



Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București

Facultatea de Medicină

TEZĂ DE DOCTORAT

Considerații asupra morfogenezei, morfologiei și potențialului regenerativ cardiac

REZUMAT

Conducător de doctorat
Prof. Univ. Dr. Hab. Rusu Mugurel Constantin

Doctorand
dr. Grigoriu Florentina

București, 2016

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE.....	3
PARTEA GENERALĂ.....	5
1 DATE ASUPRA EMBRIOGENEZEI CARDIACE.....	6
1.1 DEZVOLTAREA CORDULUI	6
1.1.1 <i>Septarea atriilor și a canalului atrial</i>	10
1.2 EMBRIOGENEZĂ CORONARIANĂ.....	14
1.3 ELEMENTE DE EMBRIOGENEZĂ MIOCARDICĂ	18
1.4 ELEMENTE DE EMBRIOGENEZĂ ENDOCARDICĂ	19
2 CORDUL UMAN ADULT – ANATOMIE MACROSCOPICĂ ȘI MICROSCOPICĂ.....	21
2.1 ELEMENTE DE ANATOMIE CARDIACĂ MACROSCOPICĂ	21
2.1.1 <i>Configurația externă a inimii</i>	21
2.1.2 <i>Caracterele generale ale camerelor cardiace</i>	22
2.1.3 <i>Septul cardiac</i>	24
2.2 ELEMENTE DE ANATOMIE STRUCTURALĂ CARDIACĂ	25
2.2.1 <i>Anatomia pereților atriali</i>	25
2.2.1.1 Anatomia structurală a atriului drept	26
2.2.1.2 Anatomia structurală a atriului stâng	27
2.3 ANATOMIA STRUCTURALĂ CONJUNCTIVĂ A MIOCARDULUI	27
3 CELULELE STEM.....	29
3.1 CELULELE STEM EMBRIONARE	29
3.2 CELULELE STEM HEMATOPOIETICE	29
3.3 CELULELE STEM MEZENCHIMALE	30
3.4 CELULELE STEM ADULTE	30
3.5 CELULELE PROGENITORE CIRCULANTE	30
3.6 NIȘELE STEM.....	33
3.7 CELULELE STEM CARDIACE.....	34
PARTEA PERSONALĂ	37
4 NIȘA STEM A PERICARDULUI EMBRIONAR	38
4.1 INTRODUCERE.....	38
4.2 MATERIAL ȘI METODĂ	39
4.3 REZULTATE.....	41
4.4 DISCUȚII	42
5 NIȘA STEM (STROMALĂ) MIOCARDICĂ ȘI TELOCITELE MIOCARDICE	45
5.1 INTRODUCERE.....	45
5.2 MATERIAL ȘI METODĂ	47
5.2.1 <i>Studiul imunohistochimic</i>	47
5.2.2 <i>Studiul ultrastructural</i>	50
5.3 REZULTATE.....	51
5.3.1 <i>Anatomia moleculară a telocitelor miocardice</i>	51
5.3.1.1 Imunomarcarea miocardului cu Ki67	52
5.3.1.2 Imunomarcarea miocardului cu CD10.....	52
5.3.1.3 Imunomarcarea miocardului cu CD31.....	56

