizzazione cellulare ed una maturazione tissutale in vivo ad opera di un pool cellulare residente e/o circolante opportunamente mobilizzato ed attivato.

1.3 Gli scaffold

Gli scaffold possono essere suddivisi in:

1. scaffold sintetici biodegradabili
2. scaffold biologici come xenograft o homograft decellularizzati,
3. matrici extracellulari come gel di collagene o fibrina

Scaffold sintetici biodegradabili

Gli scaffold sintetici sono stati ideati per essere biocompatibili, riassorbibili in un breve periodo di tempo, e posseggono una struttura macroscopica altamente porosa per permettere la crescita cellulare, la deposizione ed il rimodellamento della matrice extracellulare e l'adeguata diffusione di sostanze nutritive. Essi devono fornire un substrato temporaneo per consentire l'impianto cellulare e la formazione definitiva del tessuto o dell'organo che si desidera riprodurre una volta che lo scaffold viene riassorbito. I primi successi ottenuti con questa metodica risalgono agli anni settanta quando si realizzarono i primi innesti epidermici di ingegneria tissutale. I primi scaffold utilizzati per la costituzione di valvole cardiache, sono stati realizzati con acido poliglicolico (PGA), acido polilattico (PLA) ed i loro copolimeri (46). Il PGA è un materiale idrofilico noto ed approvato per usi medici; infatti è il materiale utilizzato sin dagli anni settanta per costruire i primi fili chirurgici di sutura riassorbibili. I copolimeri di PGA, altamente idrofilico, con il PLA, più idrofobico, conferiscono una serie di proprietà meccaniche al materiale che lo rendono più duttile. Questi materiali, tuttavia, si sono dimostrati troppo rigidi e sono quindi stati introdotti materiali di nuova generazione come il polidrossialcanoato, più malleabili, in grado di dar luogo alla formazione di cuspidi valvolari di una consistenza e di uno spessore più vicini a quelli delle valvole native. In ultimo sono stati utilizzati anche substrati naturali come mucosa intestinale porcina (47), la cui applicazione clinica di maggior successo si ha in campo

urologico; questa matrice naturale impiantata in vivo, sembra promuovere una buona neovascolarizzazione e crescita tissutale sia nell'animale che nell'ospite umano, senza suscitare una eccessiva reazione infiammatoria. La capacità di promuovere un efficace rimodellamento tissutale in vivo ad opera dell'ospite, è stata attribuita all'informazione biologica naturalmente contenuta all'interno della matrice stessa, costituita essenzialmente da fattori di crescita (soprattutto VEGF e TGF- β), citochine e proteine della matrice extracellulare (48).

Nella maggior parte dei casi questi scaffold sono stati applicati in posizione polmonare, in quanto si presume che non siano in grado di supportare le sollecitazioni meccaniche della circolazione sistemica. Nel 2006 comunque Mol e collaboratori hanno analizzato da un punto di vista strutturale e meccanico una protesi costruita mediante impianto di cellule adulte di vena safena su scaffold sintetici (49). Lo scaffold era costituito da uno stent in Fastacryl e le cuspidi di PGA ricoperto con polidrossibutirato. Gli autori hanno concluso che una protesi così costituita, dopo un adeguato periodo di preconditionamento dinamico (presupposto fondamentale per lo sviluppo di tessuto sufficientemente organizzato), possiede caratteristiche tissutali e biomeccaniche tali da permettere una potenziale applicazione clinica in posizione aortica.

Scaffold biologici

Gli scaffold biologici sono costituiti da xenograft (ad esempio protesi porcine) o homograft prelevati da cadavere e criopreservati, opportunamente decelularizzati prima di essere impiantati. Il razionale che sta alla base di questo approccio, deriva dalla considerazione che il potere antigenico delle valvole xenogeniche sia da correlare alla presenza di residui cellulari. Infatti le protesi porcine devono essere fissate e neutralizzate in glutaraldeide prima di essere impiantate nell'uomo, mentre gli homograft non necessitano di alcuna neutralizzazione. Ovviamente

L'immunocompatibilità fra uomo e maiale è nettamente inferiore a quella interumana. Interessanti considerazioni nascono inoltre dall'osservazione che gli Homograft spesso non vengono crociati e ciononostante, la loro durata media in vivo non ne rimane scalfita, anche se secondo alcuni autori risulta essere lievemente superiore quando la compatibilità HLA viene testata (50). È stata comunemente accettata l'ipotesi che la posizione privilegiata della valvola aortica renda ragione di questo fenomeno. Infatti l'alto flusso della corrente ematica con cui la valvola viene a contatto, renderebbe difficoltoso l'attecchimento di monociti ed altre cellule del sistema immunitario. Partendo da questi presupposti si è pensato che uno xenograft, una volta decellularizzato, perdendo il suo potere antigenico, avrebbe potuto essere impiantato in ospiti umani senza causare significative reazioni immunitarie. Inoltre, una volta ripopolata da cellule autologhe, sia in vivo o in vitro, la matrice porcina diventerebbe addirittura invisibile al sistema immunitario ospite. La deposizione di nuova matrice extracellulare ed il suo rimodellamento in vivo, porterebbe infine ad una sostituzione della matrice porcina con una autologa.

L'approccio tipico utilizzato per la creazione di una matrice decellularizzata, consiste nel distruggere le membrane cellulari attraverso un meccanismo di lisi ottenuto in un ambiente iper- o ipo-tonico. Il passo successivo implica la rimozione dei detriti cellulari mediante l'utilizzo di appositi detergenti. Gli enzimi che si utilizzano con questi detergenti provvedono a degradare i frammenti di DNA cellulare, ma possono potenzialmente danneggiare anche la matrice extracellulare e, pertanto, alcuni autori hanno introdotto nella tecnica di decellularizzazione anche degli inibitori enzimatici quali gli inibitori della tripsina. Inoltre le sostanze utilizzate per l'estrazione cellulare potrebbero lasciare residui tossici in grado di alterare sia le proprietà meccaniche che cellulari della valvola. Pertanto le varie tecnologie utilizzate dai diversi laboratori per la

creazione dei graft decellularizzati, si differenziano soprattutto per le diverse sequenze, i diversi detergenti e i diversi tempi di estrazione utilizzati nella tecnica di decellularizzazione.

Inoltre importanti differenze sembrano risultare (come meglio spiegato in seguito) dalla natura del graft utilizzato nel processo di estrazione cellulare. Infatti, in letteratura, i risultati ottenuti con xenograft ripopolati in vivo, sembrano essere inferiori a quelli ottenuti quando la valvola impiantata è un homograft decellularizzato.

Gel naturali di collagene o fibrina

Infine, la nuova frontiera degli scaffold biologici naturali, sembra essere costituita dai gel naturali di fibrina o collagene. Quest'approccio si basa su una osservazione che risale ormai a parecchi anni orsono: alcune cellule, ad esempio fibroblasti, intrappolate all'interno di un gel di collagene, sono in grado di contrarsi e compattare il gel stesso aumentandone considerevolmente la densità e la consistenza (51,52,53). Del collagene fibrillare solubile, viene sospeso con le cellule in questione; una volta neutralizzato il composto, si crea un gel. Le cellule, intrappolate al suo interno, interagiscono con le fibrille di collagene e compattano la matrice escludendo l'acqua in un processo che ricorda quello della cicatrizzazione in vivo. Una volta sottoposto a pressione meccanica, il collagene si orienta lungo la direzione della pressione, e quindi si può costruire una struttura collagenosa altamente compatta.

Questa tecnica è stata applicata originariamente nel campo dell'ingegneria tissutale dei condotti vascolari (54).

