

**Le cellule staminali adulte cardiache: mito o realtà?
Cardiac adult stem cells: myth or reality?**

Fabrizio Minervini

Servizio di Cardiocirurgia, Cardiocentro Ticino, Lugano, Svizzera

E-mail: fabriziominervini@hotmail.com

ABSTRACT:

Negli ultimi anni si è registrato l'interesse di molti gruppi di studio nell'utilizzo di cellule staminali per il trapianto cellulare come una delle possibili strategie terapeutiche nell'ambito della patologia cardiovascolare. In tal senso, le cellule staminali rappresenterebbero una risorsa fondamentale qualora si avessero maggiori conoscenze sui meccanismi che regolano la differenziazione in cardiomiociti. In questo lavoro, vengono riviste le più attuali ricerche sulle cellule staminali cardiache e sul loro possibile ruolo terapeutico nella riparazione del cuore affetto da patologia.

PAROLE CHIAVE: cellule progenitrici, cardiomiociti, rigenerazione miocardica.

KEYWORDS: progenitor cells, cardiomyocytes, myocardial regeneration.

CAPSULA EBURNEA, 1,8: 1-5, 2006.

Introduzione

Analogamente ai vasi sanguigni, con cui condivide l'origine a partire dalle *isole sanguigne*, ossia ammassi di cellule mesenchimali presenti tra l'entoderma e la splancnopleura nella parte laterale del sacco vitellino dell'embrione di circa venti giorni, il cuore risulta costituito da tre tuniche: l'epicardio, il miocardio e l'endocardio. L'elemento cardine della funzionalità cardiaca è la tunica media, o *miocardio* che, rispetto agli strati precedenti, risulta più cospicuo e complesso nella sua eterogeneità. Addirittura Vesalio nel 1544 aveva già intuito questa mancanza di omogeneità dello strato intermedio della parete cardiaca. Nella sua opera "De Humani corporis fabrica" infatti scriveva: "La sostanza propria del cuore è costituita dalla carne, un poco meno rossa della carne dei muscoli e da questa molto diversa per consistenza e densità delle fibre e per la sua architettura. Infatti, la carne del cuore appare molto più dura e più densa ed anche più resistente ai danni e fornita di fibre robustissime di *vario genere*, mentre la carne di un muscolo contiene *un solo tipo di fibre* che appaiono abbastanza sparse qua e là". Il miocardio effettivamente è composto da fibrocellule eterogenee, oggi sappiamo per forma, dimensioni, distribuzione di organuli, capacità secrete, contenuto miofibrillare. Le fibrocellule muscolari cardiache costituiscono peraltro la popolazione cellulare maggiormente rappresentata ma,

è necessario sottolineare, non l'unica.

Già da tempo tra le cellule muscolari cardiache si riconoscono quelle comuni di lavoro (tra cui si riconoscono anche le cosiddette cellule mioendocrine) e altre facenti parte del miocardio specifico (miocardiociti nodali, di conduzione, cellule del Purkinje). Interposto tra le cellule descritte si trova lo *stroma miocardico*, ricco in fibre elastiche (negli atri), collagene (nei ventricoli), fibroblasti, ma anche cellule di incerta origine (mioblasti? angioblasti?) e vasi sanguigni. Il connettivo elastico e quello fibroso sono i due elementi che, dal punto di vista meccanico, hanno notevole importanza nella gestione della plasticità della parete cardiaca. Il connettivo elastico, infatti, coadiuva la contrazione cardiaca impedendo nello stesso tempo lo stress delle membrane cellulari mentre quello fibroso previene l'eccessiva dilatazione della parete cardiaca.

Evidente è anche una ricca rete vascolare sanguifera. La parete cardiaca, infatti, per il suo spessore e per le importanti funzioni svolte non può nutrirsi semplicemente per diffusione dal sangue circolante ma necessita di un apporto specifico fornito dal sistema coronarico. I vasi sanguigni in questione sono di tipo terminale, incapaci, pertanto, di formare reti anastomotiche se non in condizione di insulti cronici. Il loro numero è così ampio che molti lavori scientifici, anche datati, dimostrano che esiste un rapporto 1:1 tra capillari e cellule cardiache.

