

31. Agosto

La cardiosfera ed il suo microambiente

*Il cuore è la regione dell'inatteso.
(Antonio Machado)*

L'ampia prevalenza di disfunzioni cardiache nei pazienti ci insegna che la capacità del cuore di rigenerarsi dopo un infortunio sia limitata

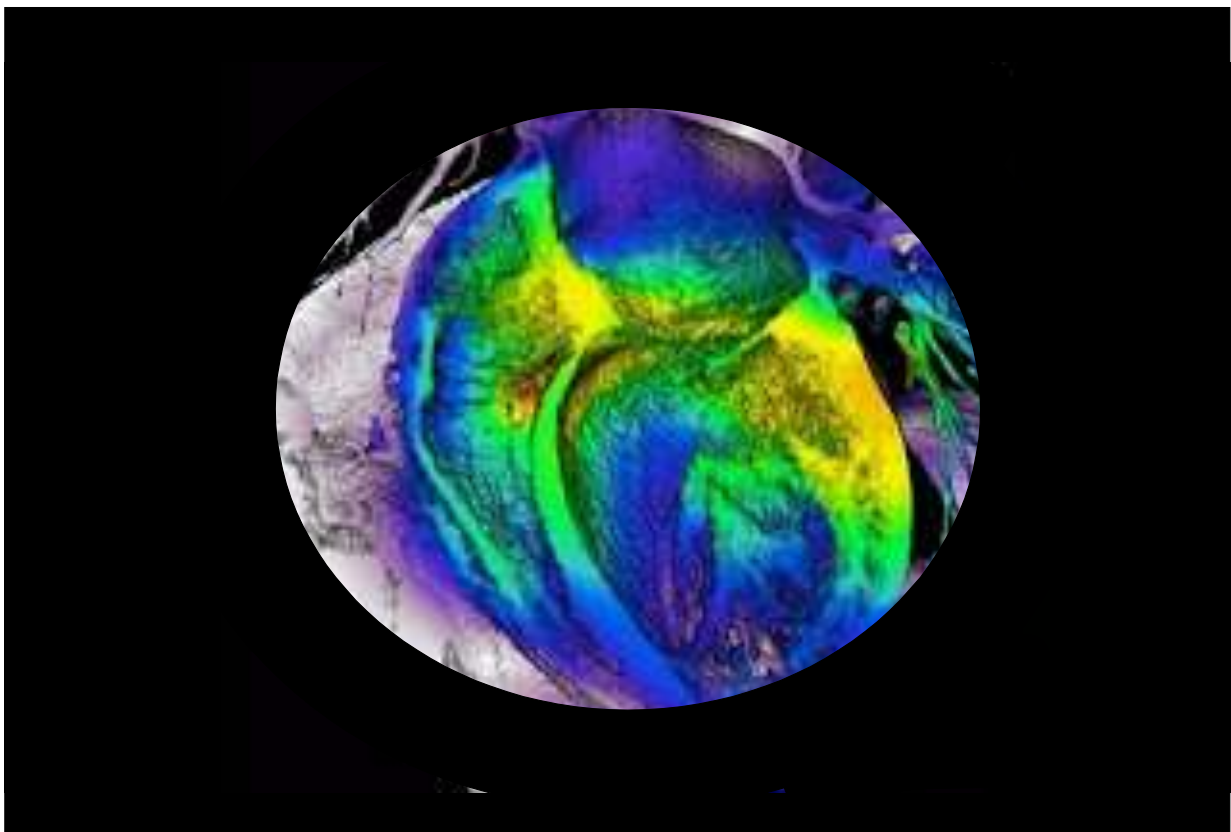
È stato dimostrato che le **cellule staminali cardiache umane adulte** rispondono a uno stato di **ipertrofia cardiaca** mediante proliferazione e rigenerazione miocardica e **all'ischemia acuta** mediante mobilitazione nella zona di confine della lesione e successiva rigenerazione, ma le cellule endogene spesso (quasi sempre) alla fine soccombono per apoptosi.

Lo sviluppo e la rigenerazione dei tessuti implicano processi strettamente coordinati e integrati: proliferazione selettiva delle **cellule staminali** e precursori residenti, differenziazione nel tipo di cellula somatica bersaglio e organizzazione morfologica spaziale.

CARDIOSFERA

Le cellule derivate dalla **cardiosfera (CDC)** sono cellule staminali adulte con il potenziale di differenziarsi in cellule endoteliali e cardiomiociti, che sono i principali tipi di cellule del cuore.

