

Impactul epigenetic în dezvoltarea bolilor cardiovasculare

Florin Iordache, Cosmin Buzila

Bolile cardiovasculare (BCV) sunt principala cauză de deces la nivel mondial, indiferent de statutul socio-economic, origine etnică și sex (1). Contribuția genetică în BCV poate varia foarte mult, iar interacțiunile mediu-gene (mediate de modificări epigenetice) pot afecta prevalența BCV (1, 2). În ciuda progreselor considerabile în tratamentul acestora, fiziopatologia complexă a BCV nu este încă clară. În ultimii ani, abordări genetice, inclusiv de epigenetică și medicină personalizată au inițiat un nou mod de a trata bolile cardiovasculare (3). Epigenetica face referire la modificările ereditare/dobândite care nu modifică direct secvența de nucleotide din ADN dar care afectează gradul de condensare al cromatinei determinând astfel modificarea expresiei genelor care controlează diferitele funcții celulare. Rolul său în înțelegerea și tratarea bolilor cardiovasculare, cum ar fi boala coronariană, insuficiența cardiacă, hipertrofia cardiacă, diabet, și ateroscleroză este încă neclar (4). Acetilarea/deacetilarea histonelor, metilarea ADN-ului și metilarea histonelor sunt diferite modificări epigenetice care controlează expresia genelor implicate în dezvoltarea bolilor cardiovasculare. Terapia cu celule stem deține premisele pentru tratamentul bolilor cardiovasculare. Diferențierea celulelor stem către diferite tipuri de celule vasculare poate contribui la aplicarea unor terapii celulare în diferite patologii ca boli de inimă, diabet, ateroscleroză, însă mecanismele epigenetice care controlează aceste diferențieri sunt încă neclare (1, 2, 5, 6). *Scopul acestui proiect este de a găsi acei reglatori care alterează expresia genelor în celulele progenitoare vasculare din bolile cardiovasculare pentru a realiza o terapie țintită.* Disfuncția endotelială reprezintă un semn precoce al leziunilor în sistemul vascular. O serie de factori de risc, cum ar fi ateroscleroza, hiperlipidemia, diabetul, hipertensiunea arterială determină endoteliul vascular să își reprogrameze transcriptomul (7). Aceste modificări profunde care au loc la nivelul cromatinei se bazează pe interacțiunea dintre factorii de transcripție și secvența specifică de ADN, interacție ce este controlată de mecanisme epigenetice (8). Nivelul crescut de LDL oxidat circulant, creșterea fluxului de sânge și inflamația excesivă contribuie la apariția de leziuni la nivelul endoteliului (7). Indiferent de natura factorilor de stres, transcriptomul celulelor endoteliale vasculare este profund alterat. De exemplu, inhibarea transcrierii genei eNOS și stimularea simultană a genei ET-1(endotelin1) determină vasodilatație și creșterea tonusului vascular în celulele endoteliale.

Activarea transcrierii moleculelor de adeziune, pe de altă parte, permite leucocitelor circulante atașarea la endoteliu și stabilirea unui micromediu proinflamator (9, 10). Prin urmare, investigarea mecanismelor epigenetice folosind tehnici "high-throughput" ca de exemplu microarray, va duce la o îmbunătățire a cunoaștințelor noastre legate de mecanismele care contribuie la apariția bolilor cardiovasculare și la găsirea de noi ținte pentru terapie și prevenție. Descoperirile recente în reglarea transcripțională a aterosclerozei și a diabetului zaharat sugerează o implicare tot mai mare a echipamentului epigenetic. Cozile N-terminale ale histonelor de bază, H3 și H4, în special, pot fi modificate posttranslațional (11). Termenul "Codul histonic" a fost elaborat pentru a corela un set specific de modificări histonice cu un anumit efect transcripțional. Deși încă un subiect aflat în continuă dezbateră, se crede în general că acetilarea histonelor H3 și H4 la nivelul regiunilor promotor este sinonimă cu activarea transcripției iar metilarea histonei H3 la lizina 4 (H3K4) poate permite activarea transcripției, iar cea de la nivelul lizinei 9 (H3K9) este corelată cu represia cromatinei. Diabetul zaharat este una dintre principalele cauze care determină leziuni la nivelul endoteliului. Brownlee și colegii săi au examinat efectul hiperglicemiei tranzitorii asupra funcției endoteliale. Acești autori au constatat că tratamentul cu glucoză peste limita fiziologică pentru o perioadă scurtă de timp (16 ore) a indus o activare prelungită a VCAM-1 în celulele endoteliale aortice bovine chiar și atunci când aceste celule au fost trecute în condiții de glucoză scăzută pentru 6 zile suplimentare, un fenomen numit "memorie metabolică" (3,7,10). Imunoprecipitarea cromatinei a relevat o creștere marcantă a monometilării histonei H4 la nivelul lizinei 4 (H4K4) la nivelul promotorului proximal al genei p65 mediată de histon-metiltransferaza SET7/9. Hipertrofia cardiacă este legată de acetilarea histonelor și activitatea histon-acetiltransferazelor (HAT) care au rol pozitiv în hipertrofia cardiacă (13). Alterarea metilării ADN și activitatea miRNA-urilor s-au dovedit a fi asociate cu ateroscleroza. Este documentat faptul că re-exprimarea anumitor gene fetale în inima adultă contribuie la dezvoltarea sindromului insuficienței cardiace, care este adesea asociat cu remodelarea cardiacă patologică care cuprinde schimbări de mărime și formă și modificări în masa cardiacă (14). Astfel, se pare că abordările care vizează modificările epigenetice care au loc în bolile cardiovasculare pot avea un impact terapeutic semnificativ. Cu toate acestea, până în prezent nu există studii clinice sau raportări terapeutice majore în care să se țină seama de diferite mecanisme epigenetice în bolile cardiovasculare, chiar dacă inhibitori de deacetilare ca Tricostatin A s-au dovedit a avea efecte pozitive (15).

Acetilarea este una dintre cele mai bine studiate modificări epigenetice. Alterarea acetilării și modificarea reglării genice se corelează cu insuficiența cardiacă. Trei gene asociate cu angiogeneza s-au dovedit a fi acetilate diferențiat, indiferent de etiologia insuficienței cardiace. Acestea sunt PECAM - 1, angiomin 2 și proteina-24 activată de Rho-GTPaze (3, 16). Studii de acetilare pe întreg setul de gene implicate în dezvoltarea cardiacă au arătat în mod semnificativ o reducere a acetilării promotorilor genelor cu expresie crescută în insuficiența cardiacă. Activitatea histon-deacetilazelor (HDAC), a fost de asemenea implicată în ambele căi pro și anti-hipertrofice, însă rezultatele sunt contradictorii și sunt necesare eforturi suplimentare pentru a înțelege complet rolul acestor enzime în bolile cardiovasculare (11). Cele două clase de HDAC s-au dovedit a avea efecte opuse asupra hipertrofiei cardiace, HDAC de clasa I fiind pro-hipertrofice iar clasa IIa HDAC fiind antihipertrofică. O expresie crescută de HDAC2 în cardiomiocite imită creșterea hipertrofică într-o manieră dependentă de Akt. Supra-exprimarea în șoareci transgenici a HDAC2 a determinat o hipertrofie cardiacă iar șoarecii HDAC2-deficienți au fost protejați de hipertrofie cardiacă indusă de isoproterenol (13). HDAC1/2 nu se leagă direct la ADN și cel mai probabil sunt inactive în absența unui partener cu care să interacționeze. Prin urmare, complexul în care sunt încorporate dictează contextul lor funcțional.

Izolarea și diferențierea celulelor stem mezenchimale din lichidul amniotic (AFSC)

Lichidul amniotic (5 mL) este recoltat prin amniocenteza (săptămâna 16-18 de sarcină), pus într-un tub Falcon și centrifugat la 400g, 10 minute. Se arunca supernatantul și apoi se adaugă peste sediment 4 ml mediu de cultură Amniomax cu 10% ser și 1% antibiotic și se omogenizează sedimentul. Tot conținutul se transferă pe o placă de cultură și se incubează în incubatoare cu 5% CO₂ și 21% O₂, la 37°C. Cultura se păstrează în incubator 3-5 zile fără schimbarea mediului de, pentru a permite celulelor să se ataseze de placă. Apoi mediul se schimbă de două ori pe săptămână. Când cultura ajunge la confluență, celulele se pasează în subculturi sau se congelează. După 10 zile, cultura primară a fost pasată iar celulele cultivate în mediu specific de diferențiere suplimentat cu factori de creștere. Diferențierea endotelială a AFSC a fost realizată prin cultivare în mediu M200 suplimentat cu 10% FBS (ser fetal bovin), 40 ng/mL *factor de creștere endotelial vascular (VEGF)*, 20 ng/ml *factor de creștere insulinic (IGF-1)*, 10 ng/ml *factor de creștere epidermică (EGF)*, 10 ng/ml *factor de creștere a fibroblastelor (bFGF)*, 100 μg/ml penicilină, 100 μg/ml streptomycin și 50 μg/ml neomicina (toate achiziționate de la Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Statele Unite Ale Americii).

Citometria în flux a fost utilizată pentru evaluarea expresiei markerilor de suprafață specifici celulelor endoteliiale (Gallios, Beckman-Coulter, California, SUA). AFSC differentiate (1×10^5 celule/marker) au fost marcate cu anticorpi primari conjugați cu fluorocrom FITC - Fluorescein-izotiocianat și PE - Phycoerythrin fata de CD29 (integrină $\beta 1$), CD31 (PECAM-1), CD49e (integrină $\alpha 5$), CD54 (ICAM-1), CD56 (NCAM), CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (endoglină), CD146 (MCAM) și VEGFR2 (Beckman-Coulter). AFSC au fost detașate folosind acutază (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA) și spălate în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS). Celulele au fost apoi incubate cu anticorpii primari la temperatura camerei în întuneric timp de 30 de minute. Mai mult, celulele au fost spălate și centrifugate la 400 g, 10 min, în PBS (soluție tampon fosfat) cu 1 % BSA. Pentru controale negative, celulele au fost marcate cu anticorpii IgG izotip (Beckman-Coulter, California, SUA). Datele de citometrie în flux au fost analizate folosind software-ul Gallios 1.0 (Beckman-Coulter, California, SUA).

Caracterizarea celulelor progenitoare endoteliale (EPC)

Nivelurile de expresie genică în AFSC și EPC au fost evaluate prin tehnica qRT-PCR. ARN-ul celular total a fost izolat din celulele folosind RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania) iar reacția de reverstranscriere a fost efectuată folosind polimerază M-MLV (Thermo Fischer Scientific, SUA). Nivelurile de ARNm ale genelor asociate endoteliului vascular (PECAM-1, ICAM-1, VE-Cadherin, eNOS și vWF) au fost cuantificate folosind sonde de hidroliză TaqMan (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SUA). Rezultatele au fost exprimate folosind cuantificarea relativă ($2^{-\Delta CT}$), unde ΔCT reprezintă diferența CT între valorile pentru AFSC și EPC. Testul de preluare a Dil-Ac-LDL. EPC derivate de AFSC au fost incubate cu 6 $\mu\text{g/mL}$ Dil-AcLDL-PE (PE conjugat cu lipoproteine de joasă densitate acetilată, ThermoFischer Scientific, SUA). Celulele au fost incubate timp de 2 ore la 37°C cu 5% CO_2 și 21% O_2 , spălate cu PBS și fixate cu 1%PFA (paraformaldehidă) timp de 10 minute la temperatura camerei. Pentru evaluarea capacității de legare a aglutininei Ulex europaeus (UEA) la EPC, celulele au fost incubate cu 0,01 mg/mL FITC – Ulex europaeus lectină (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA) timp de 2 ore, urmată de o spălare cu PBS. Nuclul au fost contracolorate cu DAPI (1 mg/mL). Fotomicrografiile au fost realizate cu o cameră digitală Digital Net Camera DN100 folosind un microscop Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japonia). Pentru a evalua formarea rețelelor vasculare în Matrigel, celulele au fost însămânțate în plăci cu 96 de godeuri la o densitate de 3.000 de celule per godeu.

Pe scurt, s-au adăugat 50 μ L de Matrigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA) în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri și s-au lăsat să se solidifice timp de 30 de minute la 37°C. După polimerizarea Matrigel, s-a adăugat suspensie celulară și s-a incubat timp de 4 ore. Formarea tuburilor a fost observată folosind un microscop Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japonia) echipat cu o cameră digitală (Digital Net Camera DN100).

Screening-ul prin tehnici de microarray al microARN-urilor implicate în diferențierea celulelor endoteliale

Prin PCR microarray am analizat expresia a 84 de miARN-uri exprimate în timpul diferențierii celulare și dezvoltării organismului. Acest panel oferă o modalitate convenabilă de a analiza miARN-urile cele mai relevante pentru diferențierea celulelor. miARN-uri au fost selectate cu atenție în corelație cu diferite stadii de dezvoltare, de la celulele stem până la diferențierea terminală. Rezultatele din această matrice pot servi pentru identificarea de markeri moleculari pentru anumite celule stem și/sau procese specifice de diferențiere a celulelor stem. Rezultatele pot ajuta, de asemenea, la identificarea miARN-urilor asociate cu funcția anumitor celule sau tipuri de țesut.

Pentru analiza profilului miRNA-urilor s-a utilizat următorul protocol:

- extracția ARN din AFSC și EPC
- retranscrierea ARN în cDNA
- realizarea metodei de PCR array folosind kitul miScript® miRNA PCR Array Human Cell Differentiation & Development kit
- analiza datelor utilizând software de bioinformatică

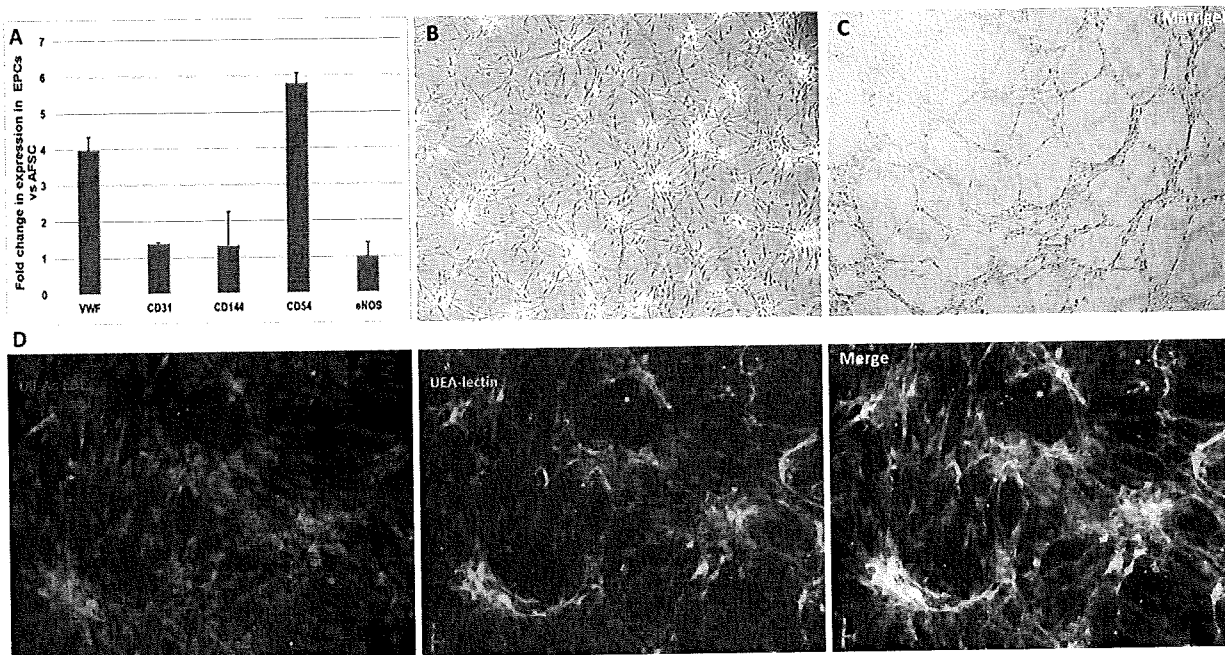


Figura 1. A. Expresia ARNm pentru vWF, CD31, CD144, CD54, eNOS în EPC prin tehnica Real-time PCR. B. Morfologia EPC după diferențierea din AFSC. C. Testul de formare de tubi vasculari pe Matrigel. D. Testul de inglobare a Dil-Ac-LDL (roșu) și legare a lectinei UEA (verde) pentru demonstrarea diferențierii în celule endoteliale.

Rezultatele noastre au aratat faptul ca diferențierea EPC din AFSC a avut loc după 10 zile de cultivare în mediu specific endotelial suplimentat cu 40 ng / ml VEGF, 20 ng / ml IGF-1, 10 ng / ml EGF și 10 ng / ml bFGF. După 10 zile celulele și-au schimbat morfologia, trecând de la un fenotip fibroblast-like la un fenotip epitelial-like (Fig. 1B). De asemenea celulele încep să exprime markeri endoteliali specifici, cum ar fi vWF, CD31, CD144, CD54 și eNOS (Fig. 1A). AFSC diferențiate sunt capabile să formeze rețele vasculare atunci când sunt cultivate pe Matrigel (Fig. 1C). Mai mult, aceste celule sunt capabile să încorporeze Dil-Ac-LDL și să lege lectina UEA (Fig. 1D), sugerând un fenotip endotelial.

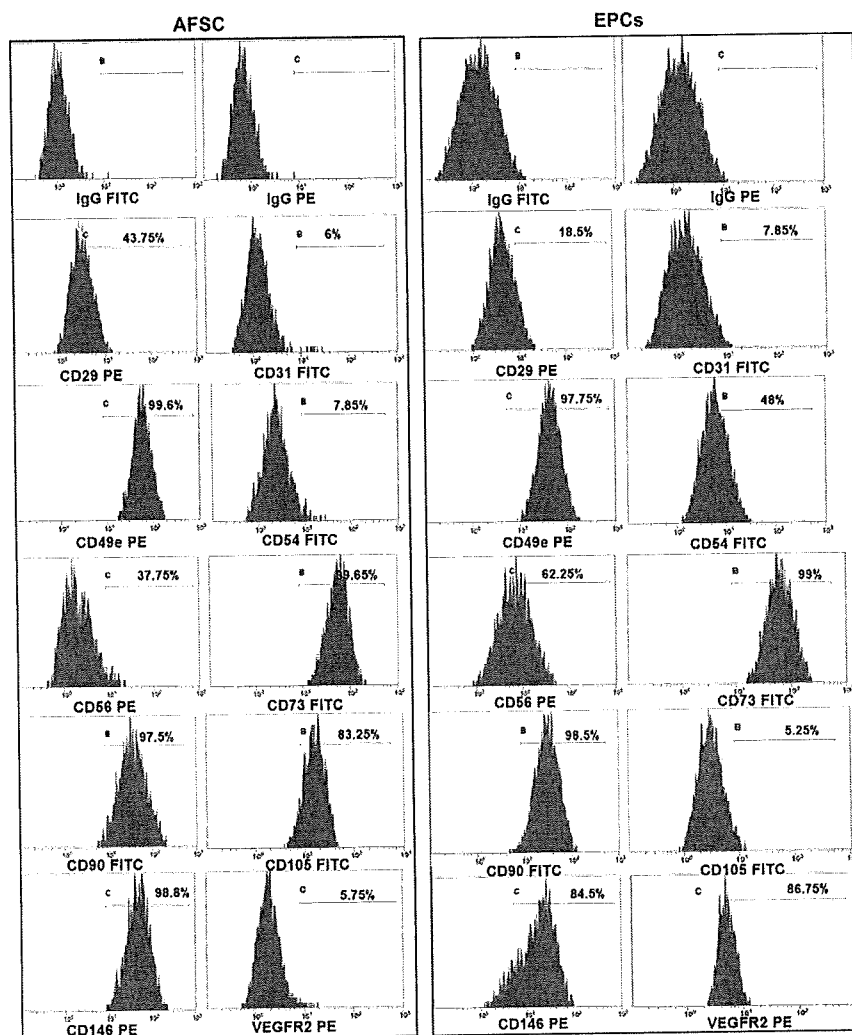


Figura 2. Profilul imunofenotipic al AFSC si EPC

Pentru evidențierea diferențierii AFSC in EPC a fost utilizată citometria în flux utilizând anticorpi specifici marcați fluorescent (Gallios, Beckman-Coulter). Celulele (1×10^5 celule/marker) au fost marcate cu anticorpi primari conjugați cu fluorocromi (FITC - Fluorescein-izotiocianat și PE - Ficoeritrina) pentru CD29 (integrină $\beta 1$), CD31 (PECAM-1), CD49e (integrină $\alpha 5$), CD54 (ICAM-1), CD56 (NCAM), CD73, CD90 (Thy-1), CD105 (endoglină), CD146 (MCAM) și VEGFR2 (Beckman-Coulter). Rezultatele obținute au arătat că diferențierea către EPC s-a realizat, celulele exprimând markeri specifici endoteliali: CD29 18.5%; CD49e 97.7%; CD54 48%; CD56 62%; CD73 99%; CD90 98.5%; CD105 5.25%; CD146 84.5% și VEGFR2 86.7% (Fig. 2).

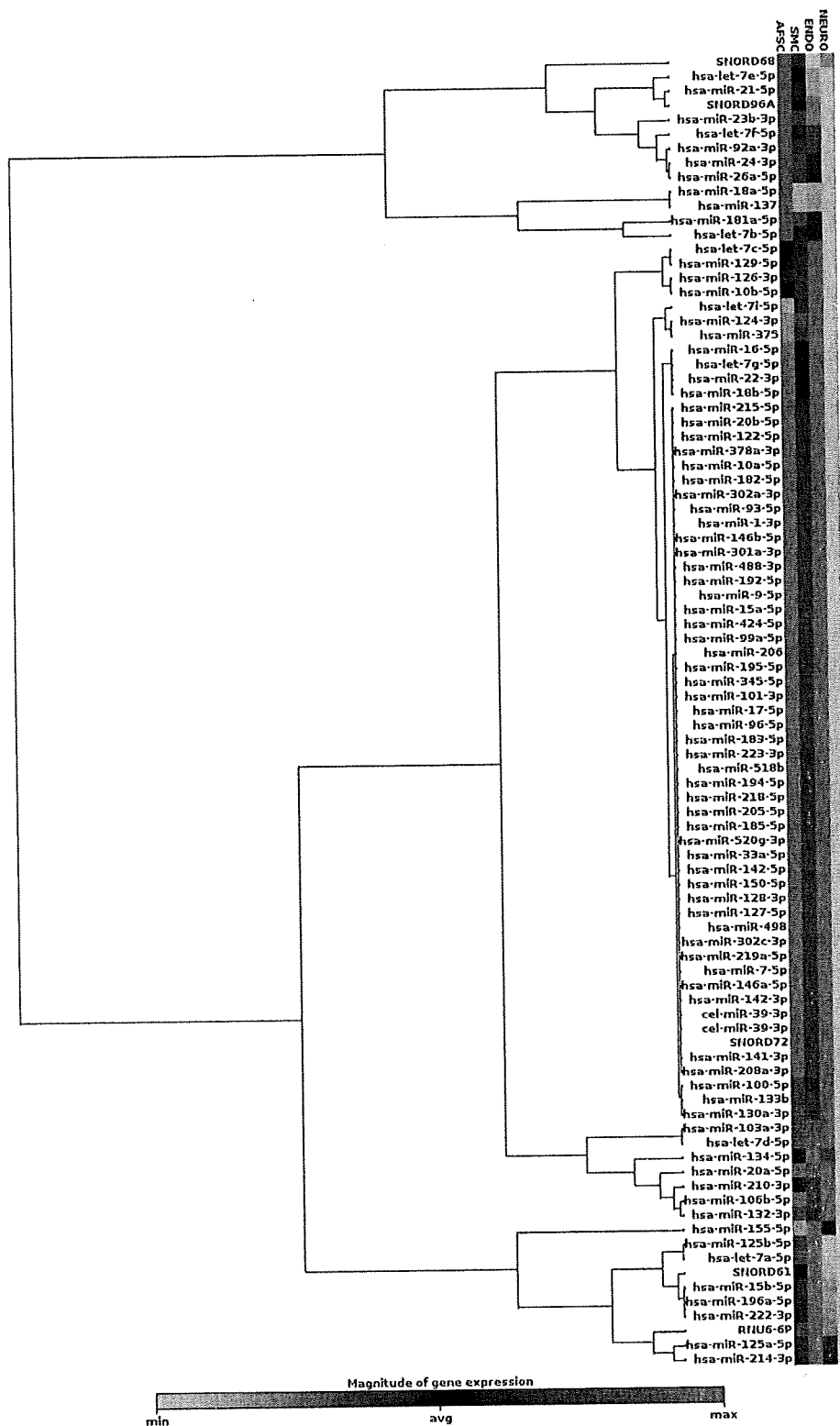


Figura 3. Reprezentarea sub forma de clustere functionale a miRNA prezente in AFSC nediferentiate si in EPC.

Rezultatele obtinute de noi prin tehnica PCR array au aratat o expresie crescuta semnificativ pentru miRNA-106b-5p, miRNA-155-5p, miRNA-126-3p, miRNA-22-3p si o scaderea a expresiei miRNA-let7e-5p, miRNA125a-5p, miRNA-125b-5p, miRNA-92a-3p (Fig. 3, 4).

EPC contribuie la reendotelizare și neovascularizare și protejează împotriva leziunilor vasculare și a ischemiei diferitelor organe. Scaderea expresiei miRNA-126 în EPC de la pacienții diabetici, contribuie la disfuncția EPC, inclusiv capacitatea de migrare afectată [15].

În experimentele realizate de noi am găsit în EPC differentiate din AFSC o expresie crescută a miRNA-126 (Fig. 4). Acest lucru fiind identificat și de Pan și colaboratorii care au aratat că supraexpresia miR-126 a promovat proliferarea, migrarea și formarea de tubi, a scăzut expresia ROS și a crescut producția de NO în EPC prin activarea căii de semnalizare PI3K/Akt/eNOS. De asemenea EPC în care s-a supraexprimat miR-126 au fost mai eficiente decât EPC normale în atenuarea volumului infarctului și a (scorul neurologic în deficit) NDS și în creșterea (densitatea microvasculară cerebrală) cMVD, (fluxul de sânge cerebral) CBF și angiogenezei, sugerând că supraexpresia miR-126 poate îmbunătăți funcția EPC-urilor *in vitro* și *in vivo* [16].

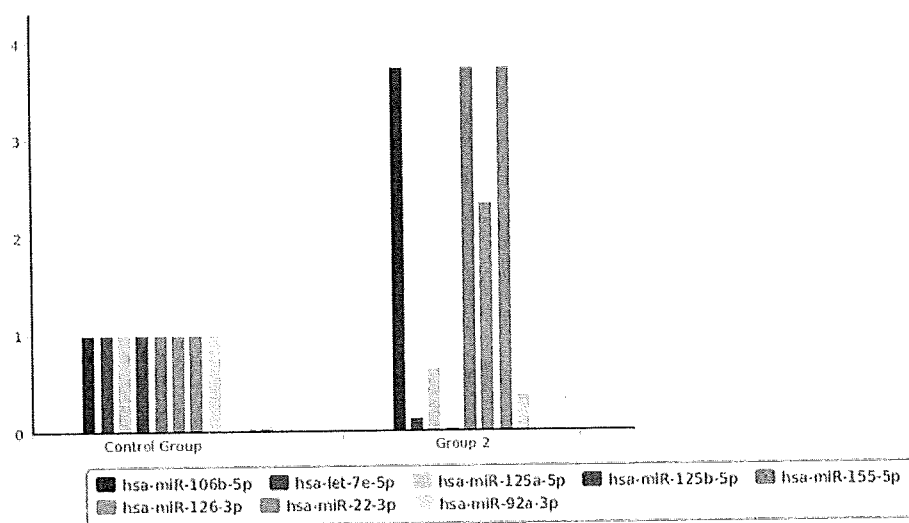


Figura 4. miRNA supraexprimate și subexprimate semnificativ în EPC

Membrii grupului miRNA let-7 joacă un rol cheie în modularea răspunsurilor inflamatorii. Proliferarea celulelor musculare netede vasculare (SMC) și disfuncția celulelor endoteliale (EC) sunt critice în patogenia aterosclerozei, inclusiv în cazul diabetului zaharat. Brennan și colaboratorii au aratat că nivelurile de let-7 sunt scăzute în plăcile carotide umane diabetice și într-un model de ateroscleroză asociată diabetului (DAA) utilizând șoareci diabetici ApoE(-/-).

In vitro, factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF) și factorul de necroză tumorală alfa ($\text{TNF-}\alpha$) induse de SMC vascular și activarea EC au fost asociate cu o expresie redusă a miRNA-let-7, prin Lin28b, un regulator negativ al biogenezei let-7. Supraexprimarea ectopică a let-7 în SMC a inhibat răspunsurile inflamatorii, inclusiv proliferarea, migrarea, aderența monocitelor și activarea NF-kB. Potențialul terapeutic al restabilirii nivelurilor de let-7 folosind un mimic let-7 a fost testat de Brennan și colaboratorii in vitro în SMC folosind o lipidă antiinflamatoare endogenă (lipoxină A4) *ex vivo* în aortele murine și *in vivo* prin injectare în vena cozii într-un model murin de 24 de ore. Acestia au observat modificări semnificative ale secretomului ca răspuns la terapia let-7. Restaurarea expresiei let-7 ar putea oferi o nouă țintă pentru o abordare antiinflamatoare în boala vasculară diabetică [17]. Aceste rezultate susțin și rezultatele obținute de noi, expresia miRNA-let 7 fiind scăzută în EPC diferențiate din AFSC (Fig. 4).

VE-caderina (CD144) funcționează ca o proteină de barieră endotelială care controlează permeabilitatea endotelială și transmigrarea leucocitelor. Studiile indică faptul că VE-caderina joacă, de asemenea, un rol vital în angiogeneză. miRNA-22 joacă un rol important în bolile cardiovasculare, inclusiv hipertrofia cardiacă și insuficiența cardiacă. Gu și colaboratorii au identificat interacțiunea dintre miRNA-22 cu ARNm VE-cadherin. Supraexprimarea miRNA-22 în celulele endoteliale crește sinteza citokinelor proinflamatorii. Injectarea miRNA-22 are ca rezultat creșterea activității mieloperoxidazei în plămânii șoarecelui. Mai mult, injectarea miRNA-22 în embrionii transgenici zebrafish marcați fluorescent Tg(fli1:EGFP) a provocat o dezvoltare vasculară defectuoasă în vasele dorsale și intersegmentare, iar markerii vasculari au fost suprimați semnificativ în acești embrioni. În concluzie studiul realizat de Gu și colaboratorii demonstrează că țintirea conservată a VE-caderinei de către miR-22 reglează inflamația endotelială, leziunile tisulare și angiogeneza [18].

Expresia microARN-125a-5p în EPC este scăzută comparativ cu cea din AFSC (Fig. 3, 4). Folosind qRT-PCR, Che și colaboratorii au arătat că expresia miARN-125a-5p (mir-125a-5p) a fost de aproximativ 2,9 ori mai mare în celulele endoteliale îmbătrânite (OEC) în comparație cu probele colectate de la animale tinere. Testele western blot au arătat un nivel de expresie mai scăzut al unei ținte miARN-125a-5p cunoscută sub denumirea de factor de amplificare a transcripției înrudit (RTEF-1) în OEC în comparație cu nivelurile sale de expresie în celulele tinere. Supraexprimarea miARN-125a-5p în celulele endoteliale tinere (YEC) folosind pre-miARN-125a-5p a cauzat inhibarea RTEF-1, sintaza oxidului nitric endotelial (eNOS) și a

factorului de creștere a endoteliului vascular (VEGF) și a dus la afectarea angiogenezei, așa cum au evidențiat prin testele de formare a sferoizilor și de formare a tuburilor *in vitro*. În schimb, reprimarea miARN-125a-5p în OEC folosind anti-miARN-125a-5p a crescut expresia RTEF-1, eNOS și VEGF și a îmbunătățit angiogeneza EC [19].

Ateroscleroza este indusa de factori multipli, inclusiv hipertensiunea arterială, hiperlipidemia și fumatul, iar patogeneza acesteia nu a fost pe deplin elucidată. Xu și colaboratorii au demonstrat că microARN-urile posedă un mare potențial anti-aterosclerotic, dar funcția precisă a miRNA-92a-3p în ateroscleroză și mecanismul său molecular potențial nu au fost bine clarificate. Utilizând citometriei în flux și testul MTT acestia au evaluat efectele lipoproteinei de joasă densitate oxidate (ox-LDL) privind proliferarea și apoptoza celulelor endoteliale din vena ombilicală umană (HUVECs). Nivelurile de expresie ale miRNA-92a-3p și Sirtuin 6 (SIRT6) în HUVEC expuse la ox-LDL au fost estimate prin metoda RT-qPCR. În plus, acestia au măsurat nivelurile proteice ale SIRT6, c-Jun N-terminal kinazei (JNK), p-JNK, protein kinazei activate cu mitogen p38 (p38 MAPK) și p38 MAPK (p-p38 MAPK). Relația dintre miRNA-92a-3p și SIRT6 a fost confirmată prin testul dual-luciferaze reporter. Xu și colaboratorii au aratat că Ox-LDL a indus apoptoza și stresul oxidativ în HUVEC-uri în moduri dependente de concentrație și timp. În schimb, blocarea miRNA-92a-3p a inhibat apoptoza și expresia SIRT6 în HUVEC. Supraexprimarea miRNA-92a-3p a crescut nivelurile de apoptoză și fosforilare ale JNK și p38 MAPK, și a inhibat proliferarea în HUVEC-uri induse de ox-LDL. În plus, SIRT6 a fost o țintă a miRNA-92a-3p. miRNA-92a-3p a reglat negativ expresia SIRT6 în HUVEC induse de ox-LDL pentru a activa calea de semnalizare MAPK *in vitro*. În concluzie miRNA-92a-3p a promovat apoptoza HUVEC și a suprimat proliferarea în HUVEC induse de ox-LDL prin țintirea expresiei SIRT6 și activarea căii de semnalizare MAPK [20]. Aceste rezultate se corelează și cu experimentele noastre de microarray în care am determinat un nivel scăzut al miR-92a-3p în EPC comparativ cu AFSC (Fig. 4).

Terapia pe bază de celule stem în bolile cardiovasculare, în special boala cardiacă ischemică (BCI), este o abordare promițătoare pentru facilitarea neovascularizării prin migrarea celulelor stem la locul ischemic și diferențierea lor ulterioară în celule endoteliale (EC). Hipoxia este o caracteristică principală în BCI și a nișei celulelor stem. Cu toate acestea, dacă hipoxia promovează diferențierea celulelor stem în EC sau le face să-și păstreze stemness este controversat.

Yang și colaboratorii au diferențiat celulele stem pluripotente (iPSC) în celule endoteliale (EC) prin hipoxie. Deși capacitatea angiogenică și factorii autocrini/paracrini legați de angiogeneză ai EC au fost îmbunătățite în caz de hipoxie, nivelul factorului inductibil de hipoxie 1 α (HIF-1 α) a fost totuși restricționat împreună cu diferențierea CE. Aceștia au descoperit că reglarea HIF-1 α a fost cauzată de miARN-155 indus de VEGF (miRNA-155). Mai mult, miRNA-155 îmbunătățește capacitatea angiogenică a EC induse prin țintirea factorului de transcripție E2F2. Prin urmare, miRNA-155 nu numai că contribuie la controlul expresiei HIF-1 α în hipoxie, ci și promovează angiogeneza, care este o caracteristică cheie a EC mature [21]. Expresia miRNA-155 a fost crescută în EPC diferențiate de noi din AFSC folosind VEGF ceea ce arată rolul lui miR-155 în maturarea EPC (Fig. 4).

Boala arterială periferică reprezintă o problemă majoră de sănătate publică. Această patologie cuprinde toate afecțiunile arteriale, cu excepția coronarelor și aortei (Fig. 5, 6) [22]. Teritoriile vasculare afectate pot fi cel carotidian, vertebral, mezenteric, renal, respectiv axele arteriale ale membrelor superioare și inferioare. Prevalența bolii arteriale a membrelor inferioare crește odată cu vârsta – este neobișnuită înainte de 50 de ani, însă crește treptat la vârste mai înaintate ajungând la aproximativ 18% în rândul populației de peste 60 de ani.

Un aspect important legat de managementul pacienților cu ischemie cronică periferică, este legat de afectarea polivasculară, pe fondul unei ateromatoze sistemice, ceea ce poate atrage cu sine multiple complicații, de la accidente vasculare cerebrale, până la sindroame coronariene, cu mortalitate crescută. Ischemia cronică cu amenințare de membru (CLTI), reprezintă faza finală a evoluției ischemiei cronice periferice, fiind asociată cu mortalitate crescută, amputații și afectarea calității vieții [23].

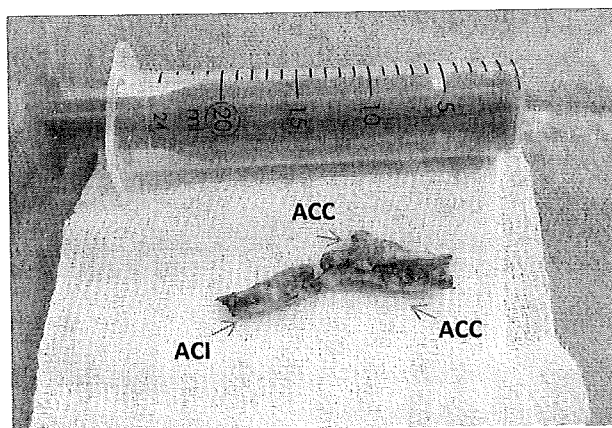


Figura 5. Placa aterosclerotică extrasă (trombendarterectomie carotidiană) de la nivelul bifurcației carotidiene (ACC-artera carotida comună, ACI – artera carotida internă, ACE – artera carotida externă)

Aceasta este expresia unei suferințe vechi, de regulă cu debut gradual, agravată pe fondul deficitului de perfuzie tisulară. Dacă revascularizarea (chirurgicală deschisă sau endovasculară), în cazul în care este posibilă, nu se realizează precoce evoluția este spre amputație sau chiar deces. CLTI este [23] un sindrom clinic ce asociază prezența bolii arteriale periferice, prezența durerilor de repaus (ce nu cedează la analgezie obișnuită), cât și leziuni trofice precum ulcerații sau gangrenă, în evoluție de peste 2 săptămâni.

Conceptul de revascularizare bazată pe dovezi (evidence-based revascularization - EBR), cuprinde trei direcții independente [23]: riscul Pacientului, gradul de afectare al membrului – Limb, și complexitatea ANatomică – PLAN. Bypassul periferic cu autogrefon venos safen inversat este recomandat de primă intenție la pacienții cu risc crescut de pierdere a membrului, respectiv afectare complexă, în timp ce în cazul celor cu anatomie lezională mai puțin complexă pot fi candidați pentru terapia endovasculară [23].

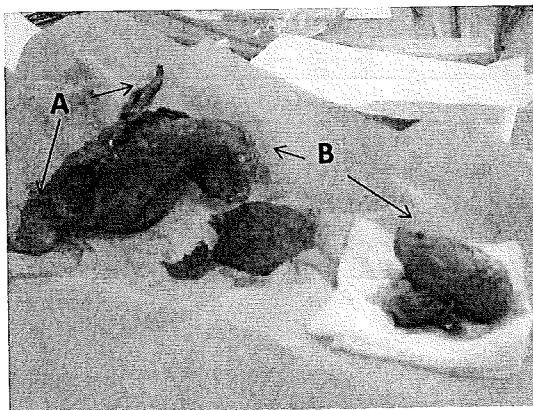


Figura 6. Excludere anevrism aorta abdominala infrarenala – fragmente de placi aterosclerotice (A), alături de tromb masiv (B)

Un alt concept deosebit de util, în ceea ce privește strategia de revascularizare, îl reprezintă conceptul angiozomilor, introdus în 1987 [24]. Acesta se referă la împărțirea membrului în unități tridimensionale, ce cuprind os, mușchi și tegumente, vascularizate de artere specifice, drenate de vene specifice. Luând în calcul această împărțire, se pot obține rate mai mari de vindecare, explicând totodată eșecul unor intervenții de revascularizare.

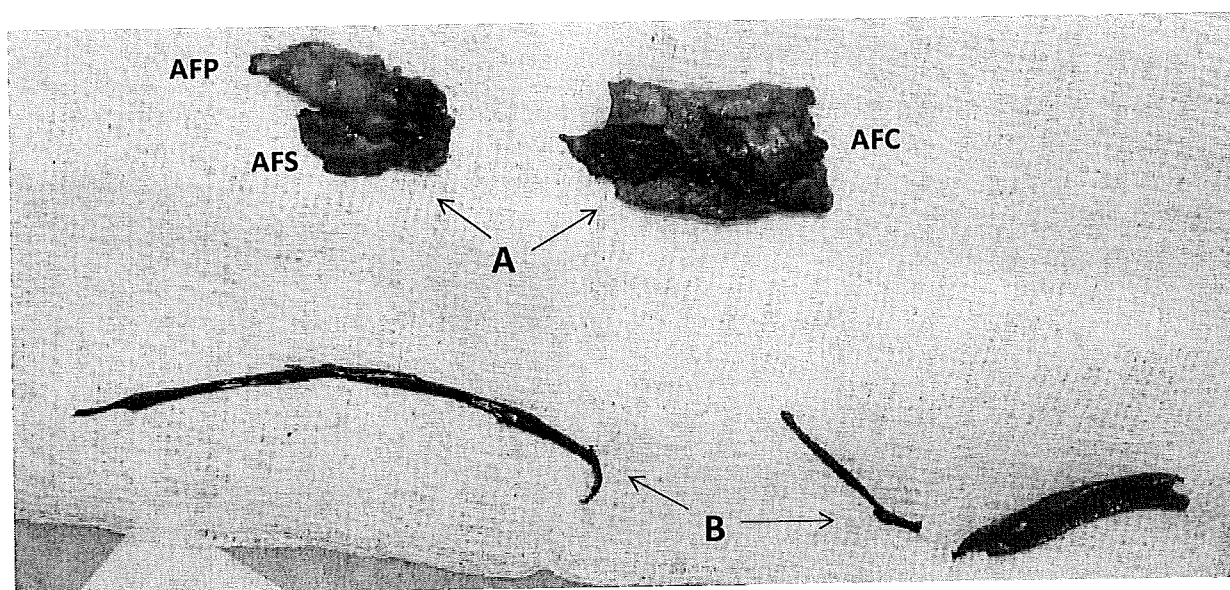


Figura 7. A. Placa aterosclerotică, însoțită de tromboza in situ, extrasa de la nivelul trepidului arterial femural (AFC – artera femurala comuna, AFP – artera femurala profunda, AFS – artera femurala superficiala si B. Tromb extras de la nivelul arterei femurale superficiale

Eficiența terapiilor non-revascularizante, cum sunt stimularea spinală, compresia pneumatică, prostaglandine sau oxigenul hiperbar, încă nu a fost pe deplin stabilită [23]. Terapiile din sfera medicinei regenerative, transplantul de celule stem, terapia cu factori de creștere, sau terapiile genice pentru pacienții cu ischemie cronică cu amenințare de membrul, trebuie deocamdată limitată la studii clinice randomizate, monitorizate strict (Fig. 7) [23].

În strategiile implicând terapia celulară adresată organelor la nivelul căroră vascularizația este compromisă marcat datorită statusului ischemic (infarct miocardic, ischemie de membre) (Fig. 8), trebuie să fie promovat procesul de „autoregenerare vasculară” prin transplant celular sau administrarea de citokine [25] proangiogenice. Studii precedente evaluând terapia celulară cu celule mononucleare medulare au raportat rar o formare vasculară matură și solidă în țesuturile ischemice [26], sugerându-se că mecanismele de refacere a organelor afectate se datorează citokinelor eliberate de celulele transplantate [24].

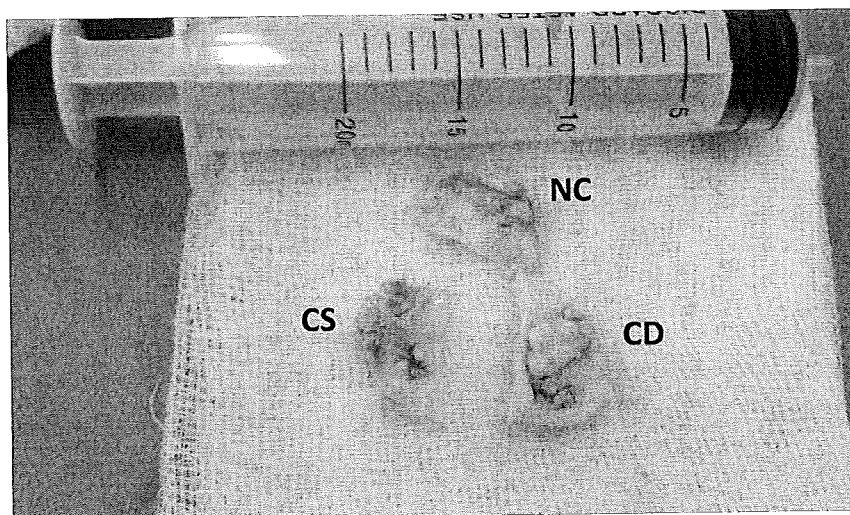


Figura 8. Ateromatoza la nivelul cuspelor valvei aortice (coronara stanga – CS, coronara dreapta – CD si noncoronara - NC)

Totodată este important în cazul pacienților cu boală arterială periferică, ca managementul să se facă de către echipe multidisciplinare – chirurg vascular/cardiovascular, cardiolog, cardiolog/radiolog intervenționist, pentru ca șansele de a salva membrul amenințat sa fie maxime.

În concluzie dezvăluirea mecanismelor de reglare și clarificarea funcției miRNA-urilor în diferențierea CE poate facilita îmbunătățirea terapiilor bazate pe angiogeneza și celule stem în bolile cardiovasculare.

BIBLIOGRAFIE

1. Cao Y, Lu L, Liu M, Li XC, Sun RR, Zheng Y, Zhang PY. Impact of epigenetics in the management of cardiovascular disease: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 18(20):3097-104, 2014.
2. Loscalzo J, Handy DE. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ.*, 4(2):169-74, 2014.
3. Marin JM, Artal J, Martin T, Carrizo SJ, Andres M, Martin-Burriel I, Bolea R, Sanz A, Varona L, Godino J, Gallego B, Garcia-Erce JA, Villar I, Gil V, Forner M, Cubero JP, Ros L. Epigenetics modifications and Subclinical Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea: The EPIOSA study. *BMC Pulm Med.*, 12;14:114, 2014.
4. Xu Y. Transcriptional regulation of endothelial dysfunction in atherosclerosis: an epigenetic perspective. *J Biomed Res.*, 28(1):47-52, 2014.
5. Parsons XH. Embedding the Future of Regenerative Medicine into the Open Epigenomic Landscape of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells. *Annu Res Rev Biol.* 2013 Oct;3(4):323-349.
6. Delcuve GP, Khan DH, Davie JR. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics*, 4(1):5, 2012.
7. Hadi AR Hadi, Cornelia S Carr, Jassim Al Suwaidi. Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vasc Health Risk Manag.*, 1(3): 183–198, 2005.
8. Wang M1, Yu Q, Wang L, Gu H. Distinct patterns of histone modifications at cardiac-specific gene promoters between cardiac stem cells and mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 304(11):C1080-90, 2013.
9. Omer D, Harari-Steinberg O, Buzhor E, Metsuyanin S, Pleniceanu O, Zundeleovich A, Gal-Yam EN, Dekel B. Chromatin-modifying agents reactivate embryonic renal stem/progenitor genes in human adult kidney epithelial cells but abrogate dedifferentiation and stemness. *Cell Reprogram.*, 15(4):281-92, 2013
10. Hoeksema MA, Gijbels MJ, Van den Bossche J, van der Velden S, Sijm A, Neele AE, Seijkens T, Stöger JL, Meiler S, Boshuizen MC, Dallinga-Thie GM, Levels JH, Boon L, Mullican SE, Spann NJ, Cleutjens JP, Glass CK, Lazar MA, de Vries CJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, de Winther MP. Targeting macrophage Histone deacetylase 3 stabilizes atherosclerotic lesions. *EMBO Mol Med.*, 6(9):1124-32, 2014.

11. Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolzheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, 122(4):517-27, 2005.
12. Florin Iordache, Cosmin Buzila, Andrei Constantinescu, Eugen Andrei, Horia Maniu, HDAC inhibitors down-regulates endothelial lineage commitment of umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells, *International Journal of Molecular Science*, 13(11), 15074-15085, 2012.
13. Zhang LX, DeNicola M, Qin X, Du J, Ma J, Tina Zhao Y, Zhuang S, Liu PY, Wei L, Qin G, Tang Y, Zhao TC. Specific inhibition of HDAC4 in cardiac progenitor cells enhances myocardial repairs. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 15;307(4):C358-72, 2014.
14. Saccone V, Consalvi S, Giordani L, Mozzetta C, Barozzi I, Sandoná M, Ryan T, Rojas-Muñoz A, Madaro L, Fasanaro P, Borsellino G, De Bardi M, Frigè G, Termanini A, Sun X, Rossant J, Bruneau BG, Mercola M, Minucci S, Puri PL. HDAC-regulated myomiRs control BAF60 variant exchange and direct the functional phenotype of fibro-adipogenic progenitors in dystrophic muscles. *Genes Dev.*, 28(8):841-57, 2014.
15. Pei, C.Z., Liu, B., Li, Y.T. et al. MicroRNA-126 protects against vascular injury by promoting homing and maintaining stemness of late outgrowth endothelial progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* 11, 28 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1554-9>
16. Qunwen Pan, Jieyi Zheng, Donghui Du, Xiaorong Liao, Chunlian Ma, Yi Yang, Yanyu Chen, Wangtao Zhong, Xiaotang Ma, "MicroRNA-126 Priming Enhances Functions of Endothelial Progenitor Cells under Physiological and Hypoxic Conditions and Their Therapeutic Efficacy in Cerebral Ischemic Damage", *Stem Cells International*, vol. 2018, Article ID 2912347, 13 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2912347>
17. Brennan E, Wang B, McClelland A, Mohan M, Marai M, Beuscart O, Derouiche S, Gray S, Pickering R, Tikellis C, de Gaetano M, Barry M, Belton O, Ali-Shah ST, Guiry P, Jandeleit-Dahm KAM, Cooper ME, Godson C, Kantharidis P. Protective Effect of let-7 miRNA Family in Regulating Inflammation in Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes*. 2017 Aug;66(8):2266-2277. doi: 10.2337/db16-1405. Epub 2017 May 9. PMID: 28487436.
18. Gu W, Zhan H, Zhou XY, Yao L, Yan M, Chen A, Liu J, Ren X, Zhang X, Liu JX, Liu G. MicroRNA-22 regulates inflammation and angiogenesis via targeting VE-cadherin. *FEBS Lett*. 2017 Feb;591(3):513-526. doi: 10.1002/1873-3468.12565. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28112401.

19. Che P, Liu J, Shan Z, Wu R, Yao C, Cui J, Zhu X, Wang J, Burnett MS, Wang S, Wang J. miR-125a-5p impairs endothelial cell angiogenesis in aging mice via RTEF-1 downregulation. *Aging Cell*. 2014 Oct;13(5):926-34. doi: 10.1111/ace.12252. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25059272; PMCID: PMC4331751.
20. Xu Y, Miao C, Cui J, Bian X. miR-92a-3p promotes ox-LDL induced-apoptosis in HUVECs via targeting SIRT6 and activating MAPK signaling pathway. *Braz J Med Biol Res*. 2021 Jan 15;54(3):e9386. doi: 10.1590/1414-431X20209386. PMID: 33470395; PMCID: PMC7812905.
21. Yang, D., Wang, J., Xiao, M. et al. Role of Mir-155 in Controlling HIF-1 α Level and Promoting Endothelial Cell Maturation. *Sci Rep* 6, 35316 (2016).
22. Aboyans V., Ricco J.B., Bartelink M.L.E.L., Björck M., Brodmann M, Cohnert T, Collet J.P., Czerny M., De Carlo M, Debus S., Espinola-Klein C., Kahan T., Kownator S, Mazzolai L, A. Naylor R, Roffi M, Röther J., Sprynger M, Tendra M., Tepe G., Venermo M., Vlachopoulos C., Desormais I. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. *European Heart Journal* (2018) 39, 763–821.
23. Conte M.S., MD, Bradbury A.W., Kolh P, White J.V., Dick F., Fitridge R., Mills J.L., Jean-Baptiste Ricco J.B. et. al., Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2019) 58, S1eS109.
24. Taylor & Palmer et al., *Br. J Plast Surg* 1987; 40:133.
25. Takehara N. Cell Therapy for Cardiovascular Regeneration. *Ann Vasc Dis*. 2013; 6(2): 137–144.
26. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004; 94: 230-8.

Dr. Florin Iordache

13.12.2021

Dr. Cosmin Buzila