Il rimodellamento della parete cardiaca

Aspetto singolare delle cellule muscolari cardiache è la mancanza di turn-over. Se coltivate in vitro non presentano caratteri suggestivi di mitosi e pertanto possono essere definite come cellule terminali che possono incrementare la massa miocardica in condizioni fisiologiche e patologiche solo attraverso l'ipertrofia cellulare (1). In realtà, a partire dalla fine degli anni '90 alcuni studiosi hanno cominciato ad avanzare dubbi sulla veridicità di tali assunti ipotizzando un'eterogenità più complessa, che comprendesse non solo cellule differenziate ma anche cellule indifferenziate. Studi immunostochimici hanno evidenziato che una piccola percentuale di cellule (0.0014%) nel cuore umano, in condizioni fisiologiche, va incontro a mitosi e che tale percentuale sale al 4% nelle zone peri-infartuate (2). Inoltre, il gruppo di Anversa, che per primo ha descritto eventi mitotici nel miocardio normale adulto umano, è andato oltre, calcolando che in un cuore adulto sono presenti $5,8 \times 10^9$ miocardiociti e che una mitosi, normalmente, avviene in un'ora. Se l'indice mitotico è di 14 miocardiociti per un milione, ne risulta che ogni ora 81.000 miocardiociti vanno in mitosi e, in un anno, il cuore rigenererebbe 7.1×10^8 miocardiociti. Un miocardio sotto stress, ovviamente, ne produrrebbe di più e si era arrivati a stimare che un miocardio ischemico potesse rigenerare completamente l'intera massa ventricolare in un anno! Sfortunatamente, ciò non corrisponde alla realtà perché, come dimostrato sempre dal gruppo di Anversa, lo stimolo ipossico non induce solo proliferazione dei miocardiociti ma anche fenomeni di morte cellulare (apoptosi e necrosi).

Le cellule staminali

Le cellule staminali sono un gruppo di cellule non differenziate responsabili del rimaneggiamento, dell'omeostasi e della plasticità tissutale. Un'alterazione del differenziamento delle cellule staminali sta alla base di molti processi fisiopatologici nonché di quelli di invecchiamento. Probabilmente non esiste una cellula staminale ma diverse cellule non differenziate dotate di potenzialità differenziative uniche o plurime. In molti tessuti del corpo umano adulto sono

presenti cellule staminali che danno origine a cellule staminali-figlie e a cellule differenziate necessarie per il turn-over tissutale, specie in tessuti danneggiati. Grazie alla loro plasticità, esse potrebbero rappresentare il soggetto privilegiato di nuove strategie terapeutiche per indurre la rigenerazione dei miocardiociti e, di conseguenza, il miglioramento della performance cardiaca nel cuore danneggiato.

Le cellule staminali embrionali possono differenziarsi in miocardiociti e potrebbero rappresentare una risorsa illimitata di cellule trapiantabili per la riparazione miocardiocitaria. Queste cellule, però, sono tumorigeniche per definizione e, inoltre, data la loro origine allogenica, potrebbero causare fenomeni di rigetto nel soggetto ricevente. A queste problematiche di carattere scientifico, bisogna anche aggiungere i problemi etici che l'uso delle cellule embrionali comporterebbe. Un diverso approccio è stato utilizzato da altri gruppi di studio che hanno trapiantato cellule staminali residenti nel tessuto muscolare scheletrico. Alcuni studi hanno mostrato una differenziazione di tali cellule in miocardiociti (3) e un miglioramento della performance cardiaca quando essi sono iniettati in pazienti con insufficienza cardiaca (4). Comunque non è chiaro se l'aumento di contrattilità osservata è diretta conseguenza della contrazione dei mioblasti inoculati oppure delle procedure di rivascolarizzazione effettuate contestualmente al trapianto cellulare. Un problema cruciale è rappresentato dal fatto che i mioblasti poiché non sviluppano la connessina 43 e le gap junctions, pur contraendosi, rimangono indipendenti dai miocardiociti vicini. Questo fenomeno potrebbe potenzialmente essere causa di aritmie e infatti tutti i pazienti dello studio condotto da Menasche erano stati sottoposti a impianto di (Implantable Cardioverter Defibrillator).

Altri autori hanno descritto la formazione di miocardiociti a partire da cellule staminali originate dal midollo osseo. In realtà non è ancora chiaro quale frazione cellulare sia responsabile del fenomeno. Indipendentemente dal tipo cellulare utilizzato, comunque, la maggior parte degli studi ha mostrato un miglioramento della funzione cardiaca nel periodo post-infarto nei gruppi trattati rispetto ai controlli non trattati.

Non è ancora chiaro quanto questi risultati preliminari dipendano dal trapianto di cellule staminali ma lo studio AMI-REPAIR e il più recente TOPCARE-CHF trial dovrebbero chiarire l'importanza di tale approccio terapeutico nell'infarto del miocardio e nell'insufficienza cardiaca rispettivamente.

Lo studio AMI-REPAIR (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells And Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction) ha valutato gli effetti del trasporto intracoronarico delle cellule progenitrici dopo intervento coronarico percutaneo (PCI) per infarto miocardico con soprasslivellamento ST. Lo studio ha riguardato 204 pazienti di 17 centri in Germania ed in Svizzera. Dopo prelievo del midollo osseo, i pazienti sono stati assegnati in modo casuale a ricevere un'infusione intracoronarica, nell'arteria associata all'infarto, di cellule progenitrici mononucleari autologhe (gruppo Bone Marrow Cells) oppure placebo, 3-6 giorni dopo l'infarto miocardico acuto. L'end point primario era rappresentato dall'aumento assoluto della frazione di eiezione ventricolare sinistra. La frazione d'eiezione è risultata più alta in entrambi i gruppi a 4 mesi rispetto al basale, ma l'aumento è risultato più alto nel gruppo BMC rispetto al gruppo placebo (5.5% versus 3%; $p = 0.014$). Inoltre, i pazienti trattati entro 5 giorni dal loro infarto miocardico acuto non hanno mostrato alcun beneficio con l'infusione di cellule del midollo osseo rispetto al placebo, mentre i pazienti trattati dopo 5 giorni hanno mostrato un significativo aumento della frazione d'eiezione (7% versus 1.9%; $p = 0.004$). Sebbene lo studio non abbia il potere statistico per individuare una differenza negli end point clinici, un trend verso una riduzione dell'end point composito di morte, infarto miocardico, o rivascolarizzazione ripetuta è stata osservata nel gruppo BMC (21% versus 30%; $p = 0.17$).

Lo studio AMI-REPAIR, pertanto, ha dimostrato che l'infusione intracoronarica delle cellule mononucleari del midollo osseo nei pazienti dopo infarto miocardico acuto ha migliorato la funzione ventricolare sinistra a 4 mesi. Il miglioramento della funzione ventricolare sinistra è risultato maggiore nei pazienti con minore frazione d'eiezione ventricolare sinistra al basale ed in quelli trattati 5

giorni dopo l'infarto miocardico. Il trattamento con cellule del midollo osseo è stato considerato sicuro ed associato ad un trend verso una riduzione degli eventi cardiovascolari maggiori (5).

Il TOPCARE-CHF non ha ancora fornito risultati definitivi sull'utilità delle cellule staminali nell'insufficienza cardiaca anche se i risultati preliminari sembrerebbero dimostrare un lieve miglioramento nei pazienti arruolati con conseguente riattribuzione degli stessi a una nuova classe della classificazione New York Heart Association (NYHA).

Uno studio pubblicato su Herz nel 2002 (6) avanzava l'ipotesi di un contributo positivo nell'attenuazione dell'ischemia miocardica da parte di un altro tipo di cellula staminale, le progenitrici di cellule endoteliali (EPC). Queste non solo sono coinvolte nella riendotelizzazione di lesioni vascolari (meccanismo potenziato dall'azione delle statine) ma è possibile che, attraverso un processo di transdifferenziazione, possano contribuire alla rigenerazione miocardica. Quest'ultima è però soltanto una supposizione dato che tale transdifferenziazione, in vivo, non è stata mai dimostrata e di conseguenza è, al momento, impossibile stabilire se il suddetto contributo positivo da parte delle EPC sia soltanto causato dalla riendotelizzazione delle lesioni coronariche. Il filone di ricerca più recente, sulla scia dei lavori di Anversa, Beltrami e altri co-Autori focalizza l'attenzione sull'esistenza di cellule staminali residenti nel cuore adulto e capaci di proliferare e differenziarsi in miocardiociti.

In particolare, il gruppo di studio del Prof. G. Zummo del Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Palermo ha isolato cellule dall'aspetto simile a fibroblasti da cuore di ratto adulto (7). Lo studio immunocitochimico ha dimostrato che tali cellule, tutte c-Kit positive, non presentano le caratteristiche morfologiche dei miocardiociti adulti. L'espressione dell' α -actina del muscolo liscio e del GATA4 suggeriscono l'ipotesi di precursori, cioè cellule indifferenziate con orientamento cardiaco in uno stato di differenziazione intermedio. Una volta inserita in coltura questa popolazione cellulare in un gel di collagene di tipo I, già dopo 72 ore era visibile una piccola massa omogenea. Tale popolazione c-Kit positiva ha altresì

mostrato un interessante potenziale angiogenetico. Queste cellule mostrano alcuni markers comuni ad altre cellule staminali isolate in precedenza dal miocardio adulto (8-13). Oltre i suddetti c-Kit e GATA-4, sono espressi alcuni markers cardiospecifici come la Connexina 43 e la troponina T. Sono anche rilevabili alti livelli di CD9, Nestina, Taubenuss, Nanog e Oct-4, proteine e fattori di regolazione altamente espressi in cellule staminali. In ultima analisi, è stata messa a confronto la suddetta popolazione di cellule staminali cardiache (CSC) c-Kit positive con precursori di cellule endoteliali e con cellule staminali mesenchimali. Queste ultime due popolazioni sono state studiate e caratterizzate per la capacità di modificare l'efficienza del miocardio dopo un infarto indotto in modelli sperimentali e per la somiglianza fenotipica con le CSC c-Kit pos. Le CSC e le MSC differiscono dalle EPC per la presenza di due antigeni di superficie, CD31 e CD34. In realtà, questi due antigeni, come dimostrano alcuni studi, sono presenti in colture di CSC solo nelle prime tre settimane mentre le EPC isolate dal midollo o dal sangue periferico li esprimono anche dopo cinque settimane (14).

I dati in possesso del gruppo di ricerca di Palermo, invece, evidenziano una stretta somiglianza tra le CSC e le MSC ossia quelle rare cellule presenti nel midollo osseo e capaci di differenziarsi, in vivo e in vitro, in osso, cartilagine, muscolo scheletrico e cardiaco, tessuto adiposo e connettivo (15). L'unica differenza tra le due popolazioni che emerge dai nostri studi è la densità al Percoll (maggiore di 1,073 g/ml per le MSC e compresa tra 1,030 e 1,040 g/ml per le CSC).

Conclusioni

Nonostante i progressi nella terapia delle malattie cardiache, quali ad esempio l'infarto del miocardio, l'insufficienza cardiaca e le cardiomiopatie, l'incidenza di morbilità e mortalità rimane purtroppo ancora troppo alta. In particolare, la disfunzione ventricolare sinistra post-infartuale rimane un problema che condiziona fortemente la qualità della vita dei soggetti infartuati.

Pertanto, l'individuazione e l'isolamento di precursori indifferenziati di cellule muscolari cardiache potrebbe

rappresentare il primo passo per nuove strategie terapeutiche per le malattie cardiovascolari. Infatti, la possibilità di indurre un rimodellamento della parete cardiaca a partire da cellule staminali residenti nel miocardio, grazie all'utilizzo di vettori che ne inducano il differenziamento, è il target attuale di numerosi gruppi di ricerca nel mondo e oggi il progresso delle conoscenze scientifiche e tecniche lasciano intravedere il raggiungimento di questo obiettivo in tempi non lontani. Altro fondamentale target da perseguire è l'individuazione di segnali di "spegnimento" della proliferazione delle cellule staminali perché senza questi l'unico risultato sarebbe la proliferazione incontrollata con formazione di masse tumorali.

BIBLIOGRAFIA

1. Schluter KD, Piper HM: Regulation of growth in the adult cardiomyocytes. *FASEB J* 1999; 13:S17-22.
2. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato M, 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; 344:1750-7.
3. Iijima Y, Nagai T, Mizukami M, Matsuura K, Ogura T, Wada H, et al: Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes. *FASEB J* 2003; 17:1361-3
4. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357:279-80.
5. Mocini D, Staibano M, Mele L, Giannantoni P, Menichella G, Colivicchi F, Sordini P, Salera P, Tubaro M, Santini M: Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Clinical investigation. Am Heart Journal* 2006; 151:192-197
6. Walter DH, Dimmeler S: Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz* 2002; 27:579-88.
7. Di Felice V, Ardizzone NM, Montalbano A, De Luca A, Minervini F, De Luca A, Cappello F, Zummo G: Characterization of c-kit positive cardiac stem cells subpopulations obtained from adult rat myocardium. *Proceedings of "EuroStemCell International Conference: Advances in Stem Cell Research" 8-10 September 2006, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland, in press 2006*
8. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker

M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114:763-776.

9. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ: Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; 265:262-275.

10. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I: Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:11384-11391.

11. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, Torella D, Tang XL, Rezazadeh A, Kajstura J, Leri A, Hunt G, Varma J, Prabhu SD, Anversa P, Bolli R: Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:3766-3771.

12. 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; 433:647-653.

13. 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; 95:911-921.

14. Wagner SJ, Myrup AC: Toward closed-system culture of blood origin endothelial cells. *Transfusion* 2005; 45:1201-1207.

15. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M: Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:462-471.