Il loro potenziale di indurre la rigenerazione cardiaca dopo un infarto miocardico è attualmente in fase di sperimentazione clinica.



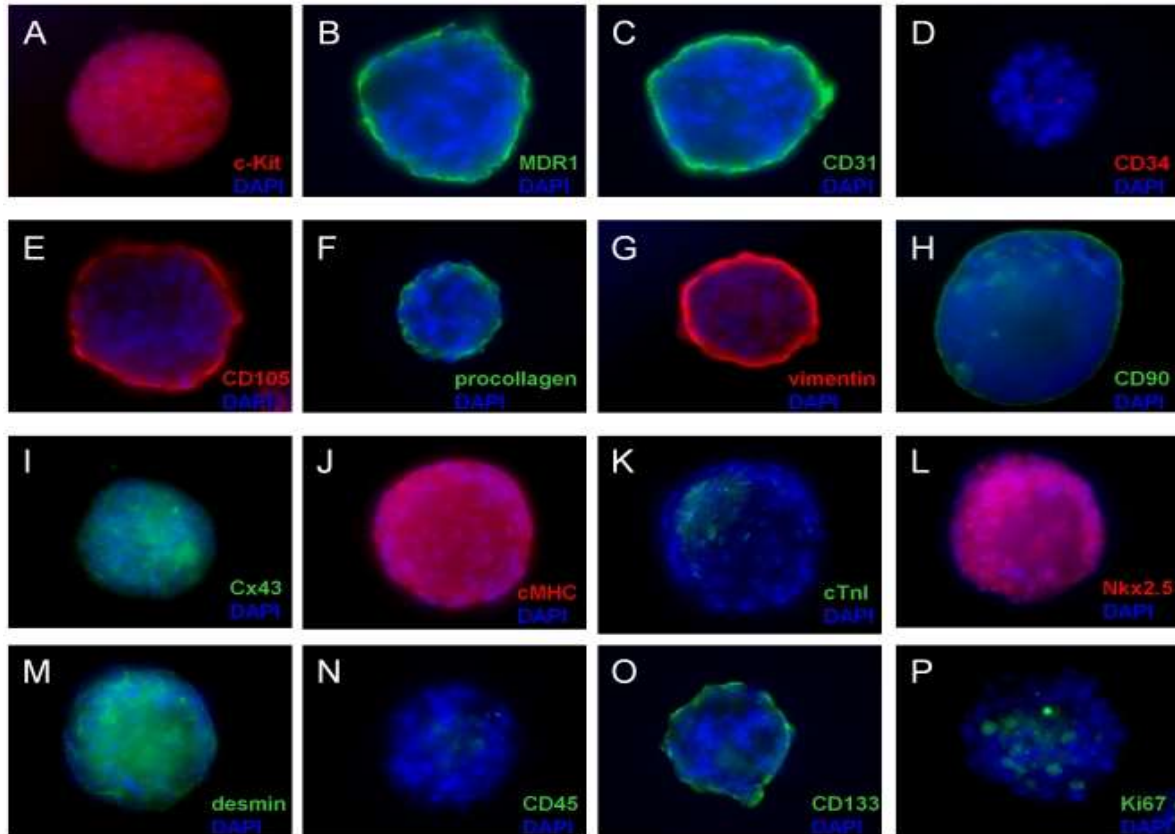
I ruolo dell'ambiente meccanico nel coordinamento di questi processi è poco compreso.

Almeno quattro laboratori hanno dimostrato che le cellule progenitrici cardiache endogene (CPC) possono essere coltivate direttamente dal tessuto cardiaco adulto in coltura primaria, come cardiosfere o la loro progenie (cellule derivate dalla cardiosfera, CDC)

Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, California, Stati Uniti d'America



ha dimostrato che la coltura diretta e l'espansione delle CPC dal tessuto miocardico sono semplici, immediate e riproducibili quando vengono utilizzate tecniche appropriate.

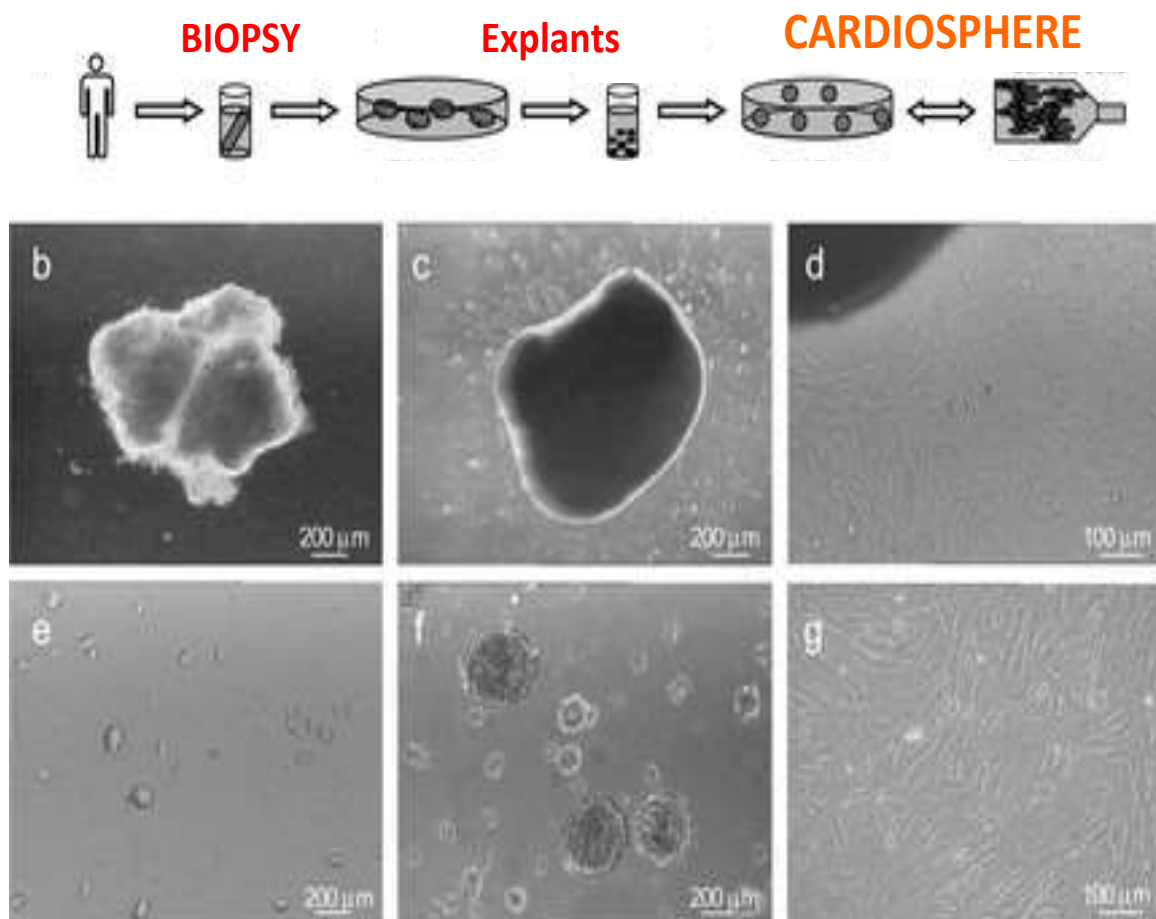


Immagini ad ampio campo di cardiosfere rappresentative immunocolorate per 16 diversi antigeni correlati al cuore.

Il team di **Rachel Ruckdeschel Smith** della *Division of Cardiology della Johns Hopkins University*, ha dimostrato come l'espansione ex vivo delle cellule staminali cardiache residenti, seguita dal trasferimento al cuore, può favorire la rigenerazione e un significativo miglioramento funzionale.

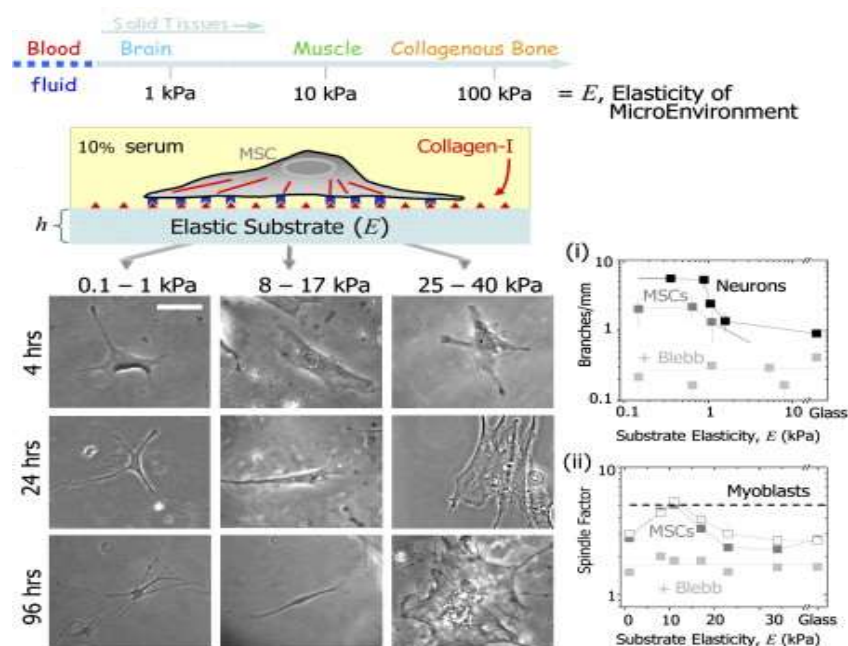
I campioni di biopsia endomiocardica percutanea cresciuti in coltura primaria sviluppano cluster multicellulari noti come *cardiosfere*, che sono stati piastrati per produrre cellule derivate dalla *cardiosfera (CDC)*. I *CDC* provenienti da campioni biotipici sono stati esaminati in vitro per prove biofisiche e citochimiche di differenziazione cardiogenica. Inoltre, *CDC umani* sono stati iniettati nella zona di confine degli infarti miocardici acuti in topi immunodeficienti. I campioni biotipici di 69 pazienti su 70 hanno prodotto cellule che formano *cardiosfere*. *Le cardiosfere e i CDC* esprimevano caratteristiche antigeniche delle cellule staminali in ogni fase del processo, nonché proteine vitali per la funzione contrattile ed elettrica cardiaca.

I *CDC umani* possono differenziarsi in miociti elettricamente funzionali in vitro e iniettati nei topi portano alla rigenerazione del miocardio e al miglioramento funzionale dopo l'infarto.



Smith RR et al *Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens*. *Circulation*. 2007 Feb 20;115(7):896-908.

I microambienti sembrano importanti nella specificazione del lignaggio delle cellule staminali, ma possono essere difficili da caratterizzare o controllare adeguatamente con i tessuti molli. In maniera approssimativa si ritiene che le matrici morbide che imitano il cervello sono neurogeniche, le matrici più rigide che imitano i muscoli sono miogeniche e le matrici relativamente rigide che imitano l'osso collagene si dimostrano osteogeniche.



Durante la settimana iniziale di coltura, la riprogrammazione di questi lignaggi è possibile con l'aggiunta di fattori di induzione solubili, ma dopo diverse settimane di coltura, le cellule si impegnano al lignaggio specificato dall'elasticità della matrice, coerente con l'impegno insensibile all'elasticità dei tipi cellulari differenziati.

Engler AJ et al. *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):677-89

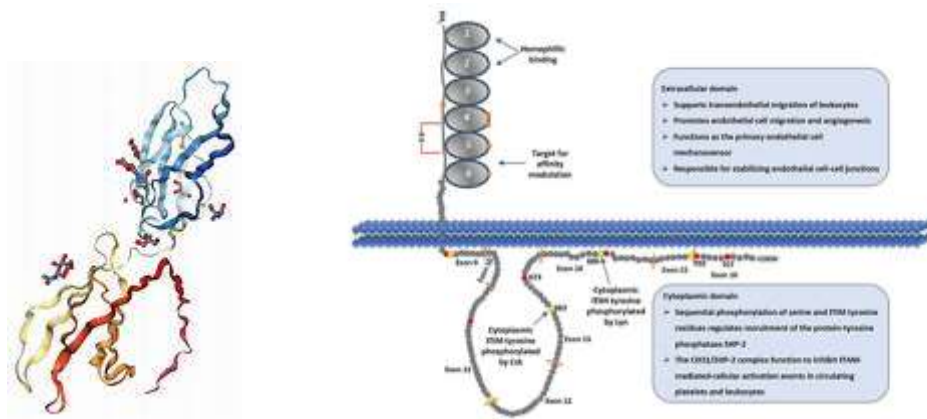
Il team del Department of Biomedical Engineering, Johns Hopkins Medical Institutions nel report

Kshitiz et al

Matrix rigidity controls endothelial differentiation and morphogenesis of cardiac precursors.

Sci Signal. 2012 Jun 5;5(227):ra41..

hanno dimostrato che i **CDC** coltivati su un substrato con una rigidità corrispondente a quella del miocardio normale producevano proporzioni più elevate di cellule con la molecola di adesione **CD31** (un marcatore di cellule endoteliali differenziate) rispetto a quelli coltivati su substrati meno o più rigidi.



CD31

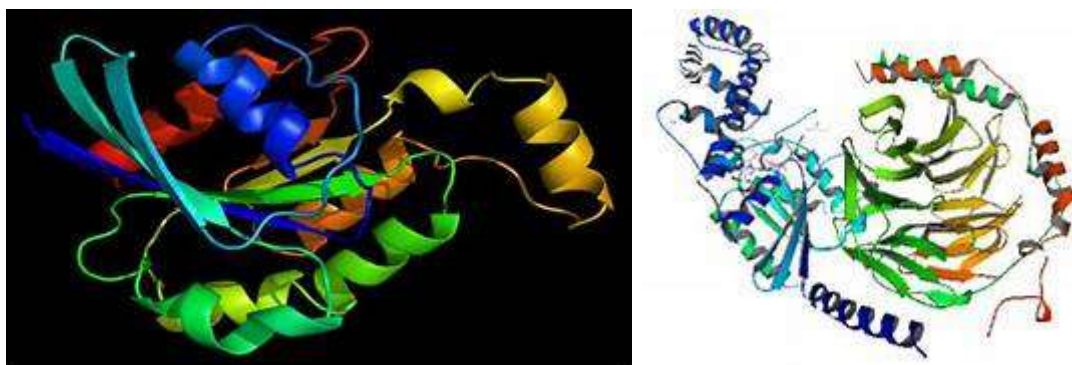
PECAM1/CD31 è una glicoproteina transmembrana con una massa molecolare di 130 kDa che probabilmente varia leggermente tra i diversi tipi cellulari, presumibilmente a causa delle differenze di glicosilazione. Il CD31 umano è composto da un ampio dominio extracellulare di 574 aminoacidi, una singola regione che attraversa la membrana di 19 residui idrofobici e un dominio citoplasmatico di 118 aminoacidi.

I **CDC coltivati** su un substrato equivalente in rigidità al miocardio si sono sviluppati in reti cellulari organizzate che ricordano i vasi sanguigni e sembravano integrarsi in modo più efficiente nel sistema vascolare del miocardio di ratto ischemico.

Il processo di rilevamento della rigidità del substrato si è verificato durante tutto il periodo di coltura in vitro e la via di segnalazione coinvolta richiedeva la proteina

p190RhoGAP

attivante la *guanosina trifosfatasi (GTPasi)* che agisce attraverso vari effettori a valle, inclusa la **GTPasi RhoA** che regola il movimento e la crescita cellulare in tutto il corpo.



GTPasi RhoA

errori nei processi della **Rho GTPasi** sono ampiamente implicati anche nelle malattie umane, inclusi vari tumori e disturbi neurologici.

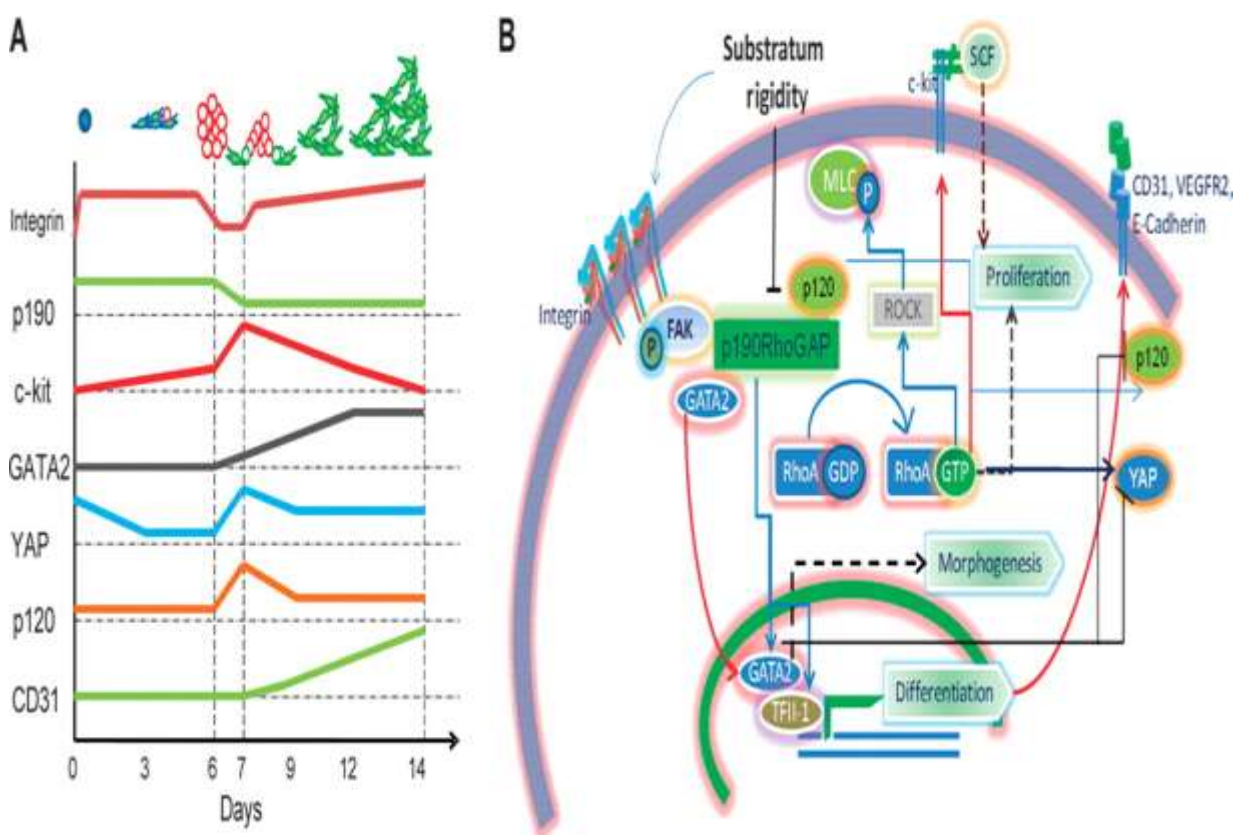
I risultati suggeriscono che la rigidità del substrato cellulare, quando corrisponde alla rigidità fisiologica stimata del tessuto, può controllare in modo coordinato la proliferazione, la differenziazione e la morfogenesi delle cellule isolate dal tessuto cardiaco nativo

Meccanicamente, l'influenza della rigidità del substrato sui processi distinti ma interconnessi che portano alla formazione di reti cellulari strutturate dipende dalla stessa specie molecolare, **p190RhoGAP**, che agisce sia in modo canonico, dipendente da RhoA, sia in modo indipendente da RhoA

Questa molecola promuove l'abbondanza e la morfogenesi del VEGFR nelle cellule endoteliali differenziate della vena ombelicale umana, suggerendo che **p190RhoGAP** agisce in modo pleiotropico

Il messaggio principale del lavoro suggerisce che mentre le cellule precursori endoteliali e cardiache multipotenti subiscono amplificazione e differenziazione, seguite da morfogenesi, è in gioco lo stesso circuito molecolare. La scelta tra i destini disponibili può essere direttamente controllata dalla regolazione endogena della concentrazione di **p190RhoGAP** mediante segnali meccanici e possibilmente altri e può essere direttamente controllata da perturbazioni esogene dell'abbondanza di questa molecola.

La rigidità del substrato coordina la proliferazione delle cellule progenitrici, la differenziazione endoteliale e la morfogenesi delle lacune attraverso la co-regolazione di vari moduli di segnalazione da parte di p190RhoGAP



(A) Schema che rappresenta l'andamento temporale delle dinamiche di abbondanza di vari attori chiave identificati nella via di meccanotrasduzione coinvolta nella differenziazione endoteliale mediata dalla rigidità dei CDC.

Le linee verticali rappresentano il giorno 0 (quando le cellule vengono seminate), il giorno 6 (quando gli sferoidi si formano e maturano), il giorno 7 (quando gli sferoidi iniziano a disperdersi) e il giorno 14 (quando si formano le reti cellulari).

(B) Riepilogo schematico del meccanismo proposto di cambiamenti fenotipici indotti dalla rigidità del substrato regolati dall'abbondanza di p190RhoGAP.

La ridotta abbondanza di p190RhoGAP aumenta l'attività di RhoA, portando ad una maggiore proliferazione di cellule staminali c-kit + e cambiamenti morfogenetici attraverso ROCK e MLC. Il silenziamento di p190RhoGAP aumenta l'abbondanza e la localizzazione sulla membrana plasmatica della p120-catenina, migliorando così la formazione del contatto cellula-cellula. L'abbondanza di p120-catenina diminuisce durante la dispersione degli sferoidi. La ridotta abbondanza di p190RhoGAP aumenta anche le quantità di *TFII-1* e *GATA2* e localizzazione di *GATA2* nel nucleo, con conseguente differenziazione endoteliale e controllo della morfologia cellulare collettiva.

La rigidità del substrato controlla anche la localizzazione e l'abbondanza di YAP, con un aumento transitorio durante l'aggregazione cellulare e una successiva riduzione durante il conseguente aumento dell'abbondanza di *GATA2*. *GATA2* promuove l'aumento dell'abbondanza di *CD31* e *VEGFR*, eventi che accompagnano la differenziazione endoteliale.

In sintesi:

Le cellule multipotenti derivate dal tessuto cardiaco nativo monitorano continuamente la rigidità del substrato cellulare e mostravano una maggiore proliferazione, differenziazione endoteliale e morfogenesi quando la rigidità del substrato cellulare corrispondeva strettamente a quella del miocardio.

La meccanoregolazione di questi diversi processi richiedeva **p190RhoGAP**, una proteina che attiva la guanosina trifosfatasi per RhoA, che agisce attraverso meccanismi RhoA-dipendenti e indipendenti.

Sessanta pacchetti all'anno

Un uomo di 68 anni con una storia di **malattia coronarica**, **diabete di tipo 2**, **ipertensione** e **broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)** si presenta per una valutazione iniziale della BPCO.



Ha una storia di consumo di sigarette di **60 pacchetti all'anno** e attualmente fuma **un pacchetto di sigarette al giorno**.

Quattro mesi fa, è stato ricoverato in ospedale con **aumento della tosse** e della produzione di espettorato con grave mancanza di respiro e gli è stata diagnosticata **un'insufficienza respiratoria ipercapnica acuta** che necessitava di ventilazione **a pressione positiva non invasiva (NPPV)** per un giorno.

È stato trattato con **prednisone e doxiciclina** ed è stato dimesso dopo 3 giorni.

Anche lui era stato ricoverato in ospedale circa 6 mesi prima con una riacutizzazione, ma in quel momento **non era necessaria la NPPV**.

Oggi riferisce **lieve dispnea e occasionale** tosse non produttiva. È in grado di camminare comodamente su un terreno pianeggiante ma si sente senza fiato camminando in salita.

Può compiere tutte le sue attività della vita quotidiana senza limitazioni.

I suoi farmaci attuali includono:

carvedilolo 6,25 mg due volte al giorno,
atorvastatina 40 mg al giorno,
clortalidone 12,5 mg al giorno,
cloruro di potassio 20 mEq al giorno
albuterolo per via inalatoria secondo necessità.

Un **ecocardiogramma transtoracico** rivela un'anomalia regionale della motilità della parete anterolaterale, una frazione di eiezione ventricolare sinistra stimata tra **il 55% e il 60%** e una normale funzione ventricolare destra senza evidenza di ipertensione polmonare.

Non vi è evidenza di alcuna disfunzione valvolare significativa. Un elettrocardiogramma rivela un *ritmo sinusale normale con deviazione dell'asse sinistro*, un *blocco fascicolare anteriore sinistro* e un *intervallo QT corretto di 507 msec*.

I risultati dei test di funzionalità polmonare sono i seguenti:

Rapporto FEV1 / FVC: 58%

FEV1 : 44% del previsto e senza significativa reattività ai broncodilatatori

Capacità polmonare totale: 120% del previsto

Capacità di diffusione del monossido di carbonio: 79% del previsto

Un emocromo completo con differenziale mostra una conta degli *eosinofili di 99 cellule/mm³* (intervallo di riferimento 0–350).

Oltre a raccomandare la cessazione del fumo, la somministrazione di vaccinazioni adeguate e il riferimento alla riabilitazione polmonare, quale delle seguenti terapie farmacologiche dovrebbe essere iniziata?

- » **1-Fluticasone propionato e salmeterolo *per via inalatoria***
- » **2-Tiotropio *per via inalatoria***
- » **3-Umeclidinio e vilanterolo *per inalazione***
- » **4-Teofillina orale**
- » **5-Salmeterolo *per inalazione***

FERIÆ SUNT SUPRÆ



AD OPUS...