5.3.1.4	Imunomarcarea miocardului cu laminină	57
5.3.1.5	Imunomarcarea miocardică cu CD117/c-kit	57
5.3.1.6	Imunomarcarea miocardică cu CD34	59
5.3.1.7	Imunomarcarea miocardului cu CD146	59
5.3.1.8	Imunomarcarea miocardică cu α -actina mușchiului neted (α -SMA)	60
5.3.1.9	Imunomarcarea miocardică cu PDGFR- α	67
5.3.2	<i>Fenotipurile moleculare ale celulelor perivasculare și periendoteliale</i>	67
5.3.3	<i>Telocitele miocardice în microscopia electronică de transmisie</i>	69
5.4	DISCUȚII	73
5.4.1	<i>Morfologia convențională a pereților vaselor intramiocardice</i>	73
5.4.2	<i>Telocitele în regenerarea tisulară</i>	74
5.4.3	<i>Telocitele miocardice - discuții</i>	75
5.4.4	<i>Expresia alfa-actinei mușchiului neted în progenitorii endoteliali</i>	76
5.4.5	<i>PDGFR-α, progenitorii endoteliali, celulele musculare netede vasculare</i>	76
5.4.6	<i>Pericite și telocite</i>	81
5.4.7	<i>Vasculogeneză, angiogeneză și arteriogeneză</i>	85
5.4.8	<i>Celulele „veil” ale lui Guido Majno</i>	85
6	NIȘA STEM ENDOCARDICĂ ȘI TELOCITELE ENDOCARDICE	90
6.1	INTRODUCERE	90
6.2	MATERIAL ȘI METODĂ	92
6.2.1	<i>Preparatele histologice</i>	93
6.2.2	<i>Metoda imunohistochimică</i>	93
6.2.2.1	Anticorpii primari	93
6.2.2.2	Preparațiile imunohistochimice	93
6.2.2.3	Documentarea rezultatelor	96
6.3	REZULTATE	96
6.3.1	<i>Fenotipul mioid endocardic și subendocardic</i>	99
6.3.2	<i>Expresia CD146 la nivelul endocardului și subendocardului</i>	100
6.3.3	<i>Telocite endocardice și subendocardice</i>	100
6.3.4	<i>Expresia filamentelor intermediare de tip neural la nivelul endocardului</i>	101
6.3.5	<i>Expresia enolazei neuron-specifice</i>	105
6.4	DISCUȚII	105
6.4.1	<i>Transformarea endotelial-mezenchimală și endocardul</i>	105
6.4.2	<i>Celulele progenitoare subendocardice</i>	109
6.4.2.1	Stroma endocardică – stromă reactivă?	110
6.4.2.2	Anatomia fenotipului mioid endocardic	110
6.4.2.3	Heterogenitatea celulelor musculare netede	113
6.4.2.4	Modelul structural al mixomului cardiac	114
6.4.2.5	Cordoane și canale vasculare subendocardice	115
	CONCLUZII	117
	BIBLIOGRAFIE	119
	ANEXA 1 – INDEX DE FIGURI ÎN TEXT	129
	ANEXA 2 – DREPTURI DE REPRODUCERE	134

Cuvinte-cheie

cord; imunohistochimie; microscopie electronică de transmisie; nișă stem; celule stem; celule endoteliale progenitoare; endocard; miocard; telocite.

Introducere

Studiul organogenezei normale și anormale a cordului beneficiază puternic de evoluția cunoașterii în biologia dezvoltării și genetică. Studii recente au modificat fundamental conceptele privind cardiogeneza: în loc de o sursă unică de celule progenitoare miocardice se cunosc acum două astfel de surse primare, distincte, câmpurile cardiace primar și secund.

În cadrul cercetărilor avansate asupra biologiei celulare stem a țesuturilor s-a arătat că majoritatea, dacă nu toate organele adulte conțin celule multipotente sau populații celulare progenitor-like. Totuși cele mai multe dintre sistemele adulte, originea liniilor celulare stem, descendenții și dispersia acestora, rămân neexplorate. Nișa stem cardiacă adultă este intens studiată însă, deși anumite concepte privind remodelarea și regenerarea fiziologică a cordului sunt stabilizate și acceptate, detaliile privind potențialul regenerativ al anumitor linii sau tipuri celulare sunt încă insuficient explorate. Este vorba aici de telocitele cardiace și de endoteliul cardiac, endocardic și vascular, țesuturi care sunt accentuat indicate în publicații ca având potențial stem sau progenitor.

Scopul studiilor mele de doctorat a fost astfel, pe de o parte, de a documenta pe referențial informația actualizată privind atât anatomia și fiziologia cardiacă, cât și privind anatomia nișelor stem și, ca și cercetări personale, de a explora telocitele cardiace din perspectiva nișei stem a cordului adult, atât din punctul de vedere al fenotipului imunohistochimic, cât și ultrastructural.

Cercetările mele doctorale au beneficiat de sprijinul Proiectului ” RESEARCH 62 – Doctorat în context european” având finanțare prin contractul POSDRU/187/1.5/S/156069, având ca instituții partenere U.M.F. „Carol Davila” București, U.M.F.Craiova și Academia Română.