Un cilindro viene inserito all'interno di una struttura tubolare cava creando una intercapedine che viene riempita dalla sospensione di cellule e collagene. Una volta gelificata, la struttura si compatta aderendo al cilindro interno che viene così rimosso. Non potendosi accorciare circonferenzialmente a causa della presenza del cilindro, il gel

si compatta trasversalmente, lungo il suo spessore e le fibre si dispongono in maniera circonferenziale come nell'avventizia dei vasi sanguigni.

Tranquillo e coll hanno adottato questa tecnica ideando una struttura, le cui superfici interna ed esterna creassero uno stampo a forma di tubo contenente una valvola bicuspide. Altri autori hanno sfruttato questa metodica per creare corde tendinee artificiali, utilizzando come linea cellulare cellule muscolari lisce aortiche, in quanto capaci di sintetizzare grandi quantità di matrice extracellulare ricca in elastina (55).

Una volta ottenuto lo scaffold, lo step successivo prevede la formazione di una struttura tissutale organizzata formata da una componente cellulare ed una extracellulare. Questa fase può essere realizzata con due approcci distinti: in vivo, impiantando la scaffold direttamente nell'ospite e sfruttando il potenziale delle cellule autologhe dello stesso per la generazione di un tessuto definitivo, oppure in vitro. In questo caso, un'adeguata popolazione cellulare viene scelta per essere inoculata nello scaffold. Il manufatto viene quindi sottoposto ad un condizionamento meccanico in appositi bioreattori che ne favoriscono la maturazione tissutale, ed, infine, impiantato in vivo dove affronta l'ultima fase di crescita e rimodellamento tissutale.

Se ripopolare o meno gli scaffold biologici prima di impiantarli in vivo, è una delle questioni ancora aperte. La tecnica di ripopolamento in vivo è stata utilizzata per lo più con protesi decellularizzate, siano esse xenograft o homograft, e si basa sul concetto che le cellule ospiti residenti e/o circolanti, possano provvedere alla colonizzazione dello scaffold, alla produzione di matrice extracellulare, e, in definitiva, alla organizzazione tissutale della valvola sino alla creazione di una struttura simile a quella delle valvole native. Un'osservazione scoraggiante riguardo questa convinzione, sembra però venire da uno studio condotto da Shoen e coll, secondo il quale, per sino gli homograft aortici criopreservati, una volta impiantati, non solo non vengono ripopolati dalle cellule

ospiti, ma addirittura sembrano perdere tutta la loro componente cellulare residua dopo alcuni mesi dal loro impianto (56.). Questa osservazione solleva importanti dubbi riguardo questa metodica, in quanto la valvola aortica umana dell'adulto sembra costituire il substrato ideale per il ripopolamento cellulare, fornendo in vivo le stimolazioni biomeccaniche più appropriate.

Uno degli indubbi vantaggi di questa metodica è la facile riproducibilità: infatti, consente di evitare tecniche di manipolazione cellulare, governate da leggi rigide ed intransigenti, garantendo ai manufatti un iter più agevole per l'ottenimento dell'approvazione all'utilizzo clinico di ampio spettro. Nel 2003 Simon riportò i risultati dell'applicazione clinica di valvole porcine decellularizzate (synergraft) montate in posizione polmonare di pazienti pediatrici (57). Nella sua esperienza emerse una mortalità precoce cardiaca valve-related considerevole. Un paziente, alla luce degli scoraggianti risultati preliminari, fu sottoposto a reintervento precoce per la comparsa immediata di insufficienza valvolare. All'analisi strutturale ed istologica, tutte le valvole escisse mostravano severa infiltrazione infiammatoria, fibrosi, incapsulamento, perforazione e deterioramento del tessuto delle cuspidi. La degenerazione precoce degli xenograft decellularizzati è da ricondursi al maggior potere antigenico delle proteine della loro matrice extracellulare, il quale costituisce un forte stimolo infiammatorio nell'ospite. Alcuni autori, tuttavia sottolineano come lo stesso metodo di decellularizzazione, possa essere applicato agli homograft invece che agli xenograft, ottenendo risultati nettamente superiori. Il gruppo di Lubeck, in Germania, ha dimostrato come la risposta immunitaria suscitata nell'ospite da homograft criopreservati precedentemente decellularizzati, sia inferiore a quella degli homograft convenzionali (58). Inoltre, secondo gli stessi autori, la performance emodinamica dei

due tipi di omoioesti risulterebbe assolutamente sovrapponibile ad un follow-up di 10 mesi (59).

Gli scoraggianti risultati iniziali ottenuti con le protesi porcine decellularizzate, hanno comunque spinto i ricercatori a sviluppare la tecnica di impianto cellulare in vitro degli scaffold biologici. Una volta impiantate le cellule sugli scaffold, questi vengono inseriti dapprima in un apposito bioreattore che ha le funzioni di riprodurre un'ambientazione biomeccanica e metabolica simile a quella delle valvole native; questo preconditionamento induce la formazione e l'organizzazione del tessuto valvolare; in seguito la protesi impiantata nel soggetto ospite, subirà un ulteriore processo in vivo di crescita tissutale e rimodellamento. Il bioreattore espone il tessuto in via di formazione ad un preconditionamento meccanico attraverso variazioni pressorie e flussi fluidi ciclici che riproducono le condizioni fisiologiche cui sono sottoposte le valvole cardiache in vivo. E' stato sviluppato anche un bioreattore che riproduce solo la fase diastolica del ciclo cardiaco chiamato ("diastolic pulse duplicator"). Ci sono chiare evidenze in letteratura che suggeriscono la superiorità in termini di ultrastruttura e proprietà meccaniche, di protesi preconditionate in un bioreattore rispetto a protesi coltivate staticamente. (49). La tecnica di inoculazione cellulare in vitro di scaffold, siano essi sintetici biodegradabili che naturali, è quella maggiormente studiata in questi ultimi anni e decisamente la più promettente. Sutherland e coll hanno impiantato in animali di grossa taglia, valvole polmonari ottenute inoculando in vitro cellule mesenchimali da midollo osseo su scaffold sintetici biodegradabili (60). Dopo 4 e 8 mesi, la performance emodinamica delle valvole era buona e l'analisi istologica effettuata dopo l'espanto mostrava una struttura trilaminare costituita da uno strato ventricolare ricco in elastina, uno strato esterno ricco in collagene e glicosamminoglicani nello strato intermedio, del tutto paragonabile alla struttura della

valvola polmonare nativa. Recentemente sono stati riportati in letteratura i risultati clinici a medio termine di una valvola polmonare di ingegneria tissutale montata in 23 pazienti adulti sottoposti a Ross operation (61). Le valvole erano costituite da xenograft o allograft decellularizzati, ripopolati con cellule endoteliali adulte prelevate da vene periferiche. Ad un follow-up medio di 46 mesi, non solo i risultati clinici si sono dimostrati soddisfacenti, ma le valvole non mostravano segni di calcificazione significativa, deterioramento strutturale o malfunzionamento.

La strategia della coltivazione cellulare in vitro di adeguati scaffold sembra dunque offrire i primi risultati.

Un approccio alternativo potrebbe essere quello di incorporare negli scaffold decellularizzati le informazioni biologiche (ad esempio fattori di crescita) necessarie a sfruttare il potenziale rigenerativo di cellule progenitrici autologhe circolanti (endoteliali e mesenchimali) responsabili della successiva maturazione tissutale in vivo. (Figura 2).

C'è crescente evidenza in letteratura che cellule progenitrici circolanti possano essere attivamente attratte e reclutate in precise sedi intravascolari, attraverso un processo simile a quello di chemiotassi ed adesione che sta alla base dei processi infiammatori (62). Le cellule progenitrici endoteliali sembrano promuovere nell'uomo l'endotelizzazione delle superfici interne (a contatto con il flusso ematico) dei devices di assistenza ventricolare (63,64). Inoltre, alcuni studi condotti su animali con infarto miocardico acuto iatrogeno, hanno dimostrato come cellule progenitrici possano essere attivamente indirizzate nelle zone di miocardio danneggiato (65). Il ruolo delle cellule progenitrici endoteliali nella medicina rigenerativa cardiaca è stato ampiamente studiato. L'iniezione intracoronarica di queste cellule in pazienti con infarto miocardico acuto, potrebbe contribuire al miglioramento della funzionalità dell'area di miocardio

danneggiato. La mobilizzazione e la migrazione di queste cellule avviene ad opera di precisi stimoli, quali quelli liberati durante l'ischemia tissutale; tuttavia anche citochine esogene sono in grado di promuovere la mobilizzazione di cellule progenitrici dal midollo (66). Le citochine più coinvolte in questa funzione sembrano essere il Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF), l'angiopoietina-1, il Fibroblast Growth Factor, e lo Stromal Growth Factor-1 (67). Si è visto infatti che, pazienti con infarto miocardico acuto mostrano livelli plasmatici elevati di VEGF, così come un numero maggiore, rispetto ai controlli, di cellule progenitrici endoteliali (68). Sulla base di queste osservazioni, si può ipotizzare di incorporare negli scaffold le molecole appropriate per indurre la mobilizzazione e migrazione attiva di cellule progenitrici circolanti e/o midollari. Ota e coll hanno impiantato in un modello canino, delle protesi porcine decellularizzate arricchite con fibronectina ed Hepatocyte Growth factor (69). Confrontando le valvole così preparate con protesi porcine semplicemente decellularizzate, all'esame istologico ad 1 settimana e 1 mese dall'impianto, le valvole arricchite con fibronectina e fattore di crescita mostravano una endotelizzazione ed una cellularizzazione nettamente superiori, dimostrando la fattibilità della tecnica in questione.

1.4 le cellule utilizzate in ingegneria tissutale

La seconda componente fondamentale necessaria alla creazione di una valvola cardiaca di ingegneria tissutale, è costituita dalle cellule. In effetti, visto che la tecnica più affermata di ingegneria tissutale sembra quella che prevede la coltivazione in vitro sugli scaffold, siano essi sintetici o naturali, rimane aperto il dibattito su:

1. quale sia la popolazione cellulare da utilizzare per seminare gli scaffold
2. quale la fonte tissutale dalla quale prelevare questa linea cellulare.

Considerando che la popolazione cellulare delle valvole native è costituita da cellule endoteliali e cellule interstiziali della matrice, a loro volta rappresentate da fibroblasti, miofibroblasti e sporadiche cellule muscolari lisce, potenzialmente possono essere applicate a tali scopi sia cellule adulte specializzate, come appunto cellule endoteliali o cellule muscolari lisce, che cellule staminali autologhe.

Uno dei primi studi clinici condotti in questo senso è stato quello di Deitsch e coll, che dopo aver impiantato cellule endoteliali autologhe su protesi vascolare in PTFE utilizzate come graft arteriosi per un by-pass femoro-popliteo, ha constatato che, l'aver endotelizzato in vitro le protesi prima dell'impianto, migliorava la pervietà a distanza delle protesi stesse (70).

In letteratura sono riportate varie esperienze in cui le valvole di ingegneria tissutale sono state create impiantando cellule endoteliali autologhe su scaffold di varia natura (61,71). In genere la fonte cellulare è costituita dalla vena safena autologa, la quale è facilmente accessibile e può fornire una quantità sufficiente di cellule. In particolare il gruppo di Dolmen e coll ha riportato risultati clinici a 5 anni di xenograft e homograft decellularizzati e ripopolati con cellule endoteliali isolate da vena safena e cefalica autologa, in 23 pazienti sottoposti a Ross operation (61). Cellule prelevate da safena, ma caratterizzate come fibroblasti e miofibroblasti, sono state utilizzate con buoni risultati anche su scaffold sintetici biogradabili (49).

Nonostante l'utilizzo di cellule adulte specializzate risulti facilmente applicabile grazie l'accessibilità delle fonti cellulari, le proprietà uniche delle cellule staminali di plasticità, multipotenzialità, e capacità di autorinnovamento, le candida a ruolo di protagoniste nel campo dell'ingegneria tissutale. Una delle fonti più ricche ed utilizzate di cellule staminali è il midollo osseo. Nel midollo possono essere isolate, caratterizzate ed espanse, cellule staminali ematopoietiche (che danno origine a linee cellulari

ematologiche), cellule staminali endoteliali (cellule progenitrici endoteliali che formano componenti del sistema cardiovascolare) e cellule mesenchimali (con potenziale differenziativo verso cellule adipose, condrociti ed osteociti, miociti e fibroblasti). Inoltre, il midollo osseo umano è una fonte facilmente accessibile con procedure chirurgiche semplici, attuabili in sicurezza in anestesia loco-regionale. La sospensione ottenuta con il primo prelievo è facilmente processabile e difficilmente contaminabile. Sutherland e coll hanno impiantato cellule mesenchimali prelevate da midollo osseo ovino su scaffold biodegradabili poi impiantati su pecore (60). Dopo 4 e 8 mesi le valvole analizzate mostravano componenti cellulari del tutto simili a quelli presenti nelle valvole native. In particolare, a 8 mesi, le cellule che esprimevano vimentina (marcatore del fenotipo fibroblastico) erano presenti in tutto lo spessore della valvola, mentre le cellule che esprimevano actina muscolare liscia (marcatore miofibroblastico) erano presenti nel solo strato sottoendoteliale; infine un sottile strato di cellule positive agli anticorpi anti-fattore VIII (marcatore endoteliale) ricopriva l'intera superficie delle valvole. Nelle protesi ripopolate con cellule mesenchimali e impiantate in vivo, si erano quindi sviluppati tutti i tipi cellulari normalmente presenti nelle valvole native.

Anche cellule progenitrici endoteliali prelevate da sangue periferico sono state utilizzate nel campo dell'ingegneria tissutale (72).

In seguito, la scoperta e la caratterizzazione di cellule staminali cardiache residenti in cuori umani adulti (73,74,75), ha aperto un nuovo campo di ricerca, suscitando l'interesse dell'intera comunità scientifica del settore.

2. VALUTAZIONE DI STRUTTURE CARDIOVASCOLARI UMANE ADULTE COME POTENZIALE FONTE CELLULARE

2.1 Background e obiettivi

Come evidenziato nelle sezioni precedenti, uno dei punti critici più salienti nel campo dell'ingegneria tissutale nelle valvole cardiache, è l'individuazione di una linea cellulare ideale con cui seminare gli scaffold per la creazione in vitro di un sostituto valvolare da impiantare in vivo. Se linee cellulari adulte specializzate sono già state utilizzate, sia su modello animale che umano, l'interesse maggiore si è concentrato sulle potenzialità delle cellule staminali. Infatti, negli ultimi anni, il concetto di medicina rigenerativa intesa come utilizzo di cellule e fattori di crescita autologhi per riparare i tessuti, si sta avvicinando sempre più a diventare una realtà. In questo stesso contesto, si è sviluppato il concetto dell'utilizzo di cellule staminali autologhe per la creazione di valvole di ingegneria tissutale.

Sicuramente le cellule staminali prelevate da midollo osseo costituiscono una fonte ricca e facilmente accessibile, e, pertanto, il midollo osseo adulto è stata in questi anni la fonte più studiata ed utilizzata sia nel campo della medicina rigenerativa che nel campo dell'ingegneria tissutale..

La scoperta di cellule cardiache staminali residenti ha rivoluzionato i concetti della medicina rigenerativa cardiaca, portando all'attenzione della comunità scientifica la possibilità di sfruttare questa popolazione cellulare residente a scopi rigenerativi.

Il gruppo di Anversa è arrivato identificare e caratterizzare un pool di cellule staminali residenti nel cuore adulto (75). Questo pool cellulare è caratterizzato dalla positività ad un particolare marker di superficie noto con il nome di CD117 o c-kit.

CD117 è una proteina transmembrana dal peso di 145 kDa, appartenente alla famiglia del recettore tiroxina chinasi di classe III. La regione extracellulare consiste di cinque domini immunoglobulino-simili, nei quali il secondo e terzo loop si pensa siano implicati nel legame con i ligandi. Il ligando naturale di CD117 è stato chiamato fattore delle cellule staminali (SCF), steel factor oppure fattore di crescita dei mastociti (76,77). CD117 è stato identificato originariamente come un antigene associato alla leucemia mieloide acuta ed è stato dimostrato essere anche un marker dei mastociti tissutali, delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule progenitrici del midollo osseo umano normale. La maggior parte delle cellule midollari CD117-positive (50-70%), coesprimono CD34 e comprendono le cellule progenitrici e i loro precursori di tutte le linee ematopoietiche.

Fatta eccezione per i mastociti, CD117 risulta essenzialmente assente dalle cellule ematopoietiche mature. Sebbene CD117 sia primariamente un marker delle cellule progenitrici non linfoidi del sistema ematopoietico, viene messa in evidenza anche nei progenitori linfoidi precoci, ed è stata riportata in alcune linee cellulari di leucemia linfoblastica acuta T (ALL) pediatrica, anche se sembra essere rara nelle ALL primarie. CD117 è espressa anche da cellule o tessuti non ematopoietici, come i melanociti, il cervello embrionale ed il sistema riproduttivo (76).

Secondo alcuni studi, l'iniezione intracoronarica di cellule staminali cardiache CD117+ in seguito ad un danno da ischemia-riperfusion, promuove la rigenerazione cardiaca, limita l'estensione dell'infarto, attenua il processo di rimodellamento ventricolare e migliora la funzione cardiaca. (78). Si delinea quindi uno scenario nel quale cellule cardiache autologhe possono essere isolate, espanse e conservate a fini terapeutici.

Potenzialmente cellule staminali residenti potrebbero essere utilizzate, non solo a scopi rigenerativi, ma anche per coltivare la matrice degli scaffold valvolari di ingegneria

tissutale. Possibili fonti cellulari potrebbero essere sia le valvole cardiache umane adulte stesse, che condotti vascolari periferici arteriosi o venosi. A tutt'oggi non è noto, infatti, se esistano cellule staminali residenti nelle valvole cardiache sane e/o patologiche.

A tal fine, quindi, l'obiettivo di questo studio, è quello di valutare la presenza di possibili cellule CD117 positive in valvole mitraliche di pazienti affetti da insufficienza mitralica mixomatosa. Le valvole sono state ottenute durante interventi cardiocirurgici di sostituzione o plastica valvolare. Allo stesso scopo sono stati analizzati anche frammenti di arteria mammaria interna e vena safena di pazienti affetti da cardiopatia ischemica.

2.2 Materiali e metodi

Al fine di individuare possibili cellule staminali, previo ottenimento del consenso informato da parte dei pazienti, sono state analizzate le valvole mitraliche di 10 pazienti affetti da valvulopatia mitralica mixomatosa con indicazione ad intervento chirurgico di sostituzione o plastica valvolare. Sono stati esclusi pazienti con valvulopatie degenerative calcifiche e/o reumatiche. I frammenti di valvola sono stati prelevati in circolazione extracorporea durante arresto cardioplegico del cuore al momento dell'intervento cardiocirurgico, ed erano costituiti in 7 casi da frammenti di lembo posteriore, ed in 3 casi da frammenti di lembo anteriore, posteriore e corde tendinee. Tutte le valvole analizzate non presentavano significative calcificazioni o degenerazione fibrosa. Inoltre, sempre previo ottenimento di consenso informato da parte dei pazienti, sono stati analizzati anche frammenti di vena safena autologa (n=5) e arteria mammaria interna (n=5) prelevati durante interventi di rivascolarizzazione miocardica. I frammenti sono stati inviati subito dopo il prelievo chirurgico senza ulteriore conservazione.

I frammenti di tessuto miocardico umano (valvole mitrali, arterie e vene) sono stati divisi in due parti: la prima è stata fissata in Karnowsky per l'indagine ultrastrutturale e la seconda in formalina tamponata al 10% per l'esame istologico. Altre sezioni di uguale spessore sono state allestite per l'analisi immunohistochimica.

Trattamento dei campioni

Per l'indagine al microscopio ottico, questi sono stati fissati per circa 24-48 ore in una soluzione al 10% di formalina tamponata. Successivamente, per l'esame istologico, il materiale è stato adeguatamente campionato, processato e incluso in blocchi di paraffina; da ciascun blocco sono state allestite sezioni istologiche di circa 5mm di spessore. I frammenti destinati all'esame istologico sono stati sezionati ed orientati in modo che fosse valutabile la parete dalla superficie alla profondità. Le sezioni istologiche sono state colorate con Ematossilina-Eosina e Acido Periodico di Shiff (PAS), blu di Toluidina e metodo di Van Gieson per il collagene.

Immunohistochimica

Su sezioni istologiche di circa 5mm di spessore, allestite dai campioni inclusi in paraffina, sono stati ottenuti preparati incubati con gli anticorpi primari descritti in Tabella 2. La positività di ogni anticorpo è stata rivelata con kit HRP DAKO LSAB[®]2 System (K0675, Dako, Carpinteria, CA) e DAB. Successivamente i preparati istologici sono stati debolmente controcolorati con ematossilina di Mayer.

TABELLA 2: anticorpi primari utilizzati per l'indagine immunistoichimica

Anticorpo	Clonalità	Clone	Catalogo	Diluizione	Pretrattamento	Incubazione, min
CD34	M	QBEnd/10	MS-363-P0	1:50	mw cit	30 rt
CD117 (c-kit)	P		A4502	1:100	No	30 rt
Caldesmina	M	h-CD	M3557	1:50	mw cit	30 rt
Actina muscolare liscia	M	1A4	MS-113-P	1:200	No	30 rt
Vicentina	M	V9	MS-129-P1	1:500	No	30 rt
S100	M	15E2E2	MU-058-UC	1:800	No	30 rt
Desmina	M	D33	M0760	1:100	No	30 rt

M: monoclonale; P: policlonale; mw: pretrattamento con microonde; cit: citrate buffer; pd: proteinase digestion; rt: a temperatura ambiente; on: overnight

Analisi ultrastrutturale

Un piccolo frammento di ogni lembo valvolare mitralico, arteria e vena (1 x 1 mm circa) è stato prelevato dal campione destinato all'esame per la microscopia ottica prima della fissazione in formalina. Tale frustolo è stato fissato per 3 ore a temperatura ambiente in una soluzione contenente il 4% di paraformaldeide e il 5% di glutaraldeide in tampone fosfato 0.1M (pH 7.3), postfissato in tetrossido di osmio all'1%, disidratato e incluso in araldite. Sezioni di 1 µm sono state colorate con Blu di Metilene e Safranina. Dopo avere selezionato campi rappresentativi ed in seguito a colorazione con uranil acetato e citrato di piombo il tessuto è stato osservato con un microscopio elettronico a trasmissione (Philips, EM 208S, Eindhoven, NL).

2.3 Risultati

Microscopia ottica

I campioni valvolari mitralici mostravano ancora una suddivisione in strati (spongiosa, fibrosa e ventricolare) con lievi/moderati segni di sclerosi e rigidità di parete (Figura 3 A). In nessun caso si osservavano aspetti di neoangiogenesi e, solo focalmente, erano presenti microfocolai di flogosi cronica linfocitaria di grado non significativo. La componente cellulare era rappresentata in prevalenza da elementi di piccola-media taglia di forma fusata a margini abbastanza ben evidenziabili e nucleo allungato non ipercromico (Figura 3 B). La componente fibrosa si colorava in rosso con il metodo di Van Gieson per il collagene, mentre non erano presenti elementi cellulari PAS-positivi. All'esame immunohistochimico tutti gli elementi fusati erano positivi alla vimentina, in gran parte al CD34 (Figura 4 C), in parte all'actina muscolare liscia (Figura 4 B), mentre in 6 dei 10 campioni analizzati solo isolate cellule di forma allungata si marcano con CD117 (Figura 4 A) alcune delle quali non presentavano caratteristiche ultrastrutturali dei mastociti ed erano negative al blu di toluidina. Negative erano S100, desmina e caldesmina. La metodica utilizzata non ha consentito di valutare se le cellule CD117 positive lo erano anche per CD34.

I campioni vascolari arteriosi e venosi non mostravano segni di degenerazione né, nel caso delle arterie mammarie, gravi lesioni aterosclerotiche ma solo modificazioni compatibili con l'età dei pazienti allo studio (Figura 3 C, arteria, e D, vena). In tutti i casi erano evidenziabili la tonaca intima (con rivestimento endoteliale), la tonaca media (prevalentemente muscolare liscia) e un sottile strato di avventizia talora in continuità con i tessuti molli perivascolari. Nei campioni arteriosi era presente la lamina elastica interna. All'esame immunohistochimico non si osservavano elementi di forma allungata positivi al CD117 (solo cellule rotondeggianti/poligonali compatibili con mastociti,

Figura 4 D), mentre i restanti anticorpi marcavano le normali strutture muscolari, fibrose ed endoteliali delle pareti.

Analisi ultrastrutturale

L'analisi ultrastrutturale dei segmenti valvolari confermava quanto trovato in microscopia ottica. Si osservavano fibroblasti talora con le caratteristiche di miofibroblasti localizzati in stroma fibroso denso o lasso a seconda della posizione negli strati valvolari o vascolari (Figura 5 A). I contorni cellulari delle cellule fusate erano ben visibili e netti, i nuclei allungati mostravano cromatina zonalmente distribuita ma senza segni di atipia e talora un nucleolo. Il citoplasma aveva il Golgi, il reticolo endoplasmico rugoso e mitocondri ben sviluppati. Talora erano visibili microfilamenti a disposizione sottomembranosa. Lo stroma intercellulare era costituito da collagene di tipo I con filamenti che si intersecavano irregolarmente di circa 50 nm di diametro (Figura 5 B).

L'analisi dei campioni vascolari non mostrava elementi differenti dalle normali cellule endoteliali, connettivali e muscolari delle pareti (Figura 5 C).

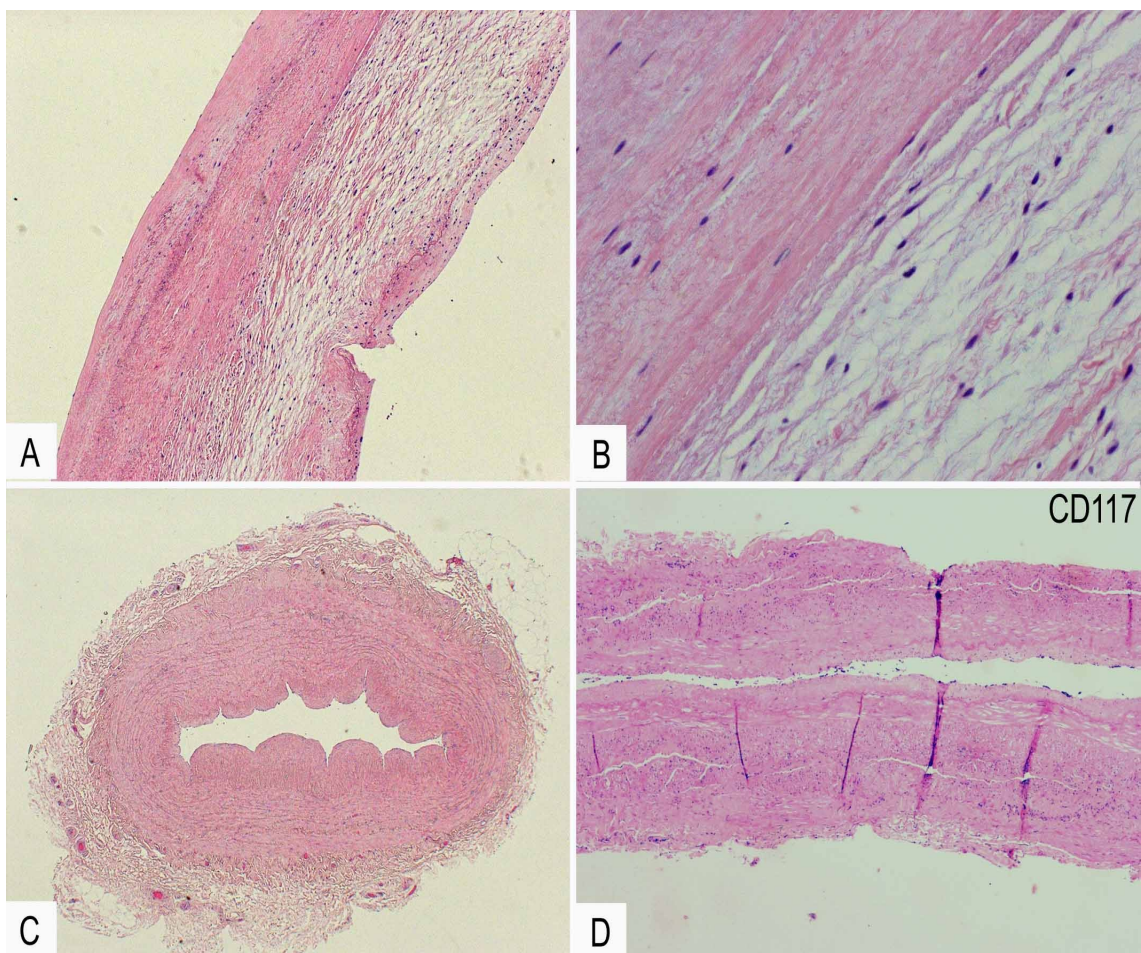


Figura 3: **A** sezione istologica di valvola mitrale con tipica distribuzione trilaminare **B** Componente cellulare mitralica con elementi di piccola-media taglia di forma fusata a margini abbastanza ben evidenziabili e nucleo allungato non ipercromico (fibroblasti) **C** sezione di arteria mammaria **D** sezione di vena safena negativa al CD117

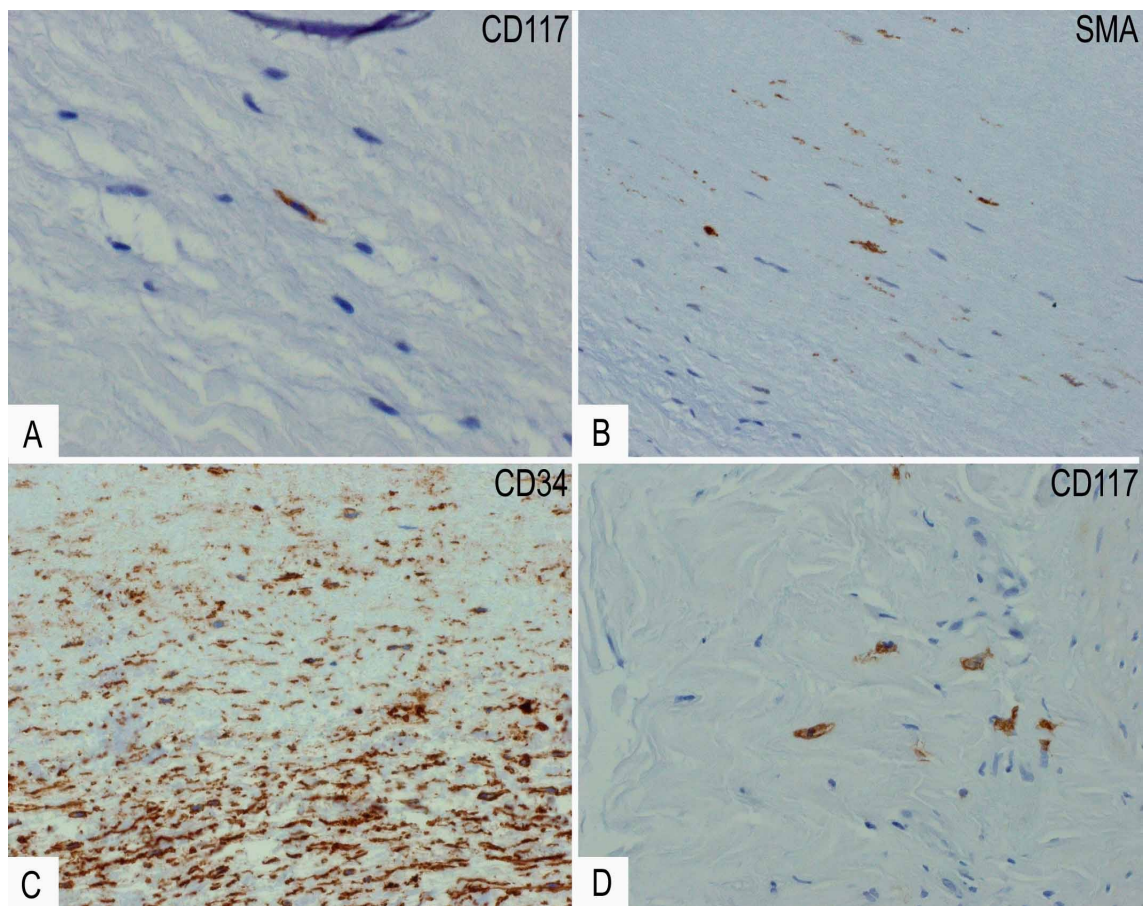


Figura 4

A rare cellule fusate CD117+ nel contesto di valvole mitraliche (possibili cellule mesenchimali) **B** cellule mitraliche positive all'actina muscolare liscia **C** abbondanti cellule mitraliche CD34+ **D** cellule rotondeggianti CD117+ (mastociti) in sezione di condotti vascolari.

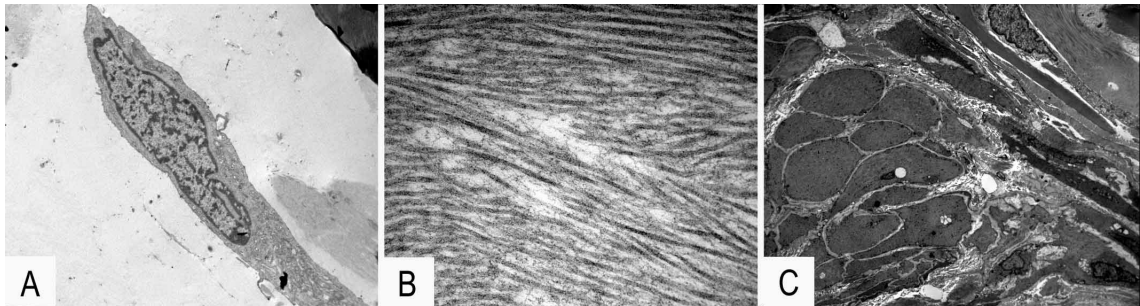


Figura 5

Microscopia elettronica: **A** cellula fusata in campione mitralico (fibroblasto) **B** Collagene di tipo I **C** sezione di vena con cellule endoteliali e muscolatura liscia

2.4 Discussione

I cardiomiociti adulti, una volta differenziatisi, perdono la capacità di riprodursi, e quindi è sempre stata convinzione comune che il tessuto miocardico, così come quello nervoso, non possa rigenerarsi in seguito ad un danno tissutale. La scoperta di possibili cellule staminali cardiache residenti ha scardinato questa convinzione. Vari autori hanno isolato e caratterizzato un pool di cellule staminali CD117+ nel cuore umano adulto (75). Una volta consolidata questa osservazione, rimane irrisolto il dibattito sull'origine di queste cellule: non è noto infatti se queste cellule originino, vivano e muoiano nel miocardio, o se piuttosto altri organi riforniscano sotto adeguati stimoli il miocardio di queste cellule che solo in seguito acquisiscono caratteristiche cardiache.

In letteratura esistono evidenze che cellule staminali indifferenziate C-kit+ e CD34+ del midollo osseo, possono migrare in zone infartuate del miocardio e promuovere la rigenerazione di tessuto miocardico. (79,80,81) .

Quaini e coll. hanno studiato a fondo il chimerismo in cellule miocardiche di cuori femminili trapiantati in riceventi maschi (82). Gli autori hanno evidenziato che nel cuore donato, non solo erano presenti cellule differenziate (miociti, cellule muscolari lisce vascolari) che esprimevano positività per il cromosoma Y, ma anche cellule staminali indifferenziate c-kit+, Sca-1+ e MDR1+. Nel lavoro si conclude che rimane dubbia l'origine di queste cellule indifferenziate, di cui non si esclude anche l'origine midollare.

Con la nostra esperienza abbiamo cercato di valutare se possibili cellule staminali CD117+ fossero presenti in strutture cardiovascolari umane. Nei condotti arteriosi e venosi nessuna cellula CD117+ è stata trovata, fatta eccezione per cellule rotondeggianti che all'esame ultrastrutturale potevano ricordare dei mastociti, testimoniando l'assenza di potenziale cellule progenitrici.

In 6 dei 10 campioni di mitrali analizzate sono state individuate, seppur in numero esiguo, delle cellule fusate positive al c-kit che, alla colorazione con blu di Toluidina risultavano negative. I granuli citoplasmatici positivi alla Toluidina sono tipici delle cellule mastocitarie, uno dei pochi fenotipi cellulari adulti differenziati che esprimono il SCF come antigene di superficie. Inoltre queste cellule non avevano le caratteristiche ultrastrutturali dei mastociti. Pertanto questi pochi elementi potrebbero potenzialmente essere cellule mesenchimali. Con la metodica utilizzata non è stato possibile verificare se le cellule c-kit⁺ esprimessero anche il CD34, cosa che non si può escludere visto l'abbondanza delle cellule CD34⁺. La coespressione di questi due markers avrebbe potuto deporre a favore di cellule mesenchimali.

Nella nostra esperienza non sono stati utilizzati anticorpi diretti contro altri marker tipici di cellule staminali come sca-1, necessari per asserire con certezza che le cellule C-kit⁺ trovate fossero realmente cellule staminali.

Qual'ora fossero realmente cellule staminali, rimane irrisolto il dilemma riguardo la loro origine né il loro eventuale ruolo nei processi patogenetici. Infatti va ricordato che tutte le valvole analizzate erano valvole patologiche. Non siamo in grado cioè di sapere se queste cellule facciano parte di un pool residente o se vengano reclutate da altri organi come il midollo osseo; in quest'ultimo caso non sappiamo quale sia lo stimolo necessario al loro reclutamento. Il reclutamento potrebbe avvenire sia attraverso la mobilitazione da un pool midollare che dall'attivazione ed adesione da un pool circolante.

Ulteriori ostacoli alla potenziale applicazione di queste cellule sono: l'esiguo numero trovato, e la difficoltà di accesso a strutture complesse come la valvola mitralica.

Maish e coll ha valutato su modello animale la fattibilità di una biopsia ecoguidata della valvola tricuspide attraverso una incisione chirurgica della vena giugulare interna, per

isolare ed espandere miofibroblasti da utilizzare per la creazione di una valvola cardiaca di ingegneria tissutale (83). Su 13 pecore sottoposte alla procedure 2 sono decedute per cause iatrogene (rottura di corda tendinea e di vena cava). Nonostante gli autori concludano che la biopsia della tricuspide può costituire una potenziale fonte cellulare per l'ingegneria tissutale, al momento attuale, altre fonti, chirurgicamente più accessibili, sono da preferirsi.

In conclusione si può asserire che le strutture cardiovascolari umane da noi valutate, quali valvole mitrali, arterie mammarie interne e vene safene, prelevate chirurgicamente, non sembrano essere fonte di cellule staminali adeguate per essere utilizzate nel campo dell'ingegneria tissutale.

La possibilità di sfruttare il potenziale rigenerativo residente, o di pool cellulari circolanti e/o midollari, attraverso l'impianto di scaffold con fattori di crescita che promuovano la mobilizzazione, migrazione proliferazione di cellule staminali, sembra essere una prospettiva più allettante che dovrà essere valutata e sperimentata negli anni a venire.

BIBLIOGRAFIA

1. Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of imagination. *J Heart Valve Dis* 1997;6(1): 1-6.
2. Rahimtoola, S. H. Choice of prosthetic heart valve for adult patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41:893–904, 2003.
3. Hammermeister, K., G. K. Sethi, W. G. Henderson, F. L. Grover, C. Oprian, and S. H. Rahimtoola. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36:1152–1158, 2000.
4. Jamieson, W. R., O. von Lipinski, R. T. Miyagishima, L. H. Burr, M. T. Janusz, H. Ling, G. J. Fradet, F. Chan, and E. Germann. Performance of bioprostheses and mechanical prostheses assessed by composites of valve-related complications to 15 years after mitral valve replacement. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129:1301–1308, 2005.
5. Schoen, F. J. Pathology of heart valve substitution with mechanical and tissue prostheses. In: *Cardiovascular Pathology 3rd Ed.*, edito da M. D. Silver, A. I. Gotlieb, and F. J. Schoen. New York: Churchill Livingstone, 2001, pp. 629–677.
6. Isenberg, B. C., C. Williams, and R. T. Tranquillo. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ. Res.* 98:25–35, 2006.
7. Nerem, R. M., and A. E. Ensley. The tissue engineering of blood vessels and the heart. *Am. J. Transplant* 4:36–42, 2004.
8. Niklason, L. E., J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, and R. Langer. Functional arteries grown in vitro. *Science* 284:489–493, 1999.

9. Nugent, H. M., and E. R. Edelman. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ. Res.* 92:1068–1078, 2003.
10. Poh, M., M. Boyer, A. Solan, S. L. Dahl, D. Pedrotty, S. S. Banik, J. A. McKee, R. Y. Klinger, C. M. Counter, and L. E. Niklason. Blood vessels engineered from human cells. *Lancet* 365:2122–2124, 2005.
11. Weinberg, C. B., and E. Bell. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231:397–400, 1986.
12. Dimmeler, S., A. M. Zeiher, and M. D. Schneider. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J. Clin. Invest* 115:572–583, 2005.
13. Eschenhagen, T., and W. H. Zimmermann. Engineering myocardial tissue. *Circ. Res.* 97:1220–1231, 2005.
14. Laflamme, M. A., and C. E. Murry. Regenerating the heart. *Nature Biotech.* 23:845–855, 2005.
15. Leor, J., Y. Amsalem, and S. Cohen. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol. Therapeut.* 105:151–163, 2005.
16. Radisic, M., H. Park, H. Shing, T. Consi, F. J. Schoen, R. Langer, L. E. Freed, and G. Vunjak-Novakovic. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:18129–18134, 2004.
17. Breuer, C. K., B. A. Mettler, T. Anthony, V. L. Sales, F. J. Schoen, J. E. Mayer. Application of tissue-engineering principles toward the development of a semilunar heart valve substitute. *Tissue Eng.* 10:1725–1736, 2004.
18. Rabkin, E., and F. J. Schoen. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovasc. Pathol.* 11:305–317, 2002.

19. Rabkin-Aikawa, E., J. E. Mayer, and F. J. Schoen. Heart valve regeneration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 94:141–179, 2005.
20. Weinshilboum, R. Inheritance and drug response. *N. Engl. J. Med.* 348:529–537, 2003.
21. Erez, E., K. R. Kanter, E. Isom, W. H. Williams, and V. K. Tam. Mitral valve replacement in children. *J. Heart Valve Dis.* 12:25–29, 2003.
22. Kanter, K. R., J. M. Budde, W. J. Parks, V. K. Tam, S. Sharma, W. H. Williams, and D. A. Fyfe. One hundred pulmonary valve replacements in children after relief of right ventricular outflow tract obstruction. *Ann. Thorac. Surg.* 73:1801–1806, 2002.
23. Rabkin-Aikawa, E., M. Aikawa, M. Farber, J. R. Kratz, G. Garcia-Cardena, N. T. Kouchoukos, M. B. Mitchell, R. A. Jonas, and F. J. Schoen. Clinical pulmonary autograft valves: pathologic evidence of adaptive remodeling in the aortic site. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 128:552–561, 2004.
24. Rabkin-Aikawa, E., M. Farber, M. Aikawa, and F. J. Schoen. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J. Heart Valve Dis.* 13:841–847, 2004.
25. Schoen, F. J. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J. Heart Valve Dis.* 6:1–6, 1997.
26. Schoen, F. J., and W. D. Edwards. Valvular heart disease: General principles and stenosis. In: *Cardiovascular Pathology 3rd Ed.*, edited by M. D. Silver, A. I. Gotlieb, and F. J. Schoen. New York: Churchill Livingstone, 2001, pp. 402–405.
27. Schoen, F. J. Future directions in tissue heart valves: Impact of recent insights from biology and pathology. *J. Heart Valve Dis.* 8:350–358, 1999.

28. Merryman, W. D., H. D. Lukoff, R. A. Hopkins, and M. S. Sacks. Aortic valve interstitial cell phenotype and biosynthesis: synergistic effects of cyclic tension and TGF- β 1. Proceedings of BIO2006. ASME Summer Bioengineering Conference, 2006.
29. Aikawa, E., P. Whittaker, M. Farber, K. Mendelson, R. Padera, and F. Schoen. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: Implications for postnatal adaptation, valve pathology and tissue engineering. *Circulation* 113:1344–1352, 2006.
30. Taylor, P. M., S. P. Allen, and M. H. Yacoub. Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J. Heart Valve Dis.* 9:150–158, 2000.
31. Taylor, P. M., P. Batten, N. J. Brand, P. S. Thomas, and M. H. Yacoub. The cardiac valve interstitial cell. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35:113–118, 2003.
32. Deck JD: Endothelial cell orientation on aortic valve leaflets. *Cardiovasc Res* 1986; 20:760.
33. Butcher, J. T., and R. M. Nerem. Porcine aortic valve interstitial cells in three-dimensional culture: comparison of phenotype with aortic smooth muscle cells. *J. Heart Valve Dis.* 13:478–485, 2004.
34. Butcher, J. T., A. M. Penrod, A. J. Garcia, and R. M. Nerem. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1429–1434, 2004.
35. Davies, P. F., A. G. Passerini, and C. A. Simmons. Aortic valve: turning over a new leaf(let) in endothelial phenotypic heterogeneity. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 24:1331–1333, 2004.

36. Schmitt-Graff, A., A. Desmouliere, and G. Gabbiani. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch.* 425:3–24, 1994.
37. Schurch, W., T. A. Seemayer, and G. Gabbiani. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am. J. Surg. Pathol.* 22:141–147, 1998.
38. Walker, G. A., K. S. Masters, D. N. Shah, K. S. Anseth, and L. A. Leinwand. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ. Res.* 95:253–260, 2004.
39. Eisenberg, L. M., and R. R. Markwald. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* 77:1–6, 1995.
40. Armstrong, E. J., and J. Bischoff. Heart valve development: Endothelial cell signaling and differentiation. *Circ. Res.* 95:459–470, 2004.
41. Beis, D., T. Bartman, S. W. Jin, I. C. Scott, L. A. D'Amico, E. A. Ober, H. Verkade, J. Frantsve, H. A. Field, A. Wehman, H. Baier, A. Tallafuss, L. Bally-Cuif, J. N. Chen, D. Y. Stainier, and B. Jungblut. Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development. *Development* 132:4193–4204, 2005.
42. Garg, V., A. N. Muth, J. F. Ransom, M. K. Schluterman, R. Barnes, I. N. King, P. D. Grossfeld, and D. Srivastava. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437:270–274, 2005.
43. Lee, Y. M., J. J. Cope, G. E. Ackermann, K. Goishi, E. J. Armstrong, B. H. Paw, and J. Bischoff. Vascular endothelial growth factor receptor signaling is required for cardiac valve formation in zebrafish. *Dev. Dyn.* 235:29–37, 2006.

44. Rabkin-Aikawa, E., M. Aikawa, M. Farber, J. R. Kratz, G. Garcia-Cardena, N. T. Kouchoukos, M. B. Mitchell, R. A. Jonas, and F. J. Schoen. Clinical pulmonary autograft valves: pathologic evidence of adaptive remodeling in the aortic site. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 128:552–561, 2004.
45. Grimm M, Ebyl E, Grabenwoger M, e coll. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. An in vitro and in vivo approach toward improvement of bioprosthetic heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.*1991;102:195-201.
46. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, e coll. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg.* 1995;60: s513-s516.
47. Martheny RG, Hutchison ML, Dryden PE, e coll. Porcine small intestine submucosa as a pulmonary valve leaflet substitute. *J Heart Valve Dis.* 2000;9:769-774; discussion 774-775.
48. Ratner, B. D., and S. J. Bryant. Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 6:41–75, 2004.
49. Mol A, Rutten MVM, Diresse NJB, e coll. Autologous Human tissue- engineered heart valves: Prospects for Systemic Application *Circulation* 2006;114 I-152_I-158.
50. Smith JD, Hornick PI, Rasmi N, Rose ML, Yacoub MH. Effect of HLA mismatching and antibody status on "homovital" aortic valve homograft performance. *Ann Thorac Surg.* 1998; 66: S212–S215.
51. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76: 1274–1278.
52. Grinnell F, Lamke CR. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. *J Cell Sci.* 1984; 66: 51–63.

53. Tranquillo RT, Durrani MA, Moon AG. Tissue engineering science: consequences of cell traction force. *Cytotechnology*. 1992; 10: 225–250.
54. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999; 284: 489–493.
55. Oakes BW, Batty AC, Handley CJ, Sandberg LB. The synthesis of elastin, collagen, and glycosaminoglycans by high density primary cultures of neonatal rat aortic smooth muscle. An ultrastructural and biochemical study. *Eur J Cell Biol*. 1982; 27: 34–46.
56. Schoen FJ, Mitchell RN, Jonas RA. Pathological considerations in cryopreserved allograft heart valves. *J Heart Valve Dis*. 1995; 4 (suppl 1): S72–S75;discussion S75–S76.
57. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, e coll. Early failure of tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;23;1002-1006; discussion 1006.
58. Bechtel JFM, Müller-Steinhardt M, Schmidtke C, Brunswik A, Stierle U, Sievers HH. Evaluation of the Decellularized Pulmonary Valve Homograft (SynerGrafte). *J Heart Valve Dis* 2003;12:734–40
59. Bechtela J.F.M, Gellissenb J,. Erasmia AW, e coll. Mid-term findings on echocardiography and computed tomography after RVOT-reconstruction: comparison of decellularized (SynerGraft) and conventional allografts *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 27 (2005) 410–415.
60. Sutherland FWH, Perry TE, Yu Y, e coll. From stem cells to viable autologous heart valve *Circulation* 2005;111: 2783-2791.

61. Dolmen PM, Lembcke A, Holinsky S, et coll. Mid-term clinical results using a tissue engineering pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during Ross procedure *Ann Thorac Surg* 2007;84:729-36.
62. Kumar, V., N. Fausto, and A. Abbas. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th Ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2004.
63. Frazier, O. H., R. T. Baldwin, S. G. Eskin, and J. M. Duncan. Immunochemical identification of human endothelial cells on the lining of a ventricular assist device. *Tex Heart Inst. J.* 20:78–82, 1993.
64. Rafii, S., M. C. Oz, J. A. Seldomridge, B. Ferris, A. S. Asch, R. L. Nachman, F. Shapiro, E. A. Rose, and H. R. Levin. Characterization of hematopoietic cells arising on the textured surface of left ventricular assist devices. *Ann. Thorac. Surg.* 60:1627–1632, 1995.
65. Mouquet, F., O. Pfister, M. Jain, A. Oikonomopoulos, S. Ngoy, R. Summer, A. Fine, and R. Liao. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res.* 97:1090–1092, 2005.
66. Ceradini, D. J., and G. C. Gurtner. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med.* 15:57–63, 2005.
67. Urbich, C., A. Aicher, C. Heeschen, E. Dernbach, W. K. Hofmann, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 39:733–742, 2005.

68. Szmitko, P. E., P. W. Fedak, R. D. Weisel, D. J. Stewart, M. J. Kutryk, and S. Verma. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* 107:3093–3100, 2003.
69. Ota, T., Y. Sawa, S. Iwai, T. Kitajima, Y. Ueda, C. Coppin, H. Matsuda, and Y. Okita. Fibronectin-hepatocyte growth factor enhances reendothelialization in tissue-engineered heart valve. *Ann. Thorac. Surg.* 80:1794–1801, 2005.
70. Deutsch, M., J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss, and P. Zilla. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery* 126:847–855, 1999.
71. Gulbins H, Pritisanac A, Uhlig A, e coll. Seeding of human endothelial cells on valve containing aortic mini-roots: development of a seeding device and procedure *Ann Thorac Surg* 2005; 79:2119-26.
72. Wu, X., E. Rabkin-Aikawa, K. J. Guleserian, T. E. Perry, Y. Masuda, F. W. Sutherland, F. J. Schoen, J. E. Mayer, and J. Bischoff. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287:H480–H487, 2004.
73. Beltrami AP, Urbanek k, Kajstura J, e coll. Evidence that human cardiac myocyte divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344:1750-1757, 2001.
74. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loretto C, Beltrami CA, e Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8801-8805,1998.
75. Feltrami AP, Barlucchi L, Torella D, e coll. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114;763-776;2003.
76. Ashman LK, Cambareri AC, Nguyen L, e coll. CD117 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka

- M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 816-8.
77. Bühring H-J, Ashman LK, Gattei V, e coll. CR2.7. Stem-cell factor receptor (p145(c-*kit*)) summary report (CD117). In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 1882-8.
78. B Dawn, AB Stein, K Urbanek, e coll Cardiac stem cell delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. Proc Natl Acad Sci USA 102:3766-3771,2005
79. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, e coll. Rivasularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med 2001;7:430-436
80. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, e coll. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001;410:701-705.
81. Jackson KA, Majka SM, Wang H, e coll. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest 2001;107:1395-1402
82. F Quaini, K Urbanek, AP Feltrami e coll Chimerism of the transplanted heart N Engl J Med 2002 Jan 3;346(1):5-15.
83. Maish MS, Hoffman-Kim D, Krueger PM, e coll. Tricuspid valve biopsy: a potential source of cardiac myofibroblast cells for tissue-engineered cardiac valves J heart Valve Dis 2003;264-269