

Aspecte imunogene ale terapiei cu celule stem în medicina regenerativă

Ramesh Mazhari^{†1} și Ian Vasilovski Toma^{*2,3}

Departamentul de Medicină,

¹ *Diviziunea de Cardiologie,*

² *Diviziunea de Medicină Genomică,*

³ *Departmentul de Fizioterapie și Științe ale Sănătății*

Centrul Medical „George Washington”, Washington, DC

Autor corespondent:

Ian Toma, MD, PhD, MSHS

Division of Genomic Medicine

The George Washington Medical Center

2300 I Street NW, Ross 443

Washington, DC 20037

Telefon: +1 (202) 994-8923

e-mail: itoma@gwu.edu

Immunogenic aspects of stem cell therapy in regenerative medicine

Ramesh Mazhari^{†1}, Ian Vasilovski Toma^{*2,3}

Department of Medicine,

¹ *Division of Cardiology,*

² *Division of Genomic Medicine,*

³ *Department of Physical Therapy and Health Care Sciences*

The George Washington Medical Center, Washington, DC

Corresponding author

Ian Toma, MD, PhD, MSHS

Division of Genomic Medicine

The George Washington Medical Center

2300 I Street NW, Ross 443

Washington, DC 20037

Phone: +1 (202) 994-8923

e-mail: itoma@gwu.edu

Rezumat

Utilizarea celulelor stem pentru regenerarea și repararea țesuturilor deteriorate a fost de interes pentru comunități științifice și profesioniști timp de câteva decenii. Studiile de translație în cercetările de medicină regenerativă au scopul de a facilita transferul cunoștințelor științifice de bază ce țin de biologia celulelor stem în opțiuni terapeutice posibile. Celulele stem au un potențial promițător pentru aplicarea acestora în repararea sau regenerarea organelor și țesuturilor. Totuși, rata de supraviețuire a celulelor stem transplantate nu a fost una optimă și varia în funcție de metodele de livrare și tipul celulelor. Unul dintre mecanismele de transplantare care au eșuat este reacția imună a gazdei împotriva celulelor stem livrate. În cadrul acestei analize se vor discuta datele disponibile în literatura despre sursele de celule stem, imunogenitatea diferitor tipuri de celule stem și liniile lor descendente, precum și potențialele strategii de îmbunătățire a supraviețuirii și eficacitatea transplantării celulelor stem în medicina regenerativă.

Cuvinte-cheie: regenerare, regenerare, celule stem, CSM, hESC, CMH-I, HLA, reacție imună.

Abstract

Using stem cells to regenerate and repair damaged tissue has been a focus of the scientific communities and medical professionals for the last couple of decades. Translational studies in regenerative medicine research are intended to facilitate the transfer of the basic science knowledge of stem cell biology into potential therapeutic options. Stem cells have a promising potential for application in repair or regeneration of organs and tissues. However, the survival rate of the transplanted stem cells has not been optimal and varies depending on the delivery methods and type of cells. One of the mechanisms of the failed transplantations is the host's immune reaction against the delivered stem cells. In this review, we will discuss the available data in the literature on sources of stem cells, the immunogenicity of different types of stem cells and their progeny lineages, and the potential strategies to improve the survival and the efficacy of the stem cells transplantation in regenerative medicine.

Key words: regeneration, stem cell, MSC, ESC, MHC-I, HLA, immune reaction.

Introducere

Grefarea celulelor stem (CS) în țesutul gazdă este de importanță majoră pentru medicina regenerativă. Importanța transplantării efective este sporită pentru organele și țesuturile cu potențial de regenerare limitat, așa ca neuronii sau mușchii cardiaci. În cazuri de transplantare autologă când sursa de CS este pacientul, sau geamănul genetic monozigot (identic) al pacientului, procesul este singenic și, cu excepția cazurilor când gemenii sunt discordanți din cauza unor factori ai sistemului imun [1], reacția imună practic nu are loc [2]. Totuși, colectarea și introducerea celulelor stem autologe este un proces îndelungat, limitat în timp și complicat [3, 4], iar prevalența gemenilor printre populația generală este mică (1/30 în SUA) [5] și mult mai mică în cazul gemenilor monozigoti. Transplantarea CS de la o sursă genetic non-identică este numită alogenă și efectul terapeutic al acesteia adesea rezultă în respingerea imună a celulelor transplantate de către țesuturile gazdă.

Respingerea imună alogenă după terapia cu celule stem este mediată de către răspunsurile imune dependente de celulele T [6] activate de complexul major de histocompatibilitate de gradul I (CMH-I) într-o serie de evenimente moleculare. Administrarea imunosupresoarelor poate elimina răspunsul imun după terapia cu celule stem, dar nu este o opțiune sigură și realizabilă în cazul pacienților cu boli cronice din cauza riscului înalt de efecte adverse [7], inclusiv proliferarea și supraviețuirea celulelor stem transplantate [8]. Unele celule stem terapeutice, așa ca celulele stem hematopoietice (CSH) sau celulele stem mezenchimale (CSM), sunt mai favorabile datorită răspunsului imun redus al gazdelor, deși efectele de lungă durată nu sunt confirmate pentru bolile cronice și diferite căi de administrare și micromedii pot duce la imunogenitate variabilă în funcție de CSM în particularitate [9].

Se dezvoltă noi strategii de a induce toleranță imună pe diferite linii de CS și în această analiză se va prezenta un sumar al răspunsurilor imune în terapia cu celule stem (TCS) și datele de imunogenitate a trei cele mai studiate linii de celule stem pentru transplantare regenerativă: celule stem embrionare umane (hESC), CSM și celule stem pluripotente induse (CSPi).

Complexul Major de Histocompatibilitate

Toate celulele mamifere manifestă agenți MHC de suprafață care le permite să discrimineze între particule străine în circulare și propriile produse ale metabolismului celular. La oameni MHC este codificat pentru genele localizate pe locusul antigenului leucocitar uman (HLA) și este format din molecule de clasa 1 (MHC-I) și clasa 2 (MHC-II). Întregul locus HLA conține cca 4Mb pe brațul scurt al cromozomului 6 (6p21.3), care este divizat în regiune ce corespund genotipurilor specifice HLA. Fiecare regiune conține un număr mare de gene combinând șase gene care codează pentru MHC-I, 12 pentru MHC-II, 45 gene tip HLA și peste 200 de gene care codează proteine sau nu [10]. Cele 21 gene HLA de bază în aceste locusuri sunt extrem de polimorfe și diversitatea lor alelică este catalogată în baza de date a Institutului European de Bioinformatică și curatoriată de proiectul internațional ImMunoGeneTics (IMGT - <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) [11]. Către luna iunie 2014 au fost înregistrate peste 11000 alele HLA (8976 pentru clasa I și 2870 pentru

Introduction

The engraftment of transplanted stem cells (SCs) into the host tissue, even if only transiently, is likely to be an important factor for regenerative medicine. The importance of effective transplantation is increased for organs and tissues with limited regenerative potential, such as neurons and cardiac muscle. In cases of autologous transplantation in which the source of SCs is the patient, or the patient's genetically monozygotic (identical) twin, the process is called syngeneic and, unless the twins are discordant for some immune system factors [1], the immune reaction virtually never occurs [2]. However, collection and induction of autologous stem cells is a lengthy, time-constrained, and complicated process [3, 4], and the prevalence of twins among general population is in the single digit range (1/30 in the US) [5], much less of genetically monozygotic twins, which is only 4 per thousand births. Transplantation of SCs from a genetically non-identical source is termed allogeneic, and the therapeutic effect oftentimes results in immune rejection of the transplanted cells by the host tissues, and potentially attack of the host by the transplanted cells, a pathology known as graft-versus-host disease.

Allogeneic immune rejection after cell therapy is mediated by T cell-dependent immune responses [6] activated by the major histocompatibility complex I (MHC-I) in a chain of molecular events. Administration of immunosuppressants can eliminate the immune response after stem cell therapy, but it is not a safe and feasible option in patients with chronic disease because of high risk of side effects [7], including the proliferation and survival of transplanted cells [8]. Some of the therapeutic stem cells, such as hematopoietic stem cells (HSC) or mesenchymal stem cells (MSCs) are more favorable due to the reduced immune response in hosts, although their long-term effects are not confirmed in chronic diseases, and different routes of administration and microenvironments can lead to varying immunogenicity, particularly, of MSCs [9].

New strategies are developing to induce the immune tolerance to different stem cell lines and, in this review, we will present a summary on the immune response in stem cell therapy (SCT) and the data on immunogenicity of three most studied stem cell lines for regenerative transplantation: human embryonic stem cells (hESCs), MSCs, and inducible pluripotent stem cells (iPSCs).

Major Histocompatibility Complex

All mammalian cells express surface MHC antigens that allow them to discriminate between the foreign circulating particles and their own products of cell metabolism. In humans, the MHC is coded for by genes located on the human leukocyte antigen (HLA) locus, and consists of class I (MHC-I) and class 2 (MHC-II) molecules. The entire HLA locus covers about ~4 million bases (Mb) on the short arm of chromosome 6 (6p21.3), which is subdivided into regions corresponding to specific HLA genotypes. Each region contains a large number of genes combining six genes coding for MHC-I, 12 for MHC-II, 45 HLA-like genes, and over 200 protein-coding and noncoding genes [10]. The 21 core HLA genes in these loci are highly polymorphic and their allelic diversity is catalogued

clasa II), fiecare cu un ID unic dintr-o nomenclatură actualizată în 2010. Genele HLA-A, HLA-B și HLA-C codifică pentru proteinele MHC-I, iar genele HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP codifică pentru antigenele de legare a peptidelor de clasa MHC-II (Fig. 1, pag. 57). Genele care codifică pentru MHC de clasa III sunt clasate în aceeași regiune genomică. Totuși, această clasă nu participă la prezentarea peptidelor către receptorii celulelor T (RCT), dar mai curând codifică pentru câțiva factori de semnalizare și regulatori de transcriere, componenți ai complimentului și citokine implicate în răspunsul imun adaptativ [12]. Pe lângă moleculele MHC clasice, un număr de complexe diverse îndeplinesc funcții specifice ale țesuturilor. Spre exemplu, izoforma alelică HLA-G este exprimată în celulele placentare și protejează fătul, care conține antigeni parentali, de celulele maternelor citotoxice [13, 14] pe lângă toleranța maternă care se dezvoltă în perioada de preimplantare [15, 16].

Precum se vede în prezentarea schematică din Fig. 1, pag. 57 MHC-I constă dintr-un trimer transmembranar kDa de lanțuri grele α și un lanț ușor non-transmembranar 12 kDa β 2-microglobulin (β 2M). MHC-II constă dintr-un dimer din două lanțuri α & β transmembranar de clasa II. Celulele T care formează grupul de diferențiere 8 (CD8+) co-receptor pe suprafață recunoaște peptidele legate de complexul MHC clasa I și îl prezintă la TCR pe celulele nucleate, în timp ce cele cu co-receptor CD4+ legat de complexul MHC de clasa II activează RCT pe celulele prezentatoare de antigen (APC), ambele activări declanșează cascade de semnalizare ce duc spre activarea celulelor T citotoxice (Tc) sau celulelor T ajutoare de către MHC de clasa I și clasa II, respectiv (Fig. 2, pag. 56).

Celulele Tc activate proliferază și se diferențiază în limfocite T citotoxice efectoare (LTC), care sunt capabile să lizeze orice celule care au peptide inițial prezentate de molecula MHC-I. O secvență de evenimente similară are loc cu activarea Th, cu excepția faptului că moleculele MHC-II sunt inițial prezente doar pe APC specializate, inclusiv celulele B și macrofagele activate. Acapararea unei peptide străine de către APC-uri duce la recunoașterea peptidei prin TCR și eliberarea de citokine care activează exponențial în continuare celulele Tc și B, în cele din urmă inițiind mecanismul de răspuns adaptativ și umoral mediat celular.

Compatibilitatea imună a celulelor donatorului și ale gazdei este evaluată de reacția limfocitară mixtă (MLR), în cadrul căreia subseturi de limfocite de la donator și de la gazdă sunt amestecate *in vitro* [17]. Supraviețuirea, proliferarea și secreția de citokine poate fi măsurată calitativ și cantitativ pentru a estima magnitudinea răspunsului imun. MLR este de asemenea o metodă preferată pentru testarea celulelor modulate ale sistemului imunitar (MSC modificate genetic), caz în care celulele modificate servesc drept donator și adăugarea suspensiei de limfocite va dezvălui un posibil răspuns imun *in vivo*.

Pe lângă imunosupresie, care blochează complet răspunsul imun față de un antigen străin, metodele mai avansate de evitare a respingerii post-transplantare includ modificarea genomică funcțională a lanțului greu α sau a genelor β 2M în celulele stem. Câteva grupuri au raportat schimbări pozitive în studii pe animale în cadrul cărora doborârea antigenilor HLA în hESC a dus la ignoranța celulelor T și lipsa răspunsului imun de la soarecii gazdă [18].

within the European Bioinformatics Institute database and curated by an international project ImMunoGeneTics (IMGT - <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) [11]. As of June 2014, there were recorded more than 11,000 HLA alleles (8976 for class I, and 2870 for class II), each with unique ID under a new nomenclature updated in 2010. The human leucocyte antigens (HLA), HLA-A, HLA-B, and HLA-C genes code for the MHC-I proteins, and HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP genes code for peptide-binding proteins of the MHC-II class, which collectively present the bound peptides to the T-cell receptor (TCR) (Fig. 1, pag. 57). The genes coding for MHC class III are mapped to the same genomic region, however, this class does not participate in peptide presentation to the TCR, but rather encode for several signaling factors and transcription regulators, components of the complement system, and cytokines involved in the adaptive immune response [12]. In addition to the classical MHC molecules, a number of diverse complexes perform tissue specific functions. For example, the HLA-G allelic isoform is expressed in placental cells and protect the fetus containing paternal antigens from maternal circulating cytotoxic cells [13, 14], in addition to the maternal tolerance that is developed during the pre-implantation period [15, 16].

As schematically presented in Fig. 1 (pag. 57), the MHC-I consists of a transmembrane 40 kDa trimer of heavy class I α -chains and a non-transmembrane 12 kDa β 2-microglobulin (β 2M) light chain. The MHC-II consists of a dimer of two transmembrane class II α & β chains. T-cells that express the cluster of differentiation 8 (CD8+) co-receptor on their surface, recognize the peptides bound to MHC class I complex and present it to TCR on the nucleated cells, while those with CD4+ co-receptor bound to the MHC class II complex activate the TCR on the antigen-presenting cells (APCs), both activations trigger signaling cascades leading to the cytotoxic T-cell (Tc) or helper T-cell (Th) activation by MHC class I and II respectively (Fig. 2, pag. 56).

Activated Tc cells proliferate and differentiate into effector cytotoxic T lymphocytes (CTL), which are capable of lysing any cells that have the peptide initially presented by the MHC-I molecule. A similar sequence of events occurs with Th activation, except that the MHC-II molecules are present only on specialized APCs, including activated B-cells and macrophages. Engulfment of a foreign peptide by APCs leads to the recognition of the peptide by the TCR and the release of cytokines that further exponentially activate the Tc and B cells, ultimately, initiating the cell-mediated adaptive and humoral defense response mechanism.

The immune compatibility of the donor and host cells is assessed by the mixed lymphocyte reaction (MLR), in which the subsets of lymphocytes from both donor and host are mixed *in vitro* [17]. The survival, proliferation, and secretion of cytokines can be measured qualitatively and quantitatively in order to estimate the magnitude of the immune response. MLR is also a method of choice for testing the immune-modulated cells (i.e. genetically modified MSCs), in which case the modified cells serve as donor, and addition of lymphocytes suspension will reveal a potential immune response *in vivo*.

Celulele stem embrionare umane

Din punctul de vedere a toleranței imune, pentru pacient a doua cea mai bună variantă, după transplantarea autologă, ar fi hESC, considerată "privilegiată imun". hESC au o stare pluripotentă, imortală și nediferențiată și pot fi ghidate spre angajamente către filiații de celule specifice. Totuși, aplicarea practică a hESC este complicată din motive științifice, legale și etice ce țin de sursa și aplicarea acestor celule [19]. Abilitatea de a se auto-renova și a se diferenția în toate tipurile de celule din corp îi conferă hESC un potențial terapeutic enorm și un oarecare progres în aplicarea acestora în practica medicală a fost recent raportat odată ce US Food and Drug Administration (FDA) a aprobat studiile clinice [20, 21].

Principalele surse de hESC sunt embrioanele, placenta și sângele din cordonul ombilical (UCB), prima fiind limitată legal pentru studii în SUA cu excepția rezervelor de linii de celule existente, colectate anterior, iar utilizarea placentei și a UCB încă mai provoacă discuții de ordin etic în rândurile a cca 40% din respondenții din SUA [22]. Menținerea acestor celule în stare nediferențiată și diferențiere predestinată ghidată spre filiație specifică este o problemă atât tehnică, cât și științifică [23]. În pofida controverselor etice existente și a regulamentelor strânse ale multor țări, UCB poate fi "depozitat" în peste 130 de repertorii de sânge ombilical în peste 30 de țări în întreaga lume, permițând pacienților să-și păstreze UCB-ul nou-născuților lor sau să-l doneze pentru uz public [24]. Misperceperea și lipsa de cunoștințe despre scopul și posibilitățile UCB în mase ar trebui abordată pentru a evita așteptările neinformate față de mostrele depozitate [25].

Din punct de vedere clinic UCB este o sursă bună pentru unele celule descendente derivate, așa ca HSC, care sunt deja folosite cu succes în practica clinică pentru transplantarea alogenă, în mod primar în rândul copiilor și în absența unui donator compatibil de măduvă osoasă [26]. Pe lângă aceasta, țesutul cordonului ombilical este considerat o sursă bună de MSC mai primitivă sau mai puțin diferențiată, ceea ce demonstrează un bun potențial pentru dezvoltare spre un tratament clinic acceptabil. Totuși, o singură doză colectată de la un donator este, de obicei, insuficientă pentru aplicarea terapeutică în cazul unui pacient [27].

Imunogenitatea hESC și Celulele Pluripotente

Derivative

Literatura existentă despre imunogenitatea celulelor stem și celulele pluripotente derivate ale acestora este controversată. Consensul este că hESC nediferențiate exprimă un nivel scăzut de MHC-I de suprafață, un nivel minim sau neglijabil de MHC-II și câțiva antigeni specifici etapelor (SSEA3, SSEA4) pe lângă careva glicoproteine (TRA-1-60, TRA-1-81) și factor de transcriere OCT4 [28]. Totuși contradicțiile apar în cazul hESC stimulate și diferențiate. Li et al. [29] raportează că atât hESC nediferențiate cât și diferențiate nu ilicită un răspuns imun la soarecii imunocompetenți. Mai mult decât atât, pe lângă toleranța imunogenă, hESC au inhibat local activitatea celulelor T fără a afecta abilitatea acestora de a răspunde la antigeni străini. În același timp, Grinemma et al. [30] au depistat o creștere la nivelul MHC-I în răspuns la interferonul γ (IFN- γ) fără a afec-

Aside from immunosuppression, which completely blunts the immune response to a foreign antigen, the more advanced approaches in avoiding rejection of transplanted cells include the genomic functional modification of either heavy α -chain or β 2M genes in the transplanted stem cells. Several groups have reported positive effects in animal studies in which knock-down of HLA antigens in hESCs resulted in an attenuated immune response by the host mice [18].

Human embryonic stem cells

From the immune tolerance point of view, for a patient, the next best choice after autologous transplantation would be the hESCs, which are believed to be "immune-privileged". hESCs are pluripotent, immortal in the undifferentiated state, and can be guided into specific lineage-cell commitments. However, the practical application of hESCs is complicated due to scientific, legal, and ethical issues in sourcing and application of these cells [19]. With their ability to undergo self-renewal and to differentiate into all cell types in the body, hESCs have a great therapeutic potential and some progress in bringing them into medical practice have been recently reported as first-in-human US Food and Drug Administration (FDA) approved clinical trials [20, 21].

The main sources of hESC are embryos, placenta, and the umbilical cord blood (UCB), the first being legally restricted for research in the US, with the exception of existing, previously collected cell lines. The use of placenta and UCB are still raising ethical concerns in about 40% of the US respondents [22]. Maintenance and expansion of these cells in an undifferentiated state, and directed fate-restricted differentiation into specific lineages is both a technical and scientific challenge [23]. Despite the existing ethical controversies and tight regulation by the governments of many countries, the UCB can be "banked" in over 130 private and public cord blood repositories in more than 30 countries around the world, allowing parents to store their newborn's UCB or to donate it for public use [24]. The existing misperception and lack of knowledge about the purpose and possibilities of UCB among the public may need to be addressed in order to avoid uninformed expectations from the deposited sample [25].

From the clinical point of view, UCB is also a good source for some important derivative progeny cells such as HSCs, which are already successfully used in clinical practice for allogeneic transplantation, primarily to children and in the absence of compatible bone marrow donor [26]. In addition, the umbilical cord tissue is considered a good source for more "primitive" or less differentiated MSCs, which show a good potential of being developed into clinically acceptable treatment. However, a single dose collected from one donor is usually insufficient for a therapeutic application in a patient [27].

Immunogenicity of hESCs and Derivative Pluripotent Cells

The existing literature on immunogenicity of stem cells and their derivative pluripotent cells is somewhat controversial. The consensus is that the undifferentiated hESCs express a low level of cell surface MHC-I, a minimal or negligible level

ta nivelul scăzut al HC-II în hESC. Nivelul inducției MHC-I a fost comparabil cu cel al fibroblastelor umane alogene, dar mult mai scăzut decât cel indus de celulele dendritice alogene, ceea ce poate fi explicat prin faptul că atât hESC, cât și fibroblastele au un nivel constitutiv de MHC-I scăzut, dar le lipsește antigenul MHC-II. Totuși, un al treilea grup [31] a raportat că nivelul MHC-I crește în corpurile embrionare la prima etapă de diferențiere și aceasta se exprimă mult mai mult în teratome. Pe lângă discuțiile despre nivelul de inducere a MHC-I, Robertson et al. [32] a atribuit toleranța hESC nivelului înalt al expresiei factorului de creștere transformator beta (TGF- β), care are un efect potent antiinflamator.

Activarea MHC-I poate avea loc drept rezultat al diferențierii spontane sau în anumite condiții specifice mediului de creștere care includ factori de creștere [33]. Expunerea hESC diferențiate și nediferențiate la IFN- γ declanșează inducerea înzecită a expresiei MHC-I *in vitro* fără a afecta nivelul de MHC-II semnificativ [31]. În final, complexul MHC-I activat poate duce spre respingerea imună în urma transplantării spre gazdă. Mai mult decât atât, celulele într-o populație cu aspecte fiziologice aproape niciodată nu funcționează în unison, ceea ce înseamnă că în orice hESC nediferențiată poate exista un anumit număr de celule la diferite etape de diferențiere, ceea ce poate declanșa un răspuns imun dacă a avut loc activarea MHC-I. Identificarea citokinelor inflamatorii și a căilor de chemokine în faza inflamatorie timpurie a furnizat ținte care pot fi modificate pentru a diminua imunogenitatea țesutului transplantat. Spre exemplu, direcționarea imunogenitatea mediată de complement în țesuturile derivate din ESC poate ameliora răspunsul imun inițial față de transplantul de țesut și îmbunătăți supraviețuirea țesutului transplantat [34].

Imunogenitatea hESC și filiația lor derivativă în terapia cu celule stem umane (SCT) rămâne a fi investigată, considerând faptul că studiile pe animale *in vitro* și *in vivo* la șoareci sau mamifere nu întotdeauna se transferă perfect [35, 36].

Celule Stem Mezenchimale

Descoperite în anii 1960 și inițial recoltate din populația de celule ale măduvei osoase [37] (de aici al doilea nume "celule stromale ale măduvei osoase"), MSC au devenit una dintre cele mai accesibile și practice surse pentru celulele stem multipotente care ar putea genera un număr mare de țesuturi [38]. Datorită interpretărilor diverse ale profilurilor MSC în ultimii ani, Societatea Internațională pentru Terapie celulară a stabilit criteriile minime pentru definirea MSC, specificând lista markerilor de suprafață care trebuie să fie prezenți (CD105, CD73, CD90) sau absenți (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, și HLA-DR) pe lângă cerințele de aderare în condițiile de cultură celulară și de a fi capabile de a se diferenția în osteoblaste, adipocite și condroblaste *in vitro* [39].

MSC sunt de obicei recoltate din măduva osoasă. Pe lângă aceasta, MSC are putea fi recoltate din lichidul amniotic, sânge și UCB, pulpa dentară și alte țesuturi și compartimente biologice [40], dar abundența lor și cantitatea totală se consideră de a descrește dramatic cu vârsta [41]. Pentru aplicarea în SCT și cercetare, MSC pot fi extinse *in vitro* utilizând medii îmbogățite cu factori de creștere sau este nevoie de plasmă derivată

of MHC-II, and several differentiation stage-specific antigens (SSEA3, SSEA4) along with some glycoproteins (TRA-1-60, TRA-1-81) and OCT4 transcription factor [28]. However the disagreement arises in cases of stimulated and differentiated hESCs. Li et al. [29] reported that both undifferentiated and differentiated hESCs do not elicit immune response in immunocompetent mice. Moreover, in addition to the immunogenic tolerance, hESCs locally inhibited the T-cell activity, without affecting their ability to respond to foreign antigens. At the same time, Grinemmo et al. [30] detected an increase in MHC-I level in response to interferon γ (IFN- γ) without affecting the low level of MHC-II in hESCs. The level of MHC-I induction was comparable to that of the allogeneic human fibroblast, but much lower than the one induced by allogeneic dendritic cells, which may be explained by the fact that both hESCs and fibroblast have a very low constitutive level of MHC-I, but lack MHC-II antigen. And yet a third group [31] reported that the MHC-I level increases in embryonic bodies as a first stage of differentiation, and it is expressed much higher in teratomas. In addition to the discussions on MHC-I level of induction, Robertson et al. [32] attributed the hESCs tolerance to the high level of transforming growth factor beta (TGF- β) expression, which has a potent immunosuppressive effect.

Activation of MHC-I may occur as a result of spontaneous differentiation or under specific growth media conditions that include growth factors [33]. Exposure of both differentiated and undifferentiated hESCs to IFN- γ triggers at least a 10-fold induction of MHC-I expression *in vitro* without affecting significantly the level of MHC-II [31]. Ultimately, the activated MHC-I complex may lead to an immune rejection upon transplantation into the host. Moreover, cells in a population under physiological conditions almost never function in unison, meaning that in any undifferentiated hESCs there may be certain number of cells at different stages of spontaneous differentiation, which may trigger an immune response if the MHC-I activation occurred. Identification of the inflammatory cytokines and chemokine pathways in the early immune phase have provided targets that can be modified to diminish the immunogenicity of the transplanted tissue. For example, targeting the complement-mediated immunogenicity in ESC-derived tissue can ameliorate the early immune response to ESC-derived tissue transplantation and improve the survival of the transplanted tissue [34].

The immunogenicity of hESCs and their derivative lineages in human stem cell therapy (SCT) remains to be investigated, considering that *in vitro* and *in vivo* animal studies in mice or in mammals do not always translate seamlessly [35, 36].

Mesenchymal Stem Cells

Discovered in 1960s and initially harvested from bone marrow cell population [37] (hence, a second name "marrow stromal cells"), MSCs became one of the most accessible and practical sources for multipotent stem cells that could give rise to a large number of tissues [38]. Due to diverse interpretations of the MSC profiles in the recent years, the International Society for Cellular Therapy established the minimal criteria for definition of MSCs specifying the list of surface markers

din sânge bogată în plachete [42]. În ultimii ani securitatea și eficacitatea MSC au fost puse la dezbatere în baza rezultatelor discutabile ale aplicării MSC în fazele inițiale ale testărilor clinice [43].

MSC sunt prezente în măduva osoasă, dar populația acestora reprezintă aproximativ 0.01% din totalul celulelor nucleate ale măduvei [44], deși din punct de vedere practic, la moment MSC din măduva osoasă sunt cea mai bună sursă pentru transplantarea autoloagă singenică după expansiunea lor *ex vivo* [45]. Pentru o aplicare imediată MSC imunotolerante, "de pe raft", ar fi o sursă ideală pentru medicina regenerativă și modificarea MSC în celule non-imunogene sau imunotolerante este scopul principal al domeniului SCT.

Asemănător cu hESC, MSC umane exprimă MHC-I și nu exprimă MHC-II și moleculele cosimulatoare B7 și ligand CD40 [40]. MSC au o afinitate înaltă de a lega limfocite T activate care sunt CD4+ și CD8+ și inhibă activ proliferarea celulelor T prin eliminarea citokinelor, așa ca factorul de creștere al hepatocitelor umane recombinante (rhHGF) și rhTGF-β1 [46]. Secreția factorilor de creștere, a citokinelor și a moleculelor bioactive de către MSC prestează adaptarea celulelor transplantate la micromediu (*plasticitate terapeutică*) prin semnalizare paracrină și autocrină [47].

În pofida similarității cu hESC și presupusul privilegiu imun al MSC, experimentele *in vitro* au demonstrat că MSC diferențiate într-un fenotip cardiac sau vascular vor exprima atât MHC I cât și II și vor deveni imunogene [48]. Studiile pe animale au demonstrat rezultate mixte. În unele studii, supraviețuirea MSC injectate este neglijabilă și se consideră că celulele sunt eliminate ca rezultat al răspunsului imun al recipientului [48], în timp ce studii pe animale mai extinse sugerează că MSC alogene pot supraviețui, engrafta și diferenția în țesuturile gazdei [49]. Imunogenitatea MSC în regenerarea cardiacă este acum studiată într-un studiu clinic randomizat al tratamentelor MSC alogene vs. autologe la pacienții cu insuficiență cardiacă [50]. Luând în considerare abundența surselor pentru MSC și abilitatea lor de a se extinde *in vitro*, modularea imunogenității lor poate avansa imens domeniul medicinei regenerative.

Celule Stem Pluripotente Induse

Descoperite mai puțin de un deceniu în urmă, celulele stem pluripotente induse (iPSC) sunt celule adulte genetic reprogramate (de-diferențiate) într-o stare embrionară, manifestate în exprimarea unui șir de markeri. Reprogramarea constă în transducția retrovirală a unui grup de gene care codifică pentru factori de pluripotență (OCT4, SOX2, C-Myc, KLF4) [51] și sursa de iPSC sunt de obicei celule somatic autologe adulte recoltate din măduva osoasă sau sângele pacientului. Aceste celule demonstrează un fenotip pluripotent, similar cu cel din ESC, dar nu au problemele și controversile legale și etice asociate cu celulele embrionare [52]. Succesul tehnic în reprogramarea celulelor somatice singenice specifice pacientului a sporit speranța că nu mai trebuie să ne îngrijorăm despre răspunsul imun așa cum o făceam în cazul celulelor stem embrionare [53]. Drept dezavantaj, studiile recente au demonstrat că unele din celulele diferențiate din iPSC sunt foarte imunogene [54], iar tipul celulelor diferențiate, calea de administrare a celule-

that need to be present (CD105, CD73, CD90) or absent (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α, CD19, and HLA-DR), in addition to the requirements to adhere to cell culture surfaces, and to be capable of differentiating into osteoblasts, adipocytes, and chondroblasts *in vitro* [39].

MSCs are mainly harvested from the bone marrow. In addition, MSCs could be harvested from amniotic fluid, blood and UCB, dental pulp, and other tissues and biological compartments [40], but their abundance and replicative capacity is believed to decrease with increasing age of the donor [41]. For application in SCT and research, MSCs can be expanded *in vitro* using media enriched with growth factors or blood-derived platelet rich plasma is required [42]. In recent years, the safety and efficacy of MSCs has been debated based on contentious results of application of MSCs in early phases of clinical trials [43].

MSCs are present in bone marrow, but their population represents approximately 0.01% of the total nucleated marrow cells [44], although from a practical point of view, so far the bone marrow derived MSCs are the best source for autologous syngeneic transplantation after their expansion *ex vivo* [45]. For an immediate application, the "off-shelf", immunotolerant MSCs would be an ideal source for regenerative medicine, and the modification of MSCs into non-immunogenic or immunotolerant cells is a significant priority in the field of SCT.

Similar to hESC, human MSCs express MHC-I, and don't express MHC-II or co-stimulatory molecules B7 and CD40 ligand [40]. MSCs have a high affinity to bind activated T lymphocytes that are CD4+ and CD8+, and actively inhibit T-cell proliferation by releasing cytokines, such as recombinant human hepatocyte growth factor (hHGF) and hTGF-β1 [46]. Secretion by MSCs of growth factors, cytokines, and bioactive molecules renders the adaptation of transplanted cells to the microenvironment (*therapeutic plasticity*) via autocrine and paracrine signaling [47].

Despite the similarity to hESCs and presumed immune-privilege of MSCs, *in vitro* experiments have demonstrated that MSCs differentiated into a cardiac or vascular phenotype will express both MHC I and II and become immunogenic [48]. Animal studies have shown mixed results so far. In some studies, the survival of the injected MSCs are negligible and it is thought that the cells are eliminated as a result of the recipient's immune response [48], while larger animal studies suggest that allogeneic MSCs can survive, engraft and differentiate in the host's tissue [49]. The immunogenicity of MSCs in cardiac regeneration is currently being studied in a randomized clinical trial of allogeneic vs. autologous MSCs treatment in patients with heart failure [50]. Considering the abundance of sources for MSCs and their ability to be expanded *in vitro*, modulation of their immunogenicity may advance immensely the field of regenerative medicine.

Induced Pluripotent Stem Cells

Discovered less than a decade ago, the induced pluripotent stem cells (iPSCs) are genetically reprogrammed (de-differentiated) adult cells into an "embryonic-like" state, manifested in expression of a number of primitive stem cell markers.

lor și chimerismul în gazdă joacă un rol important în imunogenitatea celulelor provenite din iPSC. Indiferent de problemele tehnice și efectele adverse posibile, utilizarea iPSC devine mai atractivă deoarece aceste celule au demonstrat potențialul de a fi diferențiate în cardiomiocite [55] și utilizate la repararea țesutului cardiac. Mai mult decât atât, o nouă aplicare interesantă a cardiomiocitelor din iPSC este sub forma țesutului cardiac artificial (EHT) [56], ca parte a manșetelor EHT venoase (VEHTCs) în care cardiomiocitele formează un syncytium cardiac și dezvoltă un ritm de bătăi intrinsec [57].

Problemele curente și promisiunile de viitor

Imunogenitatea și supraviețuirea celulelor stem transplantate: Pe cât mai bine înțelegem cascadele inflamatorii implicate în reacțiile imune față de celula stem livrată, cu atât mai eficient putem utiliza invențiile vizate pentru a ameliora răspunsul imun la celulele implantate și pentru a îmbunătăți supraviețuirea acestora. Spre exemplu, expresia predominantă de repetiție a glicoproteinei A (GARP) pe MSC le permite să inhibe răspunsurile celulelor T *in vitro* și este o nouă țintă potențială pentru îmbunătățirea supraviețuirii MSC și eficacității terapeutice [58].

Afecțiuni maligne ca rezultat al complicațiilor terapiei cu celule stem: Printre efecte adverse și complicații, formarea teratomelor și leucemia sunt pericole reale ale SCT și mai cu seamă aplicabile în cazul filiațiilor de celule cu caracteristici pluripotente, așa ca ESC și iPSC [59]. Îmbunătățirea metodelor de izolare și manipulare a celulelor stem, inclusiv o alternativă mai sigură a transformării genetice virale, poate reduce riscurile și este un domeniu de interes în lumea celulelor stem.

Supraviețuirea celulelor: Pe lângă aspectele imune, reținerea celulelor injectate în miocard este de asemenea un lucru dificil. Unele metode noi demonstrează un potențial de depășire a acestui obstacol la animalele cercetate prin aplicarea adaptoarelor de scară nanometrică pentru livrarea celulelor stem în țesutul cardiac [60]. Spre exemplu, raportată recent, aplicarea ESC a șoarecilor sub formă de "gel nanomatrix incapsulat și injectabil" compus din peptide amfofile cu ligand adeziv de celule Arg-Gly-Asp-Ser a demonstrat retenție și engraftare satisfăcătoare 14 săptămâni post-transplantare [61]. Utilizarea nanotehnologiilor a deschis un nou capitol în înțelegerea biologiei celulelor stem și poate spori posibilitățile de supraviețuire și diferențiere ghidată *in vivo* [62].

Aplicări noi: Diferențierea ESC în cardiomiocite "ritmice" este printre cele mai impresionante succese ale medicinei regenerative, luând în considerare povara clinică și socială a bolilor cardiovasculare care au fost cauza principală a mortalității în ultimele decenii [63]. Aplicarea acestor cardiomiocite în repararea țesutului cardiac este testată activ [61], împreună cu încercările de a utiliza cardiomiocitele "în afara inimii", în biosinteza *ex vivo* a VEHTC, pompa contracțiilor vasculare prin venele profunde [57]. Aplicarea practică a acestor pompe venoase încă trebuie dezvoltată, dar drept scop potențial, astfel de pompe venoase pot deveni o alegere salvatoare pentru pacienții cu insuficiență cronică a valvelor venelor profunde (CDVI), când majoritatea patologiilor reprezintă lipsa de capacitate de a propulsa sângele înapoi spre inimă.

The reprogramming consists of retroviral transduction of a group of genes coding for pluripotency factors (OCT4, SOX2, C-Myc, KLF4) [51] and the source of iPSCs are usually adult autologous somatic cells harvested from patient's bone marrow or blood. iPSCs show a pluripotent phenotype, similar to that of ESCs, but don't have the legal and ethical controversies associated with embryonic cells [52]. Technical advancement in reprogramming of patient-specific syngeneic somatic cells has reduced concerns about the immunogenic responses that are likely to limit the use of hESCs [53]. As a downside, recent studies have demonstrated that some of the differentiated cells from iPSCs are highly immunogenic [54], and the type of differentiated cells, the route of administration of the cells, and the chimerism in the host plays an important role in the immunogenicity of the iPSC-derived cells. Regardless of the technical challenges and potential adverse effects, the use of iPSCs becomes more attractive as these cells showed the potential to be differentiated into cardiomyocytes [55] and used in cardiac tissue repair. Moreover, an interesting novel application of the iPSC-derived cardiomyocytes in the form of engineered heart tissue (EHT) [56] as a part of venous EHT cuffs in which the cardiomyocytes form a cardiac syncytium and develop an intrinsic beating rhythm [57].

Current challenges and future promises

Immunogenicity and survival of the transplanted stem cells: As we further understand the immune responses to transplanted stem cells, we can use targeted interventions to ameliorate the immune response to implanted cells, and improve their survival. For example, glycoprotein A repetitions predominant (GARP) expression on MSCs enables them to inhibit T cell responses *in vitro*, and is potentially a new target for improving the MSCs survival and therapeutic efficacy [58].

Malignancies as a complication of stem cell therapy: Among the adverse events and complications, teratoma formation and leukemia are a real threat of SCT and most applicable to the cell lines with pluripotent characteristics such as ESCs and iPSCs [59]. Improvements in methods of isolation and manipulation of stem cells, including a safer alternative to the viral genomic transformation, can reduce these risks and is an area of active interest in the stem cell world.

Cell survival: Aside from immunological aspects, the retention of injected cells into myocardium is also a difficult endeavor, particularly because of its highly contractile nature. Some novel methods show a potential for overcoming this hurdle in animal models by applying nanoscale adapters for delivering the stem cells into cardiac tissue [60]. For example, a recently reported application of mouse ESC "encapsulated in injectable nanomatrix gel" composed of peptide amphiphiles with Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) cell adhesive ligand showed an improved retention and engraftment 14 weeks post-transplantation [61]. The use of nanotechnology has opened a new chapter in understanding the biology of stem cells and can enhance the possibilities of directed *in vivo* differentiation and survival [62].

Novel applications: Differentiation of ESC into "beating" cardiomyocytes is among the most impressive achievements

Perspectivile pentru medicina regenerativă și aplicarea SC par foarte promițătoare, dar aplicarea sigură și efectivă a tehnologiilor sale va necesita o înțelegere mai profundă a proceselor imune și a regulilor acestora în celulele stem, precum și selectarea corectă și direcționată a donatorilor și a recipienților.

Acronime și abrevieri:

CS – celule stem
 MHC – **major histocompatibility complex** (complex major de histocompatibilitate)
 HLA – **human leukocyte antigen** (antigen leucocitar uman)
 HSCs – **hematopoietic stem cells** (celule stem hematopoietice)
 MSCs – **mesenchymal stem cells** (Celule stem mezenchimale)
 hESCs – **human embryonic stem cells** (Celule stem embrionare umane)
 iPSCs – **induced pluripotent stem cells** (celule stem pluripotente induse)
 IMGT – **ImMunoGeneTics** (numele proiectului internațional din cadrul Institutului European de Bioninformatică)
 TCR – **T-cell receptor** (receptorii celulelor T)
 β 2M – **beta-2 microglobulin**
 APC – **antigen presenting cells** (celule prezentatoare de antigen)
 CD8 (other CDs) – **cluster of differentiation** (grup de diferențiere)
 Tc and Th – Celule T citotoxice și ajutătoare (**helper**)
 CTL – **cytotoxic T lymphocytes** (limfocitele T citotoxice)
 MLR – **mixed lymphocytes reaction** (reacție de limfocite mixtă)
 FDA – **Food and Drug Administration** (agenție de reglementare SUA)
 UCB – **umbilical cord blood** (sangele din cordonul ombilical)
 IFN- γ – **interferon gamma**
 TGF- β – **transforming growth factor beta** (factor de creștere transformator beta)
 rhHGF – **recombinant human hepatocyte growth factor** (factorul de creștere a hepatocitelor umane recombinante)
 SCT – **stem cell therapy** (terapia cu celule stem)
 OCT4 – **octamer-binding transcription factor 4** (factor de transcriere octamer de legare 4)
 SOX2 – **SRY**(sex determining region Y)-**box 2**
 C-Myc – V-myc avian myelocytomatosis viral
 KLF4 – Kruppel-like factor 4
 GARP – **glycoprotein A repetitions predominant**
 SSEA (3&4) – **stage specific embryonic antigen**
 EHT – **engineered heart tissue** (țesut cardiac artificial)
 VEHTCs – **venous EHT cuffs** (manșete EHT venoase)

Contribuția autorilor:

Ambii autori au contribuit în mod egal la scrierea acestui manuscris.

Conflict de interes: Autorii nu declară conflict de interes.

of regenerative medicine, considering the clinical and social burden of cardiovascular diseases being a lead cause of mortality for the past several decades [63]. Application of ESC-derived cardiomyocytes in repair of cardiac tissue is being actively tested [61], along with attempts to use the cardiomyocytes “outside of the heart”, to create contractile vascular pumps to aid venous or lymphatic flow [57]. The later approach is in early stages of development, but it holds promise to become a life-saving choice for patients with chronic deep vein valve insufficiency (CDVI), in which the major pathology is failure to pump the blood back to the heart.

The prospects for the regenerative medicine and application of SCs look very promising, but effective and safe application of this technology will require a deeper understanding of the immune processes and their regulation in stem cells, along with proper and targeted selection of donors and recipients.

Acronyms and Abbreviations:

APC – **antigen presenting cells**
 β 2M – **beta-2 microglobulin**
 CD8 (other CDs) – **cluster of differentiation**
 C-Myc – V-myc avian myelocytomatosis viral
 CTL – **cytotoxic T lymphocytes**
 SCs – **stem cells**
 EHT – **engineered heart tissue**
 FDA – **Food and Drug Administration** (US Regulatory agency)
 GARP – **glycoprotein A repetitions predominant**
 hESCs – **human embryonic stem cells**
 hHGF – **human hepatocyte growth factor**
 HLA – **human leukocyte antigen**
 HSCs – **hematopoietic stem cells**
 IFN- γ – **interferon gamma**
 IMGT – **ImMunoGeneTics** (project - part of European Bioinformatics Institute)
 iPSCs – **induced pluripotent stem cells**
 KLF4 – Kruppel-like factor 4
 MHC – **major histocompatibility complex**
 MLR – **mixed lymphocytes reaction**
 MSCs – **mesenchymal stem cells**
 OCT4 – **octamer-binding transcription factor 4**
 SCT – **stem cell therapy**
 SOX2 – **SRY**(sex determining region Y)-**box 2**
 SSEA (3&4) – **stage specific embryonic antigen**
 TCR – **T-cell receptor**
 Tc and Th – **cytotoxic and helper T-cells**, respectively
 TGF- β – **transforming growth factor beta**
 UCB – **umbilical cord blood**

Authors contribution:

Both authors contributed equally to the writing of this manuscript.

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Bibliografie/ References

- Valentin-Acevedo A, Covey LR, Gurkan S. B lymphocyte cytokine profile in a monozygotic twin pair discordant for nephrotic syndrome. *Indian journal of pediatrics*. 2013;80(10):875-7. doi: 10.1007/s12098-013-0984-0. PubMed PMID: 23397174.
- Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2013;12(4):407-12. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.006. PubMed PMID: 23352605.
- Carpenter MK, Couture LA. Regulatory considerations for the development of autologous induced pluripotent stem cell therapies. *Regenerative medicine*. 2010;5(4):569-79. doi: 10.2217/rme.10.55. PubMed PMID: 20632860.
- Mangan PA, Gleason CL, Miceli T. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: frequently asked questions. *Clinical journal of oncology nursing*. 2013;17 Suppl:43-7. doi: 10.1188/13.CJON.43-47. PubMed PMID: 24280458.
- Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK. Three Decades of Twin Birth in the United States, 1980-2009. Hyattsville, MD: CDC, 2012 January 2012. Report No.
- Getts DR, Shankar S, Chastain EM, Martin A, Getts MT, Wood K, et al. Current landscape for T-cell targeting in autoimmunity and transplantation. *Immunotherapy*. 2011;3(7):853-70. doi: 10.2217/imt.11.61. PubMed PMID: 21751954; PubMed Central PMCID: PMC3666312.
- Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N. Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem cells*. 2007;25(4):983-5. doi: 10.1634/stemcells.2006-0566. PubMed PMID: 17185611.
- Poncelet AJ, Nizet Y, Vercruyse J, Hiel AL, Saliez A, Gianello P. Inhibition of humoral response to allogeneic porcine mesenchymal stem cell with 12 days of tacrolimus. *Transplantation*. 2008;86(11):1586-95. doi: 10.1097/TP.0b013e31818bd96f. PubMed PMID: 19077894.
- Gu LH, Zhang TT, Li Y, Yan HJ, Qi H, Li FR. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cellular & molecular immunology*. 2014. doi: 10.1038/cmi.2014.70. PubMed PMID: 25242276.
- Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet*. 2009;54(1):15-39.
- Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1):D1222-D7. doi: 10.1093/nar/gks949.
- Mak TW, Saunders ME, Jett BD. Primer to The immune response. 2nd edition / ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP Cell, AP Cell is an imprint of Elsevier; 2014. xxvii, 674 pages p.
- Keskin F, Karatas A, Albayrak M, Biyik I, Erkan M, Demirin H, et al. Maternal serum soluble HLA-G levels in missed abortions. *Medicina*. 2013;49(10):435-8. PubMed PMID: 24709785.
- Kuroki K, Maenaka K. Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface. *European journal of immunology*. 2007;37(7):1727-9. doi: 10.1002/eji.200737515. PubMed PMID: 17587197; PubMed Central PMCID: PMC2991771.
- Mellor AL, Munn DH. Immunology at the Maternal-Fetal Interface: Lessons for T Cell Tolerance and Suppression. *Annual Review of Immunology*. 2000;18(1):367-91. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.367. PubMed PMID: 10837063.
- Jiang S-P, Vacchio MS. Cutting Edge: Multiple Mechanisms of Peripheral T Cell Tolerance to the Fetal "Allograft". *The Journal of Immunology*. 1998;160(7):3086-90.
- Schwarz MR. THE MIXED LYMPHOCYTE REACTION: AN IN VITRO TEST FOR TOLERANCE. *The Journal of Experimental Medicine*. 1968;127(5):879-90. doi: 10.1084/jem.127.5.879.
- Deuse T, Seifert M, Phillips N, Fire A, Tyan D, Kay M, et al. Human leukocyte antigen I knockdown human embryonic stem cells induce host ignorance and achieve prolonged xenogeneic survival. *Circulation*. 2011;124(11 Suppl):S3-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.020727. PubMed PMID: 21911816.
- Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S336-44. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.032. PubMed PMID: 20061008.
- Chapman AR, Scala CC. Evaluating the first-in-human clinical trial of a human embryonic stem cell-based therapy. *Kennedy Institute of Ethics journal*. 2012;22(3):243-61. PubMed PMID: 23285793.
- Brindley D, Mason C. Human embryonic stem cell therapy in the post-Geron era. *Regenerative medicine*. 2012;7(1):17-8. doi: 10.2217/rme.11.115 or 10.2217/rme.12.80. PubMed PMID: 22168491.
- Wagner AM, Krenger W, Holzgreve W, Burkli P, Surbek DV. Use of human embryonic stem cells and umbilical cord blood stem cells for research and therapy: a prospective survey among health care professionals and patients in Switzerland. *Transfusion*. 2013;53(11):2681-9. doi: 10.1111/trf.12137. PubMed PMID: 23451834.
- Parsons XH. Constraining the Pluripotent Fate of Human Embryonic Stem Cells for Tissue Engineering and Cell Therapy - The Turning Point of Cell-Based Regenerative Medicine. *British biotechnology journal*. 2013;3(4):424-57. doi: 10.9734/BBJ/2013/4309#sthash.6D8Rulbv.dpuf. PubMed PMID: 24926434; PubMed Central PMCID: PMC4051304.
- Guilcher GM, Fernandez CV, Joffe S. Are hybrid umbilical cord blood banks really the best of both worlds? *Journal of medical ethics*. 2014. doi: 10.1136/medethics-2013-101673. PubMed PMID: 24825373.
- Fox NS, Stevens C, Ciobotariu R, Rubinstein P, McCullough LB, Chervenak FA. Umbilical cord blood collection: do patients really understand? *Journal of perinatal medicine*. 2007;35(4):314-21. doi: 10.1515/JPM.2007.084. PubMed PMID: 17511596.
- Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation--how, when and for whom? *Blood reviews*. 2004;18(3):167-79. doi: 10.1016/S0268-960X(03)00064-X. PubMed PMID: 15183901.
- Broxmeyer HE. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *StemBook*. Cambridge (MA)2008.
- Bradley JA, Bolton EM, Pedersen RA. Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):859-71.
- Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, et al. Human Embryonic Stem Cells Possess Immune-Privileged Properties. *Stem cells*. 2004;22(4):448-56. doi: 10.1634/stemcells.22-4-448.
- Grinnemo K-H, Kumagai-Braesch M, Månsson-Broberg A, Skottman H, Hao X, Siddiqui A, et al. Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006;13(5):712-24. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60663-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60663-3).
- Drukker M. Immunogenicity of Embryonic Stem Cells and Their Progeny. In: Irina K, Robert L, editors. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 2006. p. 391-409.
- Robertson NJ, Brook FA, Gardner RL, Cobbold SP, Waldmann H, Fairchild PJ. Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(52):20920-5. doi: 10.1073/pnas.0710265105.
- Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9864-9. doi: 10.1073/pnas.142298299. PubMed PMID: 12114532; PubMed Central PMCID: PMC125045.
- Boyd AS, Wood KJ. Characteristics of the early immune response following transplantation of mouse ES cell derived insulin-producing cell clusters. *PLoS one*. 2010;5(6):e10965. doi: 10.1371/journal.pone.0010965. PubMed PMID: 20532031; PubMed Central PMCID: PMC2881030.
- Poncelet AJ, Vercruyse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*. 2007;83(6):783-90. doi: 10.1097/01.tp.0000258649.23081.a3. PubMed PMID: 17414713.
- Swijnenburg R-J, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, et al. Embryonic Stem Cell Immunogenicity Increases Upon Differentiation After Transplantation Into Ischemic Myocardium. *Circulation*. 2005;112(9 suppl):I-166-I-72. doi: 10.1161/circulationaha.104.525824.
- Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*.

- 1966;16(3):381-90. PubMed PMID: 5336210.
38. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(4):568-84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>.
 39. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.
 40. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109(8):923-40. Epub 2011/10/01. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243147. PubMed PMID: 21960725.
 41. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology*. 2009;217(2):318-24. doi: 10.1002/path.2469.
 42. Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, Yazdi IK, Ferrari M, Simmons PJ, et al. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials*. 2012;33(21):5308-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.007. PubMed PMID: 22542609.
 43. Rolandsson S, Karlsson JC, Scheduling S, Westergren-Thorsson G. Specific subsets of mesenchymal stroma cells to treat lung disorders - Finding the Holy Grail. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2014. doi: 10.1016/j.pupt.2014.08.001. PubMed PMID: 25239767.
 44. Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:207326. Epub 2011/11/03. doi: 10.1155/2011/207326. PubMed PMID: 22046556; PubMed Central PMCID: PMC3195349.
 45. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92-5. Epub 2004/06/29. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.03.034. PubMed PMID: 15219514.
 46. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97. doi: 10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9. PubMed PMID: 12589164.
 47. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, et al. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*. 2013;95(12):2271-85. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.020. PubMed PMID: 23827856; PubMed Central PMCID: PMC4061727.
 48. Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*. 2010;122(23):2419-29. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.95971. PubMed PMID: 21098445.
 49. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):14022-7. Epub 2009/08/12. doi: 10.1073/pnas.0903201106. PubMed PMID: 19666564; PubMed Central PMCID: PMC2729013.
 50. Mazhari R, Hare JM. Translational findings from cardiovascular stem cell research. *Trends in cardiovascular medicine*. 2012;22(1):1-6. doi: 10.1016/j.tcm.2012.05.017. PubMed PMID: 22940024; PubMed Central PMCID: PMC3563254.
 51. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010;465(7299):704-12.
 52. Laflamme M. Introduction to JCPT Focused Issue on "Stem Cells and Cardiac Regenerative Medicine". *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(4):329. doi: 10.1177/1074248414535342.
 53. Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100-4. doi: 10.1038/nature11807. PubMed PMID: 23302801.
 54. Fu X. The immunogenicity of cells derived from induced pluripotent stem cells. *Cellular & molecular immunology*. 2014;11(1):14-6. doi: 10.1038/cmi.2013.60. PubMed PMID: 24336164; PubMed Central PMCID: PMC4002141.
 55. Suh CY, Wang Z, Bártulos O, Qyang Y. Advancements in Induced Pluripotent Stem Cell Technology for Cardiac Regenerative Medicine. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(4):330-9. doi: 10.1177/1074248414523676.
 56. Zimmermann W-H, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach JF, et al. Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct. *Circ Res*. 2002;90(2):223-30. doi: 10.1161/hh0202.103644.
 57. Sarvazyan N. Thinking Outside the Heart: Use of Engineered Cardiac Tissue for the Treatment of Chronic Deep Venous Insufficiency. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014;19(4):394-401. doi: 10.1177/1074248413520343. PubMed PMID: 24500906.
 58. Carrillo-Galvez AB, Cobo M, Cuevas-Ocana S, Gutierrez-Guerrero A, Sanchez-Gilbert A, Bongarzone P, et al. Mesenchymal stromal cells express GARP/LRRC32 on their Surface: Effects on their biology and immunomodulatory capacity. *Stem cells*. 2014. doi: 10.1002/stem.1821. PubMed PMID: 25182959.
 59. Fraser CJ, Hirsch BA, Dayton V, Creer MH, Neglia JP, Wagner JE, et al. First report of donor cell-derived acute leukemia as a complication of umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005;106(13):4377-80. doi: 10.1182/blood-2005-06-2551. PubMed PMID: 16118319; PubMed Central PMCID: PMC1895243.
 60. Kang BJ, Kim H, Lee SK, Kim J, Shen Y, Jung S, et al. Umbilical-cord-blood-derived mesenchymal stem cells seeded onto fibronectin-immobilized polycaprolactone nanofiber improve cardiac function. *Acta biomaterialia*. 2014;10(7):3007-17. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.013. PubMed PMID: 24657671.
 61. Ban K, Park HJ, Kim S, Andukuri A, Cho KW, Hwang JW, et al. Cell Therapy with Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Encapsulated in Injectable Nanomatrix Gel Enhances Cell Engraftment and Promotes Cardiac Repair. *ACS nano*. 2014. doi: 10.1021/nn504617g. PubMed PMID: 25210842.
 62. Kingham E, Oreffo RO. Embryonic and induced pluripotent stem cells: understanding, creating, and exploiting the nano-niche for regenerative medicine. *ACS nano*. 2013;7(3):1867-81. doi: 10.1021/nn3037094. PubMed PMID: 23414366; PubMed Central PMCID: PMC3610401.
 63. Toma I, McCaffrey T. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res*. 2012;347(1):155-75. doi: 10.1007/s00441-011-1189-3; PubMed Central PMCID: PMC21626289.