Partea generală a Tezei de Doctorat

În partea generală a lucrării am studiat pe referențial embriogeneza și morfogeneza cardiacă, anatomia cordului uman adult la nivel macroscopic și microscopic, precum și informație referitoare la celulele stem și tipurile principale ale acestor constituenți ai nișelor stem.

Cercetări Doctorale Personale

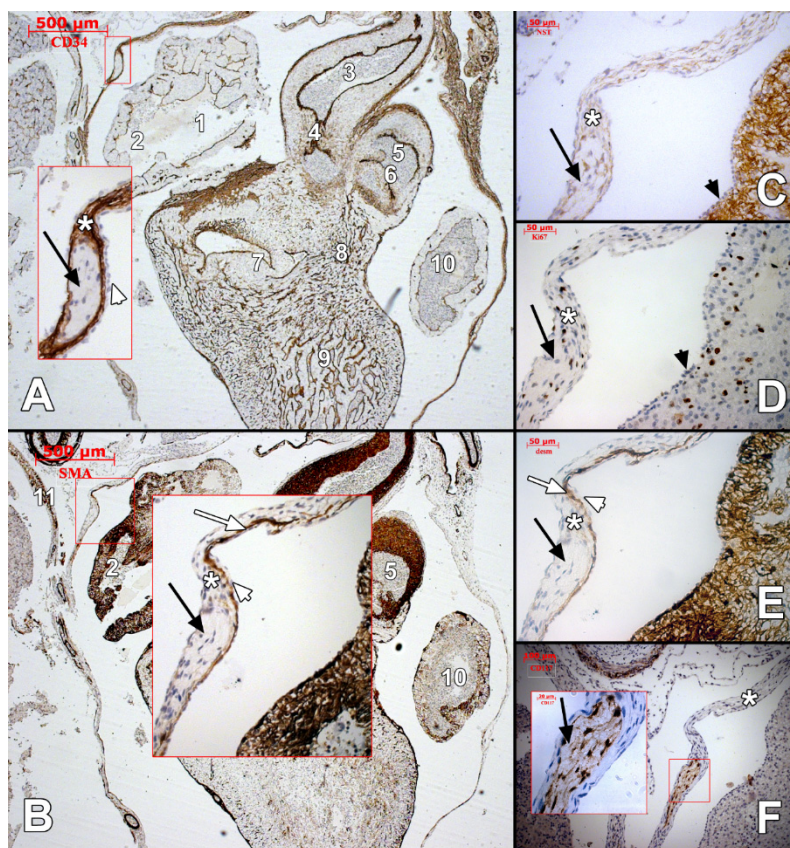
Partea personală a tezei mele de doctorat cuprinde trei studii originale rezultate prin cercetări la nivelul: (1) nișa stem a pericardului embrionar; (2) nișa stem miocardică și telocitele miocardice; (3) nișa stem endocardică și telocitele endocardice.

Nișa stem a pericardului embrionar

Epicardul derivă din organul proepicardic (OPE); acesta din urmă este o componentă a învelișului seros al peretelui trunchiului localizat în vecinătatea ficatului și a sinusului venos. La embrionul uman OPE derivă din mezodermul splanhnic ce acoperă extremitățile cardiace ale venelor viteline. Pe durata cardiogenezei celulele epicardice derivate din OPE suferă o transformare epitelial-mezenchimală, urmată de formarea de celule progenitoare derivate din epicard care vor genera celulele endoteliale și musculare netede ale vaselor coronare, precum și cardiomiocite. Sunt studii care au identificat subpopulații ale progenitorilor derivați din epicard, unele exprimând c-kit, altele exprimând CD34. Un studiu recent realizat la embrioni de găină a identificat o contribuție importantă a mezodermului somatic la OPE. Ideea că OPE constă din multiple celule progenitoare cu diferite origini este susținută de diverse studii; autorii respectivi au adus evidențe ce indică faptul că o subpopulație celulară a OPE derivă din mezodermul somatic și nu din cel splanhnic. Nu sunt însă disponibile date care să indice existența unor astfel de precursori la om. Am avut astfel ca scop studiul fenotipului stem.progenitor al pericardului la embrioni de ultim stadiu, la om, prin imunohistochimie. Studiul a identificat o nișă stem/progenitoare localizată în pericardul care acoperă sinusul venos.

Am utilizat patru embrioni umani rezultați după avorturi spontane, prelevați și procesați cu acordul semnat al pacientelor. Lungimile acestor embrioni au fost cuprinse între 18 mm și 29 mm, ceea ce corespunde la embrioni de 48-56 de zile. Studiul a fost condus în acord cu Declarația de la Oviedo, art.18, privind cercetările efectuate *in vitro* asupra embrionilor și în acord cu Legea 104/2003

privind manipularea cadavrelor umane și normele metodologice ale acestei legi. Comitetul de Etică al U.M.F. Craiova a aprobat acest studiu (aprobarea #54/20.03.2014). Am folosit următorii anticorpi primari, pentru imunohistochimie la parafină: (1) CD 34; (2) α -smooth muscle actin (α -SMA); (3) desmină; (4) CD117/c-kit; (5) CD45; (6) CD90/Thy1; (7) Ki67; (8) nestin.



Imunomarcare pe lame succesive cu secțiuni sagitale ale cordului și pericardului, embrion uman de 56 de zile. A. CD34; B. α -SMA; C. nestină; D. Ki67; E. desmină; F. CD117/c-kit. Morfologia cardiacă generală este prezentată în (A) și (B). 1.atriul drept; 2.sinusul venos; 3.aorta; 4.pernuțele aortice; 5.trunchiul pulmonar; 6.pernuțele pulmonare; 7.valva tricuspidă; 8.trunchiul arterial; 9.ventriculul stâng; 10.atriul stâng; 11.diafragm. Săgețile negre indică nișa stem/progenitoare cardiacă (chenare în A, B și F) înglobată în pericardul fibros (). Straturile mezoteliale epicardice parietal (vârfuri de săgeți albe) și visceral (vârfuri de săgeți negre) sunt indicate. Sub mezoteliul parietal este identificat un strat mioid (săgeți albe în B și E).*

La toți embrionii investigați, cu excepția unuia singur, nu am identificat nici un fenotip molecular particular la nivelul pericardului. La un embrion de 56 de zile am identificat însă o populație celulară pericardică

distinctă, localizată dorsal de sinusul venos. La specimenul respectiv pericardul conținea un grup de celule având expresia pozitivă atât a c-kit și expresia negativă a CD34; celulele respective erau de asemenea negative pentru markeri mioizi – desmina și α -SMA – precum și expresia negativă a nestinei. În întreg pericardul am identificat rare celule pozitive pentru markerul de proliferare Ki67. Cu excepția nișei celulare respective pericardul a prezentat un fenotip c-kit-/CD34+. Sub mezoteliul parietal, care era aplicat pe fața internă a pericardului, am găsit un strat mioid, exprimând atât desmină cât și α -SMA, fenotip similar cu fenotipul c-kit-/CD34+ al pericardului în care era inclusă nișa descrisă. Pericardul, inclusiv nișa dorsală, a prezentat un fenotip CD45-/CD90-. Fenotipul CD34-/c-kit+ al nișei care a fost identificată la nivelul pericardului dorsal sugerează prezența în acest situs, la embrion, a unor celule mezenchimale stem/progenitoare, derivate probabil din stratul somatic al lamei mezodermale laterale, dacă am în vedere originea pericardului. Lipsa expresiei CD34, ca și lipsa expresiei CD45, exclude un fenotip hematopoietic al celulelor stem/progenitoare, fiind bine cunoscută expresia pozitivă a celor doi markeri în nișa stem hematopoietică. Dacă iau în calcul și faptul că organul proepicardic are o evoluție asimetrică, pe flancul drept al tractului de recepție sanguină cardiacă¹², ceea ce corespunde exact locației nișei pericardice pe care am găsit-o, atunci nu se poate exclude un „sechestr” al unei populații celulare reziduale a organului proepicardic la nivelul pericardului. Nu în ultimul rând, localizarea asimetrică a organului proepicardic ar putea explica de ce nu am întâlnit la celelalte specimene evaluate imunohistochimic o astfel de nișă stem/progenitoare pericardică.

Sunt experimente care au indicat o origine comună a mezoteliului proepicardic superficial și a celulelor pericardice care derivă din mezodermul somatic. Totuși, în acest moment rămâne speculativă ipoteza unei prezențe extinse a celulelor organului proepicardic în pericardul uman, însă rezonabilă, deoarece s-a demonstrat pe ouă de găină fertilizate faptul că o populație de celule musculare netede coronariene derivă din mezodermul pericardic, în timp ce alte studii au arătat faptul că celulele arterelor coronare derivă din vilozitățile pericardice. În plus, experimente pe himere prepeliță/pui au sugerat au sugerat atât o origine independentă a celulelor endoteliale coronariene cât și o origine extracardiacă a tubilor endoteliali coronarieni.

Am identificat o subpopulație de celule c-kit+/CD34- la nivelul pericardului embrionar, dorsal de atriu drept. Fenotipul imun al acestora corespunde celui descris la făt ca subset în subepicard. Pot fi astfel considerate celule stem. Localizarea acestei subpopulații însă, în pericard, derivat din mezodermul somatopleural, nu a putut fi identificată ca atare în nici una dintre referințele existente. Totuși, un studiu foarte recent (disponibil de la 9 sept.2013) a identificat la embrionii de găină o contribuție importantă a mezodermului somatic, și nu doar splanhnic, la stratul celular mezotelial al proepicardului. Trebuie avut în vedere și faptul că în afară de TEM de la nivelul subepicardului a fost considerată și migrarea mezenchimului extracardiac de la nivelul regiunii hepatice în morfogeneza mezenchimului subepicardic. Nu în ultimul rând trebuie luată în seamă și analogia dintre epicard, definit precum mezoteliul care acoperă miocardul și generează, prin EMT, EPDC, și mezoteliul care acoperă pericardul fibros, derivat al mezodermului somatic. În ambele instanțe am identificat submezotelial celule cu fenotip mioid, α -SMA+/desmin+, însă doar sub mezoteliul de la nivelul pericardului am localizat CSC. Histologic, acestea sunt comparabile cu cele din nișa subepicardică, dar se află în pericard și nu în subepicard. Se ridică aici ipoteza migrării nișei stem, de la nivelul pericardului, la nivelul subepicardului, în decursul vieții fetale.

A fost arătat faptul că două subseturi distincte de celule, (c-kit+/CD34-/CD45-) și (c-kit-/CD34+/CD31-/CD45-/CD44+) pot fi decelate în epicardul fetal și adult. Un subset de celule CD34+ a fost de asemenea pozitiv pentru CD90 și CD105 (endogline). S-a sugerat că CD34 ar putea identifica progenitori capabili să genereze celule cardiovasculare și EPDC iar absența CD31 în aceste celule s-a corelat cu faptul că sunt mai degrabă celule cu potențial angiogen și vasculogen decât celule endoteliale mature. Celulele c-kit+ au fost identificate precum celule stem cardiace. Expresia tranzitorie a endoglinei (CD105) în decursul morfogenezei cardiace la om a fost detectată la niveluri ridicate în mezenchimul pericardului pe parcursul septării cordului și formării valvelor, expresia endoglinei diminuând pe măsură ce valvele se maturează.

La feți umani și la adult au fost identificate expresiile pozitive ale c-kit și CD34 în celule distribuite la nivelul spațiilor interstițiale conjunctive subepicardice, în jurul vaselor de sânge. Ambele populații identificate nu au exprimat CD45, ceea ce a permis excluderea din diagnostic a liniei hematopoietice⁸³. Și în studiul meu, lipsa expresiei CD45 a permis excluderea acestei diagnostice. În studiul la care fac referire subpopulația de celule care au exprimat c-kit a fost considerată ca fiind compusă din celule stem cardiace iar subpopulația celulară care a prezentat expresia pozitivă a CD34 a fost considerată ca fiind formată din precursori vasculari. Din acest punct de vedere, nișa pericardică pe care am identificat-o la embrion are disponibilă o cale anatomică pentru a alimenta subepicardul cu celule stem, de-a lungul mezocardului. Experimente viitoare vor trebui însă să testeze această ipoteză, prin evaluarea pericardului perinatal.

Nișa stem (stromală) miocardică și telocitele miocardice

În anul 2010 Popescu și Fausson-Pellegrini au prezentat într-un material editorial publicat în Journal of Cellular and Molecular Medicine faptul că au identificat un nou tip de celulă stromală pe care au denumit-o telocit (TC), celulă care anterior fusese caracterizată în numeroase studii ale grupului de lucru respectiv precum celulă interstițială Cajal-like (ICLC). De atunci au fost publicate numeroase articole despre aceste celule cu talie celulară mică, localizate în stroma conjunctivă. În cele din urmă TC au fost definite prin fenotipul lor morfologic, precum celule cu telopode. Telopodele au fost definite precum prelungiri lungi, uneori ondulate, subțiri, moniliforme, ale TC. Până în prezent însă, deși au fost făcute numeroase experimente, nu a fost stabilit un panel de markeri specifici TC, aceste celule fiind identificate cu acuratețe numai prin microscopia electronică de transmisie (TEM). În anul 2010, când au fost definite TC precum un nou tip celular, Kostin și colaboratorii au publicat un punct de vedere în care se susținea faptul că doar TEM poate identifica pozitiv TC; obiectul studiului era reprezentat de TC miocardice, care au fost identificate în vecinătatea cardiomiocitelor. Autorii au asumat un anumit rol al TC în reparația cardiacă. Acest lucru a fost susținut și în alte studii care sugerau un rol progenitor al TC, imunomarcate convingător în acest sens cu CD34 și vimentină (însă filamente intermediare de vimentină se găsesc în numeroase tipuri celulare, inclusiv în celule stem mezenchimale, iar CD34 identifică prin expresia sa pozitivă atât celule stem hematopoietice cât și progenitori circulanți). Rolul funcțional al TC este pur ipotetic și ar trebui testat în continuare; mai

multe studii funcționale ale TC in vivo ar putea ajuta la înțelegerea mecanismelor prin care TC contribuie la reparația cardiacă.

Imunofenotipul TC a fost studiat consistent în ultimii ani; diferiți autori au identificat în TC expresia vimentinei, CD34, PDGFR- α sau a α -SMA. Expresia c-kit în TC este mai degrabă heterogenă. Trebuie însă avut în vedere aici faptul că TC au fost diagnosticate la început precum celule interstițiale Cajal-like, pentru care expresia c-kit este un identificator specific, așa cum este pentru celulele interstițiale Cajal din tractul gastrointestinal. Fibroblaștii (FB) cardiaci reprezintă o prezență celulară cunoscută la nivelul interstițiilor cardiace. Acest fapt recomandă atenție la distincția dintre FB și TC și a acestora cu progenitorii fusiformi. Aceasta deoarece morfologiile hibride ar putea fi diagnosticate eronat precum TC, în microscopia electronică de transmisie. A fost discutat anterior faptul că pentru diagnosticul TC în TEM are importanță morfologia originii telopodelor, subțiri de la origine, spre deosebire de procesele subțiri ale fibroblaștilor care la origine sunt conice, prelungirile celulare subțindu-se progresiv.

Ipoteza studiului a fost aceea că cel puțin un subset de TC cardiace sunt de fapt progenitori, cel mai probabil endoteliali. Am urmărit astfel să reproduc studii precedente ale TC miocardice pentru a testa validitatea lor și pentru a testa compatibilitatea cu criteriile imunohistochimice ale celulelor din linia endotelială. Am decis utilizarea pentru studiul imunohistochimic a anticorpilor primari care marchează clase distincte de celule stem sau progenitoare. Am realizat de asemenea explorări morfologice ale țesutului cardiac în microscopia electronică de transmisie.

Pentru cercetările imunohistochimice am utilizat țesut postmortem uman preservat adecvat, obținut după autopsia anatomică a șase cadavre (sex ratio de 1:1), având vârstele cuprinse între 28 și 82 de ani. Am mai utilizat piese de la alte trei cadavre donatoare (două de gen masculin, unul feminin, de 34, 42 și 46 de ani) pentru a documenta studiul ultrastructural. Am folosit de asemenea cinci șobolani adulți Sprague-Dawley cu greutatea între 350 și 400 g. Animalele au fost păstrate în cuști metabolice individuale, cu controlul hranei și metabolismului, în condiții de iluminare standard. După preanestezie cu eter animalele au fost eutanasiate prin injectarea intracardiacă de substanță veterinară pentru eutanazie (0.2 ml. of T-61, INTERVET, Kirkland, Quebec, Canada). Am folosit anticorpi primari pentru CD10; CD117/c-kit; CD146; CD31 (PECAM-1); CD34; Ki67; PDGFR- α ; α -SMA; laminină; citokeratina (CK) 7.

În microscopia optică celulele din interstițiile miocardice înguste au părut a fi exclusiv celule endoteliale în contact cu fibrele musculare cardiace. În interstițiile mai largi ale miocardului am găsit endotelii acoperite de pericite precum și celule fibroblastoide perivascularare, deci stromale. Pe lamele imunomarcate cu Ki67 am identificat celulele endoteliale care prezentau expresia pozitivă a antigenului respectiv. Am identificat de asemenea celule stromale izolate, de aspect poligonal, care exprima Ki67, markerul de proliferare. Nu în cele din urmă am sesizat expresia pozitivă a Ki67 în celule fibroblastoide cu morfologie telocitară, localizate în interstițiile dintre fibrele musculare și aplicate astfel peste sarcoleme. La imunomarcarea probelor cu anticorpi anti-CD10 am identificat expresia antigenului respectiv, pe de o parte, în endotelii intramiocardice și, pe de altă parte, în celule stromale izolate cu prelungiri dihotomice subțiri, cu morfologie moniliformă, precum cea descrisă pentru telopode. Imunomarcarea țesuturilor investigate cu anticorpii anti-CD31 a identificat expresia pozitivă a antigenului în celulele endoteliale vasculare, în mod firesc, ceea ce am considerat și precum control intern pozitiv. Am identificat deopotrivă celule endoteliale construind tubi endoteliali și celule endoteliale construind cordoane endoteliale pline, acestea din urmă putând fi deopotrivă tubi endoteliali secționați tangențial, eventual vase colaterale, cât și cordoane real pline, din decursul vasculogenezei. Tubii și cordoanele endoteliale exprimând CD31 au fost singurele structuri anatomice identificate în interstițiile dintre cardiomiocite. Am pus de asemenea în evidență celule endoteliale progenitoare (celule fibroblastoide, comparabile cu telocitele) CD31+ precum și capilare născând prezentând expresia pozitivă endotelială a acestui marker. În unele instanțe legăturile colaterale dintre capilarele intramiocardice erau secționate transversal și, deși evidența vaselor unite a fost neîndoielnică, au prezentat pe lame aspect telocitar.

Laminina a marcat deopotrivă lamine bazale endoteliale și lamine bazale sarcolemale, cele două structuri prezentându-se în apozii strânse, fără interpunerea altor tipuri celulare stromale.

Prin aplicarea CD117/c-kit am identificat expresia pozitivă a acestuia în mastocite și în celule stromale izolate, ce pot fi asimilate deopotrivă ca celule endoteliale progenitoare, celule stem hematopoietice sau celule stem cardiace. c-kit a fost de asemenea exprimat pozitiv în pericite și celule musculare netede vasculare intramiocardice. Pereții capilari intramiocardici, neacoperiți de pericite, au

prezentat de asemenea, ocazional, expresia pozitivă a CD117/c-kit, fapt pe care l-am interpretat precum identificator al proceselor de vasculogeneză din celule endoteliale progenitoare care au apărut pe lame cu morfologie telocitară.

Imunomarcarea cu CD34 a condus la imunoreacții pozitive la nivelul celulelor endoteliale vasculare; am identificat de asemenea expresia pozitivă a CD34 în celule stromale fibroblastoide perivascularare, precum și în celule stromale izolate rotunde, cu citoplasmă perinucleară puțină. Rețele stromale miocardice cu aspect de vasculogeneză, alcătuite de celule ce proiectau filopode în stroma adiacentă, au exprimat de asemenea CD34. La nivelul tubilor endoteliali am evidențiat procese de angiogeneză germinativă pe baza filopodelor lungi și moniliforme proiectate în stroma periendotelială de Endothelial Tip Cells (ETC).

Aplicând anticorpii anti-CD146, a rezultat expresia pozitivă a markerului la nivelul celulelor endoteliale vasculare; de asemenea au fost marcate pozitiv pericite și celule musculare netede vasculare dar și celule stromale izolate, în localizare perivasculară sau nu, asumate a fