

Richiesta assegno di ricerca cofinanziato – 2020

Richiedente: Prof. ssa Mirella Falconi

Titolo del progetto:

Malattie Cardiovascolari: ruolo della senescenza cellulare nella patogenesi dell'aneurisma dell'aorta addominale

Base di partenza scientifica.

Le malattie cardiovascolari sono un gruppo di patologie a carico del cuore e/o dei vasi sanguigni. Nonostante tale definizione faccia rientrare nella categoria qualsiasi processo morboso a carico del sistema cardiovascolare (cardiopatie + vasculopatie), nel linguaggio comune si fa in genere riferimento alle varie patologie correlate all'aterosclerosi (Olvera Lopez E, Ballard, 2020; Milutinović et al., 2020; Gianpaoli et al., 2015). Il restringimento, l'ostruzione o l'eccessivo allargamento (aneurisma) dei vasi sanguigni che possono accompagnare questa malattia, sono infatti responsabili di patologie molto diffuse, come quelle coronariche (angina pectoris ed infarto), cerebrovascolari (ictus) e vascolari periferiche (claudicatio intermittens).

L'aneurisma dell'aorta addominale (AAA) è caratterizzata da una dilatazione della parete dell'aorta addominale conseguente ad un indebolimento dei tessuti costituenti la struttura del vaso. Con il tempo, la pressione sanguigna può provocare la rottura del vaso con conseguenze, spesso, fatali (Golledge, 2019). Asintomatica, l'AAA viene generalmente diagnosticata a seguito di esami di imaging (risonanza magnetica, ecografia etc.) prescritti per altri sintomi addominali o esami di routine.

Sebbene l'esatta eziologia dell'aneurisma dell'aorta addominale non sia nota, vi sono alcuni fattori di rischio associati alla patologia quali l'età, fumo, ipercolesterolemia, ipertensione, aterosclerosi, fattori ereditari (Golledge, 2019).

Nei casi in cui il rischio di rottura dell'aneurisma sia molto elevato la chirurgia vascolare, a cielo aperto o mini-invasiva, rappresenta il trattamento terapeutico raccomandato.

A causa della mancata conoscenza dei meccanismi molecolari all'origine della patologia, attualmente, non esistono terapie farmacologiche atte a ripristinare la corretta struttura del vaso sanguigno e/o rallentare l'indebolimento di questo. La letteratura scientifica riporta la presenza di elevata infiammazione nella parete di vasi sanguigni aneurismatici, responsabili dell'attivazione di enzimi degradativi (metalloproteasi) della matrice extracellulare della tonaca media ed adventizia, con conseguente indebolimento della struttura portante del vaso (Ciavarella et al. 2015; Maguire et al., 2019). Tuttavia, trattamenti con farmaci antiinfiammatori non hanno riportato dati significativi di miglioramento (Wang et al., 2018; Tajima et al., 2017).

Essendo il trattamento chirurgico non privo di rischi, ed eseguito solo nei casi più gravi, la necessità di sviluppare terapie farmacologiche mirate a limitare o prevenire la progressiva dilatazione e rottura del vaso aneurismatico è urgente. Pertanto, una conoscenza più approfondita dei meccanismi molecolari alla base della patogenesi dell'AAA è importante per la messa a punto di trattamenti farmacologici mirati.

Malattie cardiovascolari e invecchiamento biologico

L'invecchiamento della parete vascolare gioca un ruolo chiave nella progressione di molte malattie dell'apparato cardiocircolatorio (Ungvari et al., 2020). E' noto che l'accumulo di cellule endoteliali

senescenti contribuisca e aumenti il rischio della comparsa di patologie vascolari (Ungvari et al., 2018; Katsuumi et al., 2018; Donato et al., 2015). Cellule endoteliali senescenti sono state riscontrate in caso di infarto e all'interno di placche aterosclerotiche, dove si presume svolgano un ruolo attivo nella progressione della patologia (Bennet et al., 2016).

L'invecchiamento biologico è un fenomeno multifattoriale complesso, tuttora non completamente conosciuto. Recentemente sono stati descritti nove fattori specifici (López-Otín et al., 2013). Tra questi la senescenza cellulare, la riduzione del numero delle cellule staminali stromali, la compromessa capacità della proteostasi cellulare (definita come l'insieme dei meccanismi che controllano la sintesi, il ripiegamento, la degradazione e aggregazione proteica), l'inefficienza dell'attività mitocondriale, condizionano lo sviluppo e la progressione dell'invecchiamento (López-Otín et al., 2013; Kaur and Farr, 2020).

La senescenza cellulare è definita come un arresto del ciclo cellulare, indotta da uno o più fattori concomitanti (Hernandez-Segura et al., 2018). Da sempre associata a danno cellulare, viene interpretata come meccanismo di difesa della cellula che, bloccando la proliferazione impedisce la propagazione del danno e, allo stesso tempo, attiva la sorveglianza immunitaria, responsabile della rimozione della cellula danneggiata (Hernandez-Segura et al., 2018). Con l'invecchiamento, questo processo subisce degli scompensi portando ad un accumulo di queste cellule e compromettendo la rigenerazione del tessuto (Wells and Watss, 2018; Mimeault and Batra, 2009). Le cellule staminali stromali (MSCs) rappresentano una sottopopolazione di cellule, localizzate nei tessuti di origine mesodermica, responsabili dell'omeostasi del tessuto e della loro rigenerazione (Bianco, 2014). Localizzate in specifiche aree chiamate "nicchie", le MSCs sono in stato di quiescenza relativa fino a quando non ricevono specifici stimoli che attivano il loro potenziale proliferativo e rigenerativo (Bianco, 2014; So and Cheung, 2018).

Recentemente è stato dimostrato che le MSCs possono andare incontro a senescenza cellulare (Neri and Borzi, 2020; Fafián-Labora et al., 2019; Turinetto et al., 2016; Zhou et al., 2020). Questa condizione, perpetuata per tempi lunghi (invecchiamento biologico), può cooperare nell'indurre la morte delle cellule, con conseguente riduzione del loro numero all'interno del tessuto (Zhou et al., 2020; López-Otín et al., 2013). Inoltre, MSCs in senescenza cellulare, rilasciano una serie di citochine e fattori infiammatori (SASP - senescent associated secretory phenotype), responsabili della creazione di un microambiente pro-infiammatorio (Boulestreau et al., 2020; López-Otín et al., 2013; Hernandez-Segura et al., 2018). Il perpetuarsi di questa condizione, potrebbe generare un circolo vizioso favorevole alla comparsa di patologie infiammatorie croniche, quali l'aneurisma (Furman et al., 2019).

Obiettivo del lavoro:

Attualmente non ci sono dati che correlino la patologia dell'AAA con MSCs senescenti, localizzate nella parete del vaso aneurismatico. L'obiettivo del presente studio è quello di verificare la presenza di cellule staminali stromali senescenti, isolate da frammenti di tessuto vascolare aneurismatico di aorta addominale, e correlare la loro presenza alla patologia.

Dopo aver isolato cellule MSCs vascolari, sarà dimostrato lo stato di senescenza andando ad indagare il blocco del ciclo cellulare, la presenza di danni a livello di DNA genomico, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), il rilascio di fattori proinfiammatori (SAPS) e di alterazioni

dell'autofagocitosi. Sarà valutata anche la capacità di MSCs vascolari senescenti, di differenziare, in vitro, in senso vascolare. Tutti i risultati saranno confrontati con MSCs vascolari isolate da frammenti di tessuto prelevati da aorta addominale sana.

Fasi sperimentali dello studio:

Allestimento di cellule stromali mesenchimali da parete vascolare (VMSCs)

MSCs vascolari saranno isolate da frammenti di parete vascolare con AAA (AAA – MSCs) e sana (s - MSCs), ottenuti da pazienti di entrambi i sessi, durante intervento chirurgico. Le cellule ottenute saranno coltivate in terreno cellulare MEM, supplementato con 10% di siero fetale bovino e 5% di CO₂. Per dimostrare la mesenchimalità delle cellule ottenute, sarà verificata la positività ai marcatori CD73, CD105 e CD90 e la negatività ai marcatori del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC di classe I e II) e ai marcatori per le cellule staminali ematopoietiche (CD34).

Saggio di proliferazione cellulare (BrdU assay) e blocco del ciclo cellulare

Per dimostrare una diversa velocità di crescita tra s-MSCs e AAA-MSCs sarà condotto un test di proliferazione cellulare tramite saggio BrdU. Successivamente, sarà valutata, mediante immunofluorescenza e western blot, l'espressione dei marcatori connessi con un blocco del ciclo cellulare, quali la p53, e degli inibitori delle cicline dipendenti chinasi (CDK) p16 e p21.

Espressione di citochine pro-infiammatorie (SAPS)

Sarà valutata la diversa espressione di molecole pro-infiammatorie quali IL-6, IL- 8 e TNF α in h-MSCs e AAA-MSCs tramite saggi ELISA.

Autofagocitosi

Vista in passato come meccanismo per la sopravvivenza cellulare in condizione avverse, il processo di autofagocitosi, in cellule staminali mesenchimali, viene attualmente interpretato come meccanismo di autorigenerazione e rinnovo continuo degli organelli cellulari e, allo stesso tempo, come meccanismo di eliminazione delle scorie cellulari. E' stato dimostrato come questo processo di autofagocitosi sia fortemente rallentato in cellule senescenti contribuendo, in tal modo, all'invecchiamento cellulare.

Sarà valutata, tramite western blot, la diversa espressione dei marcatori proteici beclina e LC3-b, connessi con l'autofagocitosi, in cellule s-MSCs e AAA-MSCs. Sarà, inoltre, condotta dell'analisi morfologica ultrastrutturale tramite TEM per confermare la presenza/assenza dei vacuoli autofagici.

Differenziamento vascolare in vitro

Sarà valutata la diversa capacità di differenziare in vitro in senso endoteliale in s-MSCs e AAA-MSCs. Le cellule saranno trattate in vitro con il fattore di crescita endoteliale VEGF per 3 giorni e, successivamente, sarà valutata l'espressione del marcatore endoteliale CD31 e la capacità di generare strutture simil capillari su matrigel.

Piano di attività di formazione dell'Assegnista:

L'assegnista per poter realizzare il progetto intitolato "malattie cardiovascolari e senescenza vascolare: ruolo della senescenza cellulare nella patogenesi dell'aneurisma" dovrà essere in possesso di alcune tecniche fondamentali:

- Colture cellulari di cellule mesenchimali staminali, fibroblasti, linee tumorali.
- Estrazione di RNA, DNA da cellule cresciute in monostrato.
- Estrazione di RNA, DNA da cellule
- RT-PCR
- Real Time PCR

L'obiettivo primario del percorso formativo sarà l'integrazione dell'assegnista nel progetto di ricerca, ed è quindi necessario che apprenda o approfondisca le seguenti tecniche:

- Microscopio ottico e/o fluorescenza, microscopio elettronico a trasmissione (TEM) con relative tecniche di preparazione del campione e di immunomarcatura
- Estrazione di proteine da cellule cresciute in monostrato.
- Western Blot
- Immunoistochimica e immunofluorescenza

Queste tecniche permetteranno all'assegnista di poter eseguire la parte sperimentale descritta nel progetto presentato.

Bibliografia

- Bennett MR, Clarke MC. Basic research: Killing the old: cell senescence in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2016;14(1):8-9.
- Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30:677-704.
- Boulestreau J, Maumus M, Rozier P, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles in Aging. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:107. Published 2020 Feb 21.
- Ciavarella C, Alviano F, Gallitto E, et al. Human Vascular Wall Mesenchymal Stromal Cells Contribute to Abdominal Aortic Aneurysm Pathogenesis Through an Impaired Immunomodulatory Activity and Increased Levels of Matrix Metalloproteinase-9. *Circ J.* 2015;79(7):1460-1469.
- Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):122-135.
- Fafián-Labora JA, Morente-López M, Arufe MC. Effect of aging on behaviour of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2019;11(6):337-346.
- Furman D, Campisi J, Verdin E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019;25(12):1822-1832.
- Giampaoli S, Palmieri L, Donfrancesco C, et al. Cardiovascular health in Italy. Ten-year surveillance of cardiovascular diseases and risk factors: Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare/Health Examination Survey 1998-2012. *Eur J Prev Cardiol.* 2015;22(2 Suppl):9-37.
- Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(4):225-242.

- Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 2018;28(6):436-453.
- Katsuumi G, Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5:18.
- Kaur J, Farr JN. Cellular senescence in age-related disorders [published online ahead of print, 2020 Jun 20]. *Transl Res.* 2020; S1931-5244(20)30146-8.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-1217.
- Maguire EM, Pearce SWA, Xiao R, Oo AY, Xiao Q. Matrix Metalloproteinase in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Dissection. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12(3):118.
- Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020; 20(1):21-30.
- Mimeault M, Batra SK. Aging of tissue-resident adult stem/progenitor cells and their pathological consequences. *Panminerva Med.* 2009; 51(2):57-79.
- Neri S, Borzì RM. Molecular Mechanisms Contributing to Mesenchymal Stromal Cell Aging. *Biomolecules.* 2020;10(2):340. Published 2020 Feb 21.
- Olvera Lopez E, Ballard BD, Jan A. Cardiovascular Disease. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
- So WK, Cheung TH. Molecular Regulation of Cellular Quiescence: A Perspective from Adult Stem Cells and Its Niches. *Methods Mol Biol.* 2018;1686:1-25.
- Tajima Y, Goto H, Ohara M, et al. Oral Steroid Use and Abdominal Aortic Aneurysm Expansion - Positive Association. *Circ J.* 2017;81(12):1774-1782.
- Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1164.
- Ungvari Z, Tarantini S, Donato AJ, Galvan V, Csiszar A. Mechanisms of Vascular Aging. *Circ Res.* 2018;123(7):849-867.
- Ungvari Z, Tarantini S, Sorond F, Merkely B, Csiszar A. Mechanisms of Vascular Aging, A Geroscience Perspective: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(8):931-941.
- Wang YD, Liu ZJ, Ren J, Xiang MX. Pharmacological Therapy of Abdominal Aortic Aneurysm: An Update. *Curr Vasc Pharmacol.* 2018;16(2):114-124.
- Wells JM, Watt FM. Diverse mechanisms for endogenous regeneration and repair in mammalian organs. *Nature.* 2018;557(7705):322-328.
- Zhou X, Hong Y, Zhang H, Li X. Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:364.