

Terapia cellulare e aritmie: il punto della situazione

Anna Vittoria Mattioli

Laboratorio di Ricerca Avanzata, Cattedra di Cardiologia, Istituto Nazionale di Ricerche Cardiovascolari,
Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

Key words:
Arrhythmia;
Cell therapy;
Gene therapy.

Cell therapy is an adjunctive treatment to improve left ventricular function after myocardial injury. Multiple cell types have been tested experimentally in animal models of myocardial disease, with functional improvement as the primary endpoint. Regarding safety, the major concern has been that cell transplantation could generate an arrhythmogenic substrate as reported in clinical studies using myoblasts. The mechanism of these transplantation-related arrhythmias remains elusive but the cellular heterogeneity, resulting from differences in electrical membrane properties between recipient/donor cells, could provide a substrate for reentry circuits. The knowledge achieved from experimental studies on the substrate of arrhythmias in cell therapy gives useful information that could be translated into the development of a biological pacemaker or a non-pharmacological approach to atrial fibrillation.

Limitations of current pharmacological and catheter ablation options to achieve rate control in patients with atrial fibrillation have motivated new strategies of cell therapy for non-pharmacological rate control without producing high-degree atrioventricular block. Although several issues remain to be addressed, some aspects of cell therapy are likely to be translated into clinical practice.

(G Ital Cardiol 2008; 9 (4): 251-261)

© 2008 AIM Publishing Srl

Ricevuto il 26 luglio
2007; nuova stesura l'8
ottobre 2007; accettato
il 9 ottobre 2007.

Per la corrispondenza:

Prof. Anna Vittoria Mattioli

Laboratorio di
Ricerca Avanzata
Cattedra di Cardiologia
Istituto Nazionale
di Ricerche Cardiovascolari
Università degli Studi
di Modena e Reggio Emilia
Via del Pozzo, 71
41100 Modena
E-mail:
annavittoria.mattioli@
unimore.it

Premesse

Il presupposto sul quale si basa la terapia cellulare è che cellule esogene impiantate in un tessuto ammalato possono migliorare la funzione del tessuto sostituendo le cellule native che sono state distrutte. I risultati promettenti ottenuti nei pazienti diabetici e nel morbo di Parkinson hanno incoraggiato la ricerca in tale senso^{1,2}. Tuttavia, l'efficacia di questa tecnica dipende da una serie di condizioni fondamentali: le cellule trapiantate devono giungere nel tessuto in quantità sufficiente, ma soprattutto devono integrarsi nel tessuto ospite e non determinare effetti collaterali, *in primis* la proliferazione cellulare non controllata. Nel caso del tessuto cardiaco sappiamo che la capacità rigenerativa dei cardiomiociti è molto limitata, tale da non poter compensare la perdita di un numero elevato di cellule cardiache come avviene nell'infarto miocardico esteso nonostante studi recenti abbiamo suggerito la presenza di cellule staminali residenti a livello cardiaco^{3,4}. I tentativi della terapia genica di trasformare il tessuto necrotico in tessuto miocardico attivo sono promettenti *in vitro*, ma incontrano difficoltà nell'applicazione clinica, così si è sviluppata l'idea che la terapia cellulare possa

rapresentare una valida opportunità di rigenerazione del cuore⁵.

Gli attuali obiettivi della terapia cellulare sul cuore mirano ad ottenere un aumento del tessuto muscolare con conseguente incremento della massa e della contrattilità cardiaca⁶.

I benefici della terapia cellulare in campo cardiovascolare sono potenzialmente numerosi: le cellule staminali autologhe o allogeniche possono essere utilizzate per sostituire tessuto miocardico necrotico o cicatriziale con tessuto contrattile, in zone aneurismatiche o infartuali, per ripopolare la popolazione cellulare nei cuori con insufficienza cardiaca, per sostituire miocardio aritmico con tessuto in grado di produrre attività elettrica organizzata⁷. La terapia cellulare del miocardio può essere effettuata con due diversi metodi: il trapianto cellulare e la mobilizzazione delle cellule.

Il punto cruciale è la scelta del tipo di cellula che meglio si adatta alle condizioni ambientali del miocardio o che è in grado di transdifferenziare in cardiomiocita. Possono essere utilizzati i mioblasti scheletrici, le cellule staminali estratte da midollo osseo, cellule embrionali, cardiomiociti fetali, cellule staminali adulte e progenitori cellulari endoteliali e cellule staminali cardia-

che residenti. I primi due sono quelli più comunemente utilizzati negli studi clinici sull'uomo. Le cellule staminali embrionali sono oggetto di dibattito etico e pertanto vengono utilizzate limitatamente alla ricerca di base. La terapia cellulare cardiaca agli esordi ha utilizzato i mioblasti scheletrici derivati da cellule satellite muscolari scheletriche⁸. La scelta di questo tipo di cellule si basava sulla biodisponibilità, sull'abilità a proliferare e a migrare in zone ischemiche. In realtà, si è visto che tali cellule non si differenziano in senso cardiomiocitico, ma si localizzano nel muscolo cardiaco come cellule muscolari scheletriche mature, pur essendosi osservati eventi di fusione tra le cellule^{9,10}. Inoltre, i fibromiocytes non sono in grado di esprimere le proteine delle *gap junction* e di conseguenza di formare giunzioni elettromeccaniche con i cardiomiocytes quando trapiantate nel cuore. Alla ricerca di cellule in grado di transdifferenziare in cardiomiocytes e grazie a risultati promettenti sull'angiogenesi, sono proliferati gli studi su cellule provenienti da midollo osseo. Le cellule midollari includono un pool eterogeneo di cellule che contiene sia staminali ematopoietiche sia staminali mesenchimali oltre ad un ampio numero di cellule progenitrici indifferenziate. Diversamente dalle cellule scheletriche che sono state testate nella cardiopatia ischemica cronica, le cellule midollari ossee sono state maggiormente somministrate nell'infarto miocardico acuto. Nella valutazione dei risultati clinici, peraltro molto incoraggianti in termini di riperfusione e funzione ventricolare, diventa difficile discriminare il ruolo della terapia cellulare rispetto ai benefici che si ottengono con la terapia acuta dell'evento mediante angioplastica coronarica o bypass^{11,12}.

Le cellule che meglio rispondono alle aspettative di transdifferenziazione sono le cellule embrionali che tendono a differenziarsi in cardiomiocytes. Diversi ricercatori hanno dimostrato la capacità di cardiomiocytes fetali o neonatali di formare nuovo tessuto miocardico in cuori ischemici^{13,14}. L'entusiasmo iniziale per questi risultati si è in seguito raffreddato quando, dopo trapianto, sono state rilevate ampie aree di morte cellulare a fronte di una limitata proliferazione cellulare, tale da rigenerare solo piccole zone di miocardio^{15,16}. Tuttavia, da un punto di vista clinico, diversi tipi cellulari, inclusi fibroblasti e cellule muscolari lisce, che non possono contrarsi in sincizio con i cardiomiocytes, hanno dimostrato di migliorare la funzionalità del cuore sofferente^{17,18}.

Questi studi suggeriscono un meccanismo di riparazione cellulare che non sarebbe dipendente dalla transdifferenziazione in cardiomiocytes. Un'ipotesi ulteriore suggerisce l'esistenza di un'"azione paracrina", conseguente alla capacità delle cellule trapiantate di produrre fattori di crescita, citochine e altre molecole ad azione locale. Le attuali conoscenze sul meccanismo di azione di queste sostanze sono molto scarse e si ipotizzano un effetto dovuto all'aumentata perfusione conseguente ad angiogenesi, l'aumento del tessuto connetti-

vale nella zona infartuale tale da limitare la dilatazione del ventricolo e un'azione di stimolo sui miocytes o altre cellule vitali. Sono in corso diversi studi volti ad identificare possibili vie di segnale paracrina che possono contribuire ad aumentare la performance ventricolare.

Uno degli obiettivi della terapia cellulare cardiaca è identificare le strategie per ottimizzare la localizzazione delle cellule nella zona interessata e migliorare la sopravvivenza delle stesse attraverso meccanismi di angiogenesi e prevenzione della morte cellulare⁸. I trial clinici hanno coinvolto popolazioni di pazienti alquanto varie inclusi i soggetti con insufficienza cardiaca severa e pazienti con infarto miocardico non complicato. Uno dei punti cruciali nelle sperimentazioni cliniche è la sicurezza della terapia cellulare in rapporto alle aritmie⁸.

Per comprendere il meccanismo fisiopatologico alla base delle aritmie indotte da cellule staminali è opportuno ricordare brevemente come avviene la normale differenziazione cellulare durante lo sviluppo embrionale e come tale percorso sia modificato nello sviluppo di cardiomiocytes da staminali secondo il tipo di cellula originale e l'ambiente nel quale si svolge.

Il potenziale d'azione cellulare nella fase di sviluppo embrionale

Proprietà elettrofisiologiche dei cardiomiocytes fetali

Lo sviluppo del cuore dal mesoderma precardiaco coinvolge una serie di passaggi di differenziazione cellulare e di modificazioni morfologiche che si accompagnano a variazioni dell'attività elettrica dei miocytes cardiaci. Lo sviluppo dell'attività elettrica e meccanica spontanea si osserva per la prima volta nel cuore dopo la comparsa del tubo cardiaco lineare (o miocardio primario). Potenziale di azione di cellule pacemaker è stato registrato già durante le primissime fasi di sviluppo in un modello animale e successivamente anche in cellule staminali embrionali umane^{19,20}. È ben noto che il potenziale di azione delle cellule cardiache si differenzia in base alla diversa funzione cellulare (Figura 1). La forma del potenziale di azione è il risultato di un'attivazione ordinata e sequenziale di diverse correnti ioniche. Durante lo sviluppo embrionale del cuore l'espressività dei diversi tipi di canali ionici si manifesta secondo una precisa sequenza cronologica fino all'assetto fenotipico dell'elettrofisiologia cellulare dell'adulto. Il nodo seno-atriale possiede tre correnti depolarizzanti, tra le quali quella responsabile delle fase di ascesa lenta è in gran parte calcio-dipendente. Le cellule atriali, le fibre del Purkinje e i miocytes ventricolari hanno una fase iniziale di depolarizzazione molto più rapida e sodio-dipendente. La conduzione elettrica dell'impulso subisce, inoltre, un rallentamento a livello del nodo atrioventricolare che è per lo più calcio-dipendente.

I pochi dati disponibili sul potenziale di azione nel cuore umano embrionale e fetale suggeriscono che in-

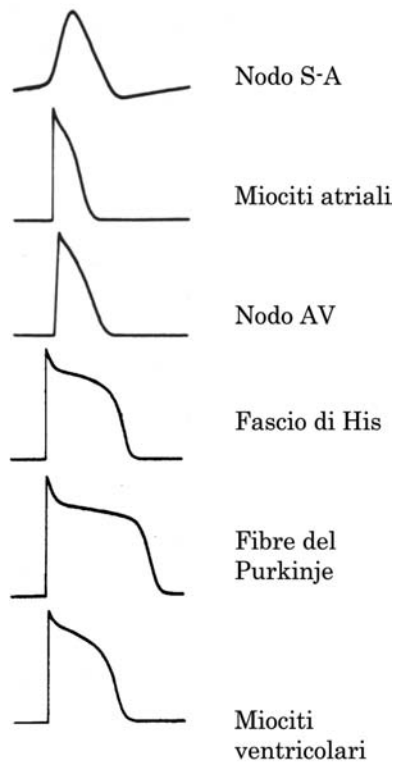


Figura 1. Andamento del potenziale di azione nelle diverse componenti cellulari cardiache. AV = atrioventricolare; S-A = seno-atriale.

torno alla settima-ottava settimana di sviluppo il potenziale di membrana a riposo e il dV/dt_{max} dei miociti atriali e ventricolari diventa simile a quello delle cellule adulte^{21,22}.

Proprietà elettrofisiologiche dei cardiomiociti adulti

Analizzando il potenziale di azione delle diverse cellule cardiache adulte si osserva che nelle cellule contrattili, non dotate di automaticità, la quantità di potassio che a riposo esce dalla cellula è uguale a quella che entra grazie alla pompa del sodio, pertanto l'equilibrio ionico è mantenuto e il potenziale di azione è stabile. Nelle cellule pacemaker che costituiscono il nodo seno-atriale, il nodo atrioventricolare, il fascio di His e le fibre del Purkinje, la quantità di potassio che esce dalla cellula diminuisce lentamente durante la diastole determinando un accumulo intracellulare di potassio con aumento del potenziale di azione che diventa meno negativo: lenta fase di depolarizzazione che è responsabile dell'automatismo delle cellule pacemaker.

In fase di riposo le cellule cardiache sono polarizzate con carica positiva sulla superficie esterna della membrana cellulare e carica negativa sulla superficie interna. La differenza di potenziale, che dipende dal trasporto attivo degli ioni, varia da -65 mV del nodo del seno, a -65 mV del nodo atrioventricolare, a -80 mV delle cellule atriali e ventricolari, a -95 mV delle fibre del Pukinje. La differente permeabilità di membrana agli ioni determina cinque diverse fasi del potenziale di azione. La fase 1 dipende da una rapida caduta della

conduttanza al sodio e da un breve aumento della conduttanza al cloro. La fase 2 si caratterizza per una riduzione della conduttanza al potassio e per una corrente lenta di calcio verso l'interno della cellula.

La fase 3 dipende da un'elevata conduttanza al potassio in seguito alla chiusura dei canali lenti. Nella fase 4 si registra una fuoriuscita di sodio attraverso scambio con il potassio. È in questa fase che si differenzia il potenziale di azione delle cellule dotate di automatismo (Figura 2). La corrente di potassio nelle cellule segnapassi si esaurisce rapidamente con una depolarizzazione diastolica raggiungendo rapidamente il potenziale soglia. In particolare nelle cellule pacemaker l'inattivazione della corrente in uscita di potassio (I_{K2}) è il fattore maggiormente responsabile della fase di depolarizzazione lenta diastolica, funziona contemporaneamente alla I_{K1} fino alla base del plateau ed è distinta dalla I_{X1} attiva nella fase successiva. Durante tale fase si osserva anche un aumento della corrente di ingresso del sodio. Il nodo del seno, a differenza delle fibre del Purkinje, lavora a livelli di potenziale di riposo e di potenziale soglia più elettropositivi e la fase 4 dipende più dalla corrente del calcio che non da quella del sodio (Figura 3).

La depolarizzazione delle cellule del nodo del seno inizia a partire da livelli di potenziale di membrana pari a -65 mV; quando il potenziale arriva a -40 mV, la cellula si depolarizza. Nell'intervallo tra -65 e -40 mV si ha l'attivazione delle correnti del calcio T (transiente) e successivamente L. I canali del calcio T sono attivati per livelli di voltaggio più negativi, la corrente T è responsabile per lo più della fase precoce della seconda metà della depolarizzazione lenta diastolica²³. L'elettrofisiologia sperimentale consente di identificare due tipi di risposta elettrica cellulare: risposta rapida e risposta lenta. Le fibre ad attività o risposta rapida sono le cellule atriali e ventricolari contrattili e di conduzione, sono caratterizzate da un potenziale di membrana a riposo da -80 a -95 mV, da una depolarizzazione I_{Na} -dipendente e da una rapida velocità di conduzione. Le fi-

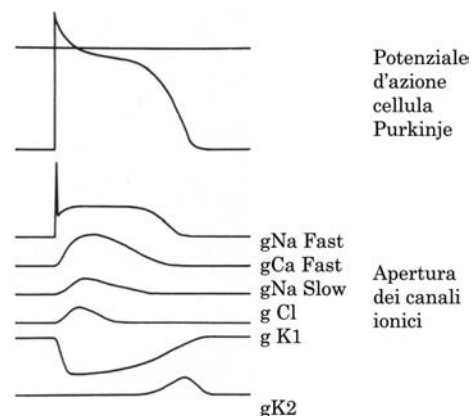


Figura 2. La figura rappresenta taluni canali ionici in rapporto al potenziale di azione. gCa = conduttanza al calcio; gCl = conduttanza al cloro; gK = conduttanza al potassio; gNa = conduttanza al sodio.

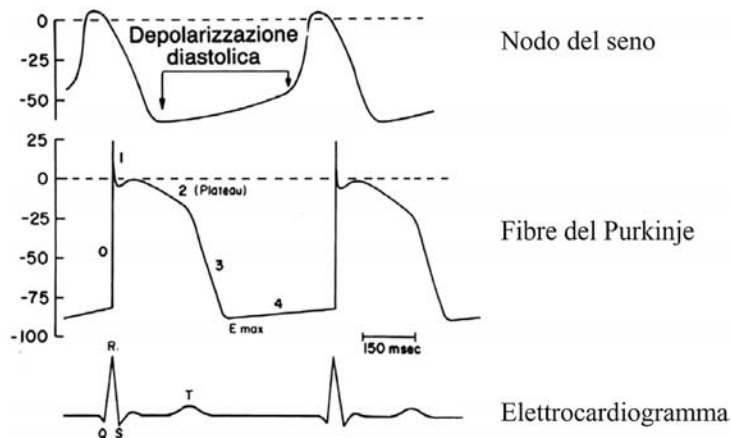


Figura 3. Potenziale transmembrana registrato a livello del nodo del seno e delle fibre del Purkinje: sono evidenti le diverse fasi del potenziale d'azione e la fase di plateau nelle cellule del Purkinje.

bre ad attività lenta sono quelle del nodo seno-atriale, del nodo atrioventricolare, del seno coronarico e altri piccoli nuclei di cellule e sono caratterizzate da un più basso potenziale di membrana a riposo di -60 mV, da una più lenta velocità di depolarizzazione che non è dipendente dall' I_{Na^+} , da una più bassa ampiezza e da una più lenta velocità di conduzione.

Elettrofisiologia delle cellule miocardiche originate da cellule staminali embrionali

La progressione di sviluppo dei cardiomiociti originati da cellule embrionali umane non è del tutto nota. I cardiomiociti che originano da cellule embrionali umane mostrano la presenza di canali del sodio già durante fasi precoci dello sviluppo (30-35 giorni), mentre la corrente legata ai canali del potassio I_{K1} , che controlla l'ultima fase di ripolarizzazione del potenziale e la fase diastolica non è funzionalmente espressa²⁴. In tali cellule i canali ionici del potassio K_1 sono funzionalmente presenti, ma presentano una bassa espressione funzionale che le rende simili alle cellule del nodo seno-atriale²⁵. Nei cardiomiociti derivati da cellule embrionali i canali del potassio K_r sembrano controllare la fase di ripolarizzazione.

Il flusso in entrata del sodio attraverso i canali f è fondamentale per l'attività del ritmo spontaneo delle cellule pacemaker e per il controllo dell'automatismo. I canali f del sodio subiscono cambiamenti durante lo sviluppo delle cellule embrionali umane nei cardiomiociti e la cinetica di attivazione dei canali f rallenta nello stadio più avanzato di sviluppo²⁰. A riprova di ciò l'isoforma HCN1, che ha la cinetica di attivazione più rapida, è maggiormente espressa nelle cellule embrionali e si riduce significativamente durante la differenziazione in cellula cardiaca²⁰.

I canali del calcio di tipo L sono tra i canali ionici più precoci nei cardiomiociti in fase di sviluppo e si aprono più prontamente per livelli di voltaggio prossimi allo zero^{26,27}. Durante le successive fasi di sviluppo inizia la specializzazione in tipi differenti di cardio-

miociti. Il potenziale di membrana a riposo diventa progressivamente sempre più negativo nello sviluppo dei cardiomiociti atriali e ventricolari, il che correla con una progressiva presenza di I_{K1} ²⁶. La graduale comparsa di *upstroke* rapido del potenziale di azione, caratteristica dei miociti atriali e ventricolari, corrisponde ad una crescente densità di canali ionici del sodio²⁸, fino a giungere al potenziale di azione simile a quello dei miociti atriali e ventricolari, stabile a riposo con scarsa automaticità e *upstroke* molto rapido²⁴. *In vitro* il profilo elettrofisiologico e molecolare dei cardiomiociti derivati dalle staminali embrionali diventa simile a quello del fenotipo adulto dopo 3 mesi di coltura²⁰.

Le cellule staminali embrionali possono dare origine a corpi embrionali dotati di contrattilità spontanea. Questi corpi embrionali contengono cardiomiociti identificabili in base all'espressività di geni cardiospecifici e all'attività elettrica. Negli ultimi anni sono stati registrati grandi progressi nell'isolare i cardiomiociti nei nuclei di cellule embrionali. Studi condotti su cellule embrionali staminali di topo hanno permesso di identificare e caratterizzare diversi tipi di cellule miocardiche: cellule nodali, cellule atriali e ventricolari e cellule del Purkinje²⁹. Gli agglomerati di cellule presentano una morfologia del potenziale di azione prevalente, ma contengono una popolazione cellulare eterogenea di cardiomiociti. Potenzialmente, il pretrattamento *in vitro* con diverse sostanze potrebbe favorire lo sviluppo di cellule più mature e specializzate, come si è visto in uno studio su cellule murine il trattamento con endotelina-1 favorisce la differenziazione verso cardiomiociti tipo cellule del Purkinje³⁰.

L'identificazione del tipo di cellula è fondamentale per l'utilizzo clinico delle terapie cellulari. Lo studio del potenziale di azione cellulare consente di differenziare cellule di cardiomiociti sviluppatasi da cellule embrionali in simil-nodali, simil-atriali embrionali e simil-ventricolari embrionali. In base all'espressività dei canali ionici la cellula può comportarsi come simil-nodale o simil-ventricolare e questo costituisce il presup-

posto per la terapia genica e cellulare. In un modello animale la somministrazione di terapia genica e in particolare del gene che codifica per il canale HCN2 ha trasformato cardiomiociti in cellule dotate di depolarizzazione diastolica spontanea, gettando le basi per la generazione di un pacemaker biologico³¹.

Le aritmie come complicanza della terapia cellulare

Uno degli interrogativi che ci si pone è se le cellule staminali trapiantate nel cuore possono indurre aritmie^{7,8}. L'effetto aritmogeno è emerso inizialmente da studi *in vitro* su cardiomiociti derivati da cellule embrionali. L'attività elettrica spontanea dei nuclei cellulari era caratterizzata da un prolungamento del potenziale di azione delle cellule e dalla facile inducibilità di aritmie in risposta a stimoli specifici³².

Xue et al.³³ hanno dimostrato che i cardiomiociti derivati da cellule embrionali si possono integrare funzionalmente con il tessuto ricevente e possono stimolarlo attivamente sia *in vitro* sia *in vivo* e che le cellule esogene trapiantate possono guidare elettricamente il miocardio circostante. L'onda di depolarizzazione, misurata nel cuore delle cavie mediante tecnica di mappatura ottica ad alta risoluzione, trae origine dalle cellule trapiantate.

Analogamente ai risultati ottenuti con l'iniezione di cardiomiociti derivati da cellule staminali embrionali nel cuore di ratti³⁴, l'iniezione nel cuore di cavie da laboratorio non ha provocato fenomeni aritmici durante l'esperimento, probabilmente perché l'attività pacemaker dei cardiomiociti derivati da cellule embrionali è stata sovrastata dalla frequenza cardiaca propria del cuore degli animali che era da 2 a 3 volte più veloce. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per analizzare il profilo elettrofisiologico delle cellule cardiache derivate da staminali embrionali. Ad esempio, è possibile che il rimodellamento elettrico tempo-dipendente, che influenza l'espressione dei canali ionici e la durata del potenziale di azione, possa portare alla comparsa di aritmie³².

Pak et al.³⁵, somministrando cellule staminali mesenchimali (MSC) *in vivo* durante un esperimento controllato con maiali, hanno evidenziato un rischio proaritmico dopo trapianto cellulare legato alla proliferazione con distribuzione disomogenea di terminazioni nervose simpatiche. Amado et al.³⁶ non hanno osservato fenomeni di morte improvvisa in maiali dopo iniezione intramiocardica di MSC. Tuttavia, gli autori non hanno effettuato un monitoraggio elettrocardiografico e lo studio elettrofisiologico e non sono stati in grado di quantificare il grado di integrazione tra le cellule. Studi di fase 1 nell'uomo mediante trapianto di mioblasti scheletrici hanno sottolineato l'importanza di una corretta determinazione del rischio aritmico prima dell'uso delle cellule nell'uomo. Il problema aritmico si è

presentato *in vivo* durante sperimentazione con fibroblasti scheletrici iniettati nella zona di miocardio infartuato durante intervento di bypass aortocoronarico da Menasche et al.³⁷. Durante il follow-up 4 pazienti su 10 hanno sviluppato tachicardia ventricolare sostenuta e sono stati trattati con impianto di defibrillatore. I mioblasti scheletrici in coltura esprimono le proteine necessarie per la formazione e la funzione delle *gap junction* e quando messi in cocoltura con i cardiomiociti riescono a contrarsi simultaneamente. Tuttavia, nel momento in cui i mioblasti formano miotubuli l'espressione delle proteine delle *gap junction* diminuisce e i miotubuli trapiantati risultano funzionalmente isolati dal miocardio adiacente. Così che la zona trapiantata è funzionalmente contrattile ed eccitabile, ma elettricamente non accoppiata con i cardiomiociti^{38,39}. Una delle ipotesi è che tale non accoppiamento costituisca la base di un fenomeno di rientro.

Meccanismo di rientro

Il fenomeno di rientro può essere anatomico o funzionale. Si parla di rientro anatomico quando la rotazione dell'impulso avviene intorno ad un ostacolo fisso quale, ad esempio, il tessuto cicatriziale. Il rientro funzionale avviene, invece, in presenza di tessuto omogeneo e prende la forma di una spirale di Archimede che ruota intorno ad un centro eccitabile, ma non eccitato.

Diverse osservazioni suggeriscono che il rientro osservato nella somministrazione di cellule staminali sia per lo più funzionale^{40,41}. Le traiettorie del rientro mostrano pattern irregolari descritti in modelli sperimentali di cardiomiociti atriali e ventricolari. Analogamente sono stati osservati movimenti a spirale nei quali il rientro sembra spostarsi da una posizione ad un'altra, il fronte d'onda si muove in modo simile ad una spirale di Archimede⁴². La frequenza del rientro dipende dalla durata del potenziale di azione (refrattarietà del tessuto), dall'eccitabilità del tessuto, dalla curvatura del fronte dell'onda elettrica e dal *core* del rientro.

Una riduzione della durata del potenziale di azione può essere la conseguenza di un aumento del calcio intracellulare provocato dalla stimolazione ad alta frequenza che si verifica durante il rientro. L'aumento del calcio intracellulare aumenta l'eccitabilità nella regione della punta della spirale e può ridurre le dimensioni del *core* del rientro⁴³. Nei corpi embrionali sono stati osservati pattern complessi di propagazione dell'impulso che possono costituire il presupposto per fenomeni di rientro funzionale²⁹. In uno studio sperimentale su corpi embrionali derivanti da cellule staminali embrionali murine effettuato mediante mappaggio con multielettrodi è stata documentata una propagazione intermittente del potenziale di azione, che è stata attribuita ad una discrepanza di impedenza conseguente a discontinuità strutturale nella rete di connessione tra i cardiomiociti⁴⁴. La mancanza di un disegno geometrico organizzato nel tessuto produce un *mismatch* di corrente con rallentamento della conduzione, osservazione confermata

da studi su sistemi bidimensionali di miociti neonatali⁴⁵. Altri meccanismi che possono contribuire al fallimento nella propagazione dello stimolo elettrico sono la mancanza di trasmissione cellula-cellula attraverso le *gap junction* e la ridotta eccitabilità cellulare^{46,47}.

Esistono quindi i presupposti teorici per un meccanismo di rientro sia anatomico che funzionale. Una delle caratteristiche delle MSC è la capacità di formare *gap junction* sia tra loro sia con i miociti⁴⁸. Questa dote è stata utilizzata per generare aree dotate di attività pacemaker di automaticità focale ventricolare in modelli animali⁴⁹.

Il substrato aritmogenico è stato anche identificato in coculture di MSC e cardiomiociti nella ridotta velocità di conduzione che induce aritmie da rientro sostenute. L'aritmogenicità deriva dall'accoppiamento dei cardiomiociti con MSC non eccitabili⁵⁰. La ridotta velocità di conduzione nelle coculture sembra essere la conseguenza della natura "non eccitabile" delle MSC e della loro capacità di agire come stabilizzatori di corrente. Le MSC hanno un potenziale di membrana di circa -40 mV e possono depolarizzare parzialmente i miociti adiacenti e inattivare i canali del sodio riducendo così la velocità di conduzione. Fattori predisponenti alle aritmie da rientro sono la distribuzione eterogenea delle MSC e l'accoppiamento elettrico tra miociti eccitabili e MSC non eccitabili. Di conseguenza le MSC possono indurre l'inattivazione dei canali del sodio in modo eterogeneo.

Studi clinici e aritmie

La possibilità che le cellule trapiantate inducano aritmie è emersa dopo la segnalazione di episodi di tachicardia ventricolare nel trial francese³⁷. Il potenziale aritmogeno dei fibroblasti scheletrici è stato ampiamente dimostrato in diversi studi nell'uomo e su animali. Smits et al.⁵¹ hanno somministrato mioblasti scheletrici intramiocardici a 5 pazienti con insufficienza cardiaca avanzata a seguito di infarto miocardico in sede anteriore esteso. Uno dei pazienti ha riportato aritmie ventricolari tali da indurre l'impianto di defibrillatore automatico, mentre nei restanti 4 non sono state osservate aritmie ventricolari. Dib et al.⁵² hanno somministrato mioblasti scheletrici autologhi in 30 pazienti con cardiopatia ischemica cronica e frazione di eiezione <40% sottoposti a bypass aortocoronarico o ad impianto di dispositivo per assistenza ventricolare sinistra riportando episodi aritmici in 6 pazienti nella prima settimana successiva al trapianto cellulare. Nel gruppo sottoposto a bypass si sono sviluppati episodi di fibrillazione atriale in un paziente ed episodi di tachicardia ventricolare non sostenuta in un altro soggetto, entrambi successivamente trattati con farmaci antiaritmici. Due pazienti, uno sottoposto a bypass e l'altro a impianto di supporto ventricolare sinistro come ponte al trapianto cardiaco, hanno sviluppato episodi di tachicardia ventricolare sostenuta. All'analisi dell'Holter di uno di questi pazienti sono stati riscontrati episodi di ta-

chicardia ventricolare a complessi larghi, ritmo giunzionale intraventricolare e bigeminismo ventricolare, pertanto è stato sottoposto ad impianto di defibrillatore automatico. Un altro paziente ha sviluppato fibrillazione ventricolare. In un paziente già portatore di defibrillatore è stata rilevata l'attivazione dell'apparecchio, peraltro regolarmente funzionante, dovuta presumibilmente ad episodi di tachicardia ventricolare sostenuta⁵².

Uno studio successivo in fase I ha osservato un'incidenza di fenomeni aritmici nel 22% dei pazienti nella fase post-trapianto con mioblasti scheletrici e ha riportato una diminuzione dell'incidenza di aritmie ventricolari somministrando amiodarone a scopo profilattico⁵³.

Analizzando una recente rassegna degli studi condotti in Italia sulle cellule staminali emerge come l'applicazione clinica dell'uso delle cellule staminali sia rapidamente progredita a fronte di una messe di informazioni giunte da sperimentazioni *in vitro* e sull'animale. I gruppi che in Italia si stanno applicando a tale ricerca sono numerosi, tuttavia occorre sottolineare come ci siano ancora diversi punti da chiarire⁵⁴. L'applicazione all'uomo dei risultati ottenuti *in vitro* non è sempre così lineare e questo deve indurre a riflettere su quale sia l'attuale livello delle nostre conoscenze in merito alla terapia cellulare cardiaca⁶. L'utilizzo di cellule diverse (cellule embrionali, mioblasti scheletrici, cellule da midollo osseo adulto, cardiomiociti fetali, cellule staminali adulte e progenitori cellulari endoteliali) e di metodiche differenti per la somministrazione (iniezione intramiocardica, trapianto intracoronarico, iniezione transendocardica o transepicaardica) comporta che le informazioni non possano essere generalizzate. Le complicanze aritmiche vengono riportate in un numero limitato di studi clinici, tuttavia non è chiaro se tale mancanza sia legata ad un'interpretazione soggettiva degli autori, come nel caso della fibrillazione atriale. Appare strano che analizzando pazienti con infarto miocardico acuto o cardiopatia ischemica cronica o, a maggior ragione, insufficienza cardiaca su base ischemica, non vengano segnalati episodi di fibrillazione atriale. È possibile che gli autori considerino tale aritmia come un evento legato alla storia naturale della malattia più che come una complicanza della terapia cellulare. La ridotta incidenza di fenomeni aritmici nel trattamento con cellule staminali midollari può dipendere, inoltre, dal fatto che trattandosi perlopiù di studi di fase acuta i pazienti assumevano farmaci quali ad esempio i betabloccanti che hanno un'azione antiaritmica e che hanno mascherato o ridotto l'incidenza dei fenomeni aritmici. Inoltre, il riscontro di aritmie prevede un monitoraggio prolungato nel tempo essendosi osservato un picco a 7 giorni dalla somministrazione delle cellule⁵⁵.

Una delle ipotesi più suggestive suggerisce che l'effetto aritmico dipenda dalla modalità di somministrazione delle cellule. La somministrazione diretta nel miocardio, sia dall'approccio endocardico che epicar-

dico, può rilasciare le cellule direttamente nella zona interessata, tuttavia proprio tale metodo può causare un danno meccanico e un successivo fenomeno infiammatorio acuto^{56,57}. Inoltre, la somministrazione diretta nel tessuto può causare agglomerati di cellule isolate rispetto al miocardio ospite e tale eterogeneità cellulare può generare aritmie da rientro. Fukushima et al.⁵⁵ hanno dimostrato che la somministrazione diretta intramiocardica di cellule staminali da midollo osseo può determinare aritmie ventricolari nei primi 14 giorni. Al contrario, la somministrazione intracoronarica non provoca fenomeni aritmici pur determinando un analogo beneficio clinico.

La somministrazione intramiocardica di cellule midollari determina la comparsa di accumuli cellulari nella zona *border* al limite con il miocardio sano. Questi agglomerati di cellule composti da cellule trapiantate e cellule infiammatorie producono un'asimmetria nella regolare geometria delle cellule miocardiche determinando un disturbo nella conduzione elettrica. A ciò si aggiunge l'azione bioumorale delle cellule infiammatorie che determina una *upregulation* locale di varie citochine proinfiammatorie quali l'interleuchina-1 β e il fattore di necrosi tumorale. Di conseguenza, l'apoptosi dei cardiomiociti, la modulazione della formazione delle *gap junction* e il progressivo deterioramento della stabilità elettrica sembrano essere amplificati nella zona *border* da dove traggono origine i fenomeni aritmici⁵⁸. Poh et al.⁵⁹ in uno studio di efficacia e sicurezza hanno somministrato cellule mesenchimali allogene da midollo osseo in suini per via intramiocardica riportando battiti ectopici ventricolari ed episodi di tachicardia ventricolare non sostenuta associati al contatto del catetere e alle iniezioni transendomiocardiche. Gli autori sottolineano che non è stato necessario cardiovertire alcun animale e non è stato registrato alcun episodio di aritmia fatale e morte improvvisa.

Da rilevare che la maggior parte degli studi clinici non considera gli eventi aritmici come endpoint da valutare. Mancano poi studi volti ad identificare la comparsa di fenomeni aritmici come endpoint primario e quindi con appropriato monitoraggio delle aritmie. Sono inoltre necessari studi per differenziare le aritmie nate nel cuore malato da quelle originate dalle cellule somministrate.

La terapia cellulare per le aritmie

In tempi recenti è stata proposta la terapia cellulare per le aritmie, in particolare l'applicazione nel controllo della frequenza cardiaca in pazienti con fibrillazione atriale. Si tratta dei pazienti nei quali non è possibile ripristinare un ritmo sinusale e sono costretti ad un trattamento anticoagulante cronico che spesso si affianca a trattamenti volti a controllare la frequenza cardiaca, ciò al fine di migliorare la qualità della vita e di migliorare la funzione contrattile del ventricolo sinistro oltre che

prevenire la cardiomiopatia indotta da tachicardia⁵⁷. Tale approccio innovativo è motivato dagli attuali limiti della terapia farmacologica e delle complicanze dell'ablazione nel controllo della frequenza cardiaca. L'uso della terapia genica e del trasferimento cellulare per ricreare il nodo seno-atriale sta coinvolgendo diversi gruppi di ricerca.

La terapia genica viene utilizzata con successo in diversi campi, ma comporta una serie di problemi e i vettori utilizzati per il trasferimento sono sia la fonte che la potenziale risposta a questi problemi. Il vettore ideale dovrebbe evitare il sistema immunitario, consentire un'elevata efficienza di localizzazione nel tessuto bersaglio con un trasferimento genico irrilevante in altri tessuti e permettere l'espressione permanente del gene. Tale vettore ancora non esiste, ma è oggetto di intensa ricerca.

L'obiettivo di creare un pacemaker mediante terapia genica si basa sulla conversione di tessuto cardiaco preesistente più che sull'impianto di un "nuovo nodo". Appare evidente che è necessario lavorare con attenzione perché la creazione di pacemaker ectopici potrebbe determinare un battito caotico. L'obiettivo terapeutico è localizzare la trasduzione a livello dell'atrio.

Donahue et al.⁶¹ hanno utilizzato, *in vivo*, il trasferimento virale mediante adenovirus del gene *G α i2* (subunità β inibitoria della proteina G) somministrato per via transcaterale direttamente nell'arteria del nodo atrioventricolare per modificare l'attività del nodo atrioventricolare. Il presupposto era che l'eccesso di *G α i2* avrebbe dovuto mimare gli effetti degli antagonisti β -adrenergici creando un betablocco localizzato. La over-espressione del *G α i2* ha determinato 7 giorni dopo il trasferimento un allungamento dell'intervallo AH e del periodo refrattario effettivo del nodo atrioventricolare durante ritmo sinusale e una riduzione della frequenza cardiaca del 20% durante fibrillazione atriale acuta. Un successivo studio di follow-up ha confrontato il *G α i2* con un mutante attivo dello stesso (il *G α i2-Q205L*) in animali con fibrillazione atriale persistente e tachicardiomiopatia⁶². Il gene *G α i2* ha determinato una riduzione della frequenza cardiaca durante il sonno, al contrario il gene mutante ha determinato un controllo continuo della frequenza cardiaca, sufficiente a determinare la regressione della cardiomiopatia frequenza-dipendente⁶². Sono stati condotti altri studi di modificazione del nodo atrioventricolare mediante trasferimento genico di una proteina GEM che ha un effetto simile alla *G α i2*^{63,64}.

Questo studio è stato il primo ad applicare una strategia biologica al controllo della frequenza cardiaca durante fibrillazione atriale, sebbene la sua applicazione pratica sia fortemente limitata dalla temporanea espressività transgenica e da dubbi sulla sicurezza nell'uso di virus. L'uso di terapia genica o cellulare per ricreare il nodo seno-atriale è alla base di diverse strategie di manipolazione della frequenza cardiaca proposte da Edelberg. In due diversi studi Edelberg et al.^{65,66} hanno

iniettato DNA contenente il gene dei recettori β_2 -adrenergici trovando un 50% di aumento della frequenza cardiaca nel gruppo trattato. Tale aumento della frequenza cardiaca è stato osservato in uno studio solo il secondo giorno dall'iniezione e nell'altro studio solo il secondo e il terzo giorno.

In genere il trasferimento plasmidico determina effetti transitori, ma con una durata in genere di almeno 1-2 settimane. In questi studi la fugacità dell'effetto è atipica e indica la necessità di ulteriori approfondimenti.

Nel tentativo di creare *ex novo* un pacing cardiaco si è intervenuti sulle correnti ioniche, con inibizione della corrente I_{K1} e *upregulation* della corrente I_f . Miake et al.⁶³, mediante tecniche di trasferimento genico (gene Kir2.1 mutante con azione sui canali ionici KI) attraverso adenovirus, hanno dimostrato la capacità pacemaker "latente" di miociti ventricolari normalmente silenti che possono essere indotti a produrre attività spontanea⁶⁶. Tuttavia, l'automaticità indotta era circa 3 volte più lenta rispetto al normale e la soppressione del I_{K1} non era in grado di modulare direttamente il ritmo indotto. Qu et al.⁶⁸ hanno trovato un aumento dell'automaticità cellulare mediante trasferimento del gene per i canali HCN2. Risultati incoraggianti, ma non conclusivi.

L'uso delle cellule staminali per creare pacemaker è stato quindi esplorato da diversi ricercatori basandosi sull'idea che la complessità del pacemaker endogeno non possa essere adeguatamente riprodotta con metodi di semplice trasferimento genico⁶⁹. Ruhparwar et al.⁶⁹ hanno trapiantato miociti atriali fetali in cani con blocco atrioventricolare totale osservando un'automaticità limitata nel sito di iniezione delle cellule, risultato molto simile a quello ottenuto con il trasferimento genico. Kehat et al.⁷⁰ hanno somministrato nuclei di cellule embrionali spontaneamente contrattili derivati da cellule staminali embrionali umane osservando un'attività di pacing stabile nel 50% degli animali. Il dato è incoraggiante ma non è possibile pensare di trasferire sull'uomo una terapia che determina risultati positivi in metà dei casi trattati. Una strategia alternativa è stata utilizzata da Potapova et al.⁴⁹ che hanno testato cellule mesenchimali umane indifferenziate come veicolo alternativo per trasportare il gene HCN2 nel cuore. Poiché le cellule staminali umane embrionali hanno la capacità di differenziarsi in cardiomiociti, le cellule del nodo seno-atriale possono essere sostituite o integrate, almeno concettualmente, con cellule staminali embrionali differenziate in cardiomiociti.

Bunch et al.⁷¹ hanno testato in un modello canino l'efficacia dell'iniezione di fibroblasti. Lo studio confrontava fibroblasti sospesi in soluzione salina e trattati con fattore di crescita TGF- β 1 modificato con fibroblasti non trattati. I preparati sono stati iniettati a livello atriale in 320 siti nella regione nella quale si trovano la via di conduzione lenta e la via rapida del nodo atrioventricolare. I fibroblasti non trattati hanno determinato un significativo prolungamento dell'intervallo AH du-

rante ritmo sinusale e pacing atriale destro, ma non durante pacing atriale sinistro. Gli intervalli R-R erano analogamente allungati soprattutto durante fibrillazione atriale indotta dal pacing. La riduzione della frequenza cardiaca seppur non significativa è stata considerata rilevante dal punto di vista clinico (-54 b/min) negli animali trattati con terapia cellulare. L'effetto della somministrazione di fibroblasti risultava amplificato dal pretrattamento con TGF- β 1, l'intervallo AH era più lungo durante pacing atriale sia destro che sinistro e la frequenza ventricolare media risultava ridotta di -103 b/min. La somministrazione di fibroblasti con o senza TGF- β 1 ha determinato un rallentamento della conduzione attraverso il nodo atrioventricolare e riduzione della frequenza cardiaca senza creare un blocco atrioventricolare. I fibroblasti esposti al TGF- β 1 differenziano in miofibroblasti. I miofibroblasti esposti al TGF inducono diverse proteine responsabili dello sviluppo di fibre e di tessuto connettivo che costituiscono tessuto cicatriziale e stimolano la produzione di collagene di tipo I⁷¹. Il TGF- β 1 controlla due processi fondamentali nello sviluppo del tessuto cicatriziale: la capacità di modificare la forma del tessuto attraverso la deposizione e la contrazione di fibre e la formazione della matrice extracellulare. È ipotizzabile che le alterazioni indotte dal pretrattamento con TGF- β 1 potenzino la risposta elettrofisiologica del tessuto⁷⁰.

Altro problema non ancora chiarito è se l'iniezione di fibroblasti, trattati o non trattati, possa determinare un effetto proaritmico. L'iniezione e la proliferazione di fibroblasti nel triangolo di Koch aumentano l'anisotropia e inducono una conduzione discontinua in una regione con anisotropia già alta. Questo potrebbe predisporre ad aritmie da rientro in tale regione soprattutto nei pazienti con fibrillazione atriale non permanente. Sono necessari studi elettrofisiologici più approfonditi per arrivare all'applicazione clinica della metodica, tuttavia i risultati sono molto promettenti. Dal punto di vista clinico lo studio offre spunti interessanti. Innanzitutto la zona danneggiata dalla somministrazione delle cellule è ben localizzata. La somministrazione dei fibroblasti ha modificato focalmente la conduzione del nodo atrioventricolare senza indurre un blocco atrioventricolare di III grado e tale modificazione della conduzione atrioventricolare ha ridotto la frequenza ventricolare durante episodi di fibrillazione atriale indotti. La riduzione della frequenza cardiaca è clinicamente importante passando da 207 a 103 b/min. Questi risultati, ottenuti in animali di grossa taglia, suggeriscono che la terapia è potenzialmente applicabile ai casi di fibrillazione atriale con rapida risposta ventricolare e il rischio di complicanze (blocco atrioventricolare avanzato) è molto ridotto.

Dal punto di vista della sicurezza l'uso di cellule autologhe riduce sostanzialmente i rischi di rigetto e trasformazione. Anche in questo caso sono necessari approfondimenti prima di procedere all'applicazione sull'uomo.

Nel campo delle aritmie la terapia cellulare, così come la terapia genica hanno la potenzialità di creare un pacemaker biologico. Da un punto di vista sperimentale è possibile modificare le cellule con la terapia genica trasformandole in cellule dotate di caratteristiche elettrofisiologiche tipiche delle cellule pacemaker ma da ciò all'uso nell'uomo ci sono ancora diversi ostacoli: l'uso della terapia genica non ci dà certezze sulla permanenza dell'espressività del gene trasferito così come non è chiaro quale livello di espressività sia necessario per ottenere il pacemaker ottimale^{72,73}. Il trapianto di cellule staminali presenta alcune limitazioni soprattutto quando si parla di cellule non totalmente differenziate; infatti, anche se nella fase iniziale di sviluppo diverse linee cellulari mostrano la possibilità di una depolarizzazione spontanea non è noto per quanto tempo mantengano tale capacità pacemaker una volta somministrate *in vivo*.

In conclusione, la terapia genica delle aritmie è in fase di sviluppo, il processo procede attraverso la valutazione dell'efficacia, della biodistribuzione e della tossicità nei modelli preclinici per arrivare all'applicazione clinica. L'attuale strategia si concentra sulle modificazioni del nodo atrioventricolare. L'obiettivo è stato identificato e studi preclinici a breve termine ne hanno dimostrato le potenzialità e la sicurezza. Analogamente risultati incoraggianti sono stati ottenuti con la terapia cellulare. Sebbene tutte queste strategie siano promettenti a tutt'oggi nessuna è in grado di sostituire le strutture nodali pacemaker intrinseche o i pacemaker elettronici nel determinare un ritmo cardiaco stabile e riproducibile. Tuttavia si può ipotizzare che in futuro queste tecniche si imporranno nel trattamento di talune forme aritmiche.

Riassunto

La terapia cellulare è stata introdotta allo scopo di intervenire nelle zone in cui si verifica perdita di tessuto miocardico per ripristinare la funzione contrattile mediante sostituzione delle cellule perse con nuove cellule originate da linee cellulari staminali embrionali e adulte. Una delle complicanze del trapianto cellulare è la comparsa di fenomeni aritmici, segnalata in diversi studi su animali e successivamente sull'uomo. Tale fenomeno può dipendere da un meccanismo di rientro anatomico o funzionale conseguente alle condizioni ambientali che si realizzano nel tessuto dove convivono cellule native e cellule impiantate. Lo sviluppo dei cardiomiociti passa attraverso diverse fasi che corrispondono all'attivazione durante lo sviluppo embrionale di canali ionici. La terapia genica ha tentato di influenzare lo sviluppo di tali canali con risultati *in vitro* e *in vivo* nell'animale assai promettenti. La terapia genica e il trapianto cellulare influenzano la differenziazione cellulare verso cellule strutturali, quali i cardiomiociti atriali o ventricolari, ma possono anche essere utilizzati per generare pacemaker biologici influenzando la differenziazione verso cellule pacemaker dotate di attività automatica.

Allo stato attuale delle conoscenze queste strategie terapeutiche innovative sono promettenti, anche se a tutt'oggi nessuna è in grado di sostituire le strutture nodali pacemaker native o i pacemaker elettronici nel determinare un ritmo cardiaco stabile e

riproducibile. Tuttavia si può ipotizzare che in futuro queste tecniche si imporranno nel trattamento di talune forme aritmiche.

Parole chiave: Aritmie; Terapia cellulare; Terapia genica.

Bibliografia

1. Korecka JA, Verhaagen J, Hol EM. Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease. *Regen Med* 2007; 2: 425-46.
2. Cubbon RM, Rajwani A, Wheatcroft SB. The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair. *Diab Vasc Dis Res* 2007; 4: 103-11.
3. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003; 92: 139-50.
4. Barile L, Messina E, Giacomello A, Marban E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 50: 31-48.
5. Leor J, Prentice H, Sartorelli V, et al. Gene transfer and cell transplant: an experimental approach to repair a "broken heart". *Cardiovasc Res* 1997; 35: 431-41.
6. Canepa M, Coviello D, Chiarella F. Terapia cellulare cardiaca: un puzzle in attesa di composizione. *G Ital Cardiol* 2006; 7: 252-65.
7. Rosen MR. Are stem cells drugs? The regulation of stem cell research and development. *Circulation* 2006; 114: 1992-2000.
8. Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 2005; 112: 3174-83.
9. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512-23.
10. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 241-9.
11. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95: 9-20.
12. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8.
13. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 1999; 100: 193-202.
14. Matsushita T, Oyamada M, Kurata H, et al. Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 1999; 100 (Suppl 19): II262-II268.
15. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 907-21.
16. Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 107-16.
17. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000; 9: 359-68.
18. Fujii T, Yau TM, Weisel RD, et al. Cell transplantation to prevent heart failure: a comparison of cell types. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 2062-70.

19. Sperelakis N, Shigenobu K. Changes in membrane properties of chick embryonic hearts during development. *J Gen Physiol* 1972; 60: 430-53.
20. Sartiani L, Bettioli E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 2007; 25: 1136-44.
21. Jezek K, Pucelik P, Sauer J, Bartak F. Basic electrophysiological parameters and frequency sensitivity of the ventricular myocardium of human embryos. *Physiol Bohemoslov* 1982; 31: 11-9.
22. Tuganowski W, Tendera M. Components of the action potential of human embryonic auricle. *Am J Physiol* 1973; 224: 803-8.
23. Opie LH. Il cuore. Fisiologia e metabolismo. Torino: McGraw-Hill, 1993.
24. Satin J, Kehat I, Caspi O, et al. Mechanism of spontaneous excitability in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *J Physiol* 2004; 559 (Pt 2): 479-96.
25. Matsuura H, Ehara T, Ding WG, Omatsu-Kanbe M, Isono T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. *J Physiol* 2002; 540: 815-30.
26. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994; 75: 233-44.
27. Kolossov E, Fleischmann BK, Liu Q, et al. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 1998; 143: 2045-56.
28. Pappano AJ. Action potentials in chick atria. Increased susceptibility to blockade by tetrodotoxin during embryonic development. *Circ Res* 1972; 31: 379-88.
29. He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 2003; 93: 32-9.
30. Gourdie RG, Wei Y, Kim D, Klatt SC, Mikawa T. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6815-8.
31. Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, et al. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* 2004; 109: 506-12.
32. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC Jr. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 2002; 106: 1294-9.
33. Xue T, Cho HC, Akar FG, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 2005; 111: 11-20.
34. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-24.
35. Pak HN, Qayyum M, Kim DT, et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14: 841-8.
36. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11474-9.
37. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-83.
38. Menasche P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg* 2003; 75 (Suppl 6): S20-S28.
39. Smits PD. Myocardial repair with autologous skeletal myoblasts: a review of the clinical studies and problems. *Minerva Cardioangiol* 2004; 52: 525-35.
40. Pertsov AM, Davidenko JM, Salomonsz R, Baxter WT, Jalife J. Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1993; 72: 631-50.
41. Athill CA, Ikeda T, Kim YH, et al. Transmembrane potential properties at the core of functional reentrant wave fronts in isolated canine right atria. *Circulation* 1998; 98: 1556-67.
42. Kim DT, Kwan Y, Lee JJ, et al. Patterns of spiral tip motion in cardiac tissues. *Chaos* 1998; 8: 137-48.
43. Fast VG, Kleber AG. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 258-71.
44. Igelmund P, Fleischmann BK, Fisher IR, et al. Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in tissue culture. *Pflugers Arch* 1999; 437: 669-79.
45. Kucera JP, Kleber AG, Rohr S. Slow conduction in cardiac tissue, II: effects of branching tissue geometry. *Circ Res* 1998; 83: 795-805.
46. Dominguez G, Fozzard HA. Influence of extracellular K⁺ concentration on cable properties and excitability of sheep cardiac Purkinje fibers. *Circ Res* 1970; 26: 565-74.
47. Rohr S, Kucera AG, Kleber AG. Slow conduction in cardiac tissue, I: effects of a reduction of excitability versus a reduction of electrical coupling on microconduction. *Circ Res* 1998; 83: 781-94.
48. Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J Physiol* 2004; 555 (Pt 3): 617-26.
49. Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res* 2004; 94: 952-9.
50. Chang MG, Tung L, Sekar RB, et al. Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. *Circulation* 2006; 113: 1832-41.
51. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 2063-9.
52. Dib N, Micheler RE, Pagani FD, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005; 112: 1748-55.
53. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004; 148: 531-7.
54. Canepa M, Chiarella F. Sperimentazioni cliniche di terapia cellulare cardiaca in Italia: come procedere? *G Ital Cardiol* 2007; 8: 182-92.
55. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation* 2007; 115: 2254-61.
56. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-52.

57. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, et al. Role of interleukin-1b in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation* 2004; 110 (Suppl 1): II219-II224.
58. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 1997; 95: 988-96.
59. Poh KK, Sperry E, Young RG, Freyman T, Barringhaus KG, Thompson CA. Repeated direct endomyocardial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells: safety of a high dose, "off-the-shelf", cellular cardiomyoplasty strategy. *Int J Cardiol* 2007; 117: 360-4.
60. Kwaku KF. Cell therapy for rate control in atrial fibrillation: a new approach to an old problem. *Circulation* 2006; 113: 2474-6.
61. Donahue JK, Heldman AW, Fraser H, et al. Focal modification of electrical conduction in the heart by viral gene transfer. *Nat Med* 2000; 6: 1395-8.
62. Bauer A, McDonald AD, Nasir K, et al. Inhibitory G protein overexpression provides physiologically relevant heart rate control in persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2004; 110: 3115-20.
63. Miake J, Marban E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* 2002; 419: 132-33.
64. Murata M, Cingolan E, McDonald A, Donahue JK, Marban E. Creation of a genetic calcium channel blocker by targeted Gem gene transfer in the heart. *Circ Res* 2004; 95: 398-405.
65. Edelberg J, Aird W, Rosenberg R. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human β 2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest* 1998; 101: 337-43.
66. Edelberg J, Huang D, Josephson M, Rosenberg R. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. *Heart* 2001; 86: 559-62.
67. Miake J, Marbán E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest* 2003; 111: 1529-36.
68. Qu J, Plotnikov A, Danilo PJ, et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* 2003; 107: 1106-9.
69. Ruhparwar A, Tebbenjohanns J, Nichaus M, et al. Transplanted fetal cardiomyocytes as cardiac pacemaker. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21: 853-7.
70. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1282-9.
71. Bunch TJ, Mahapatra S, Bruce GK, et al. Impact of transforming growth factor- β 1 on atrioventricular node conduction modification by injected autologous fibroblasts in the canine heart. *Circulation* 2006; 113: 2485-94.
72. Malmstrom J, Lindberg H, Lindberg C, et al. Transforming growth factor-b1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 466-77.
73. Mocini D, Colivicchi F, Santini M. Stem cell therapy for cardiac arrhythmias. *Ital Heart J* 2005; 6: 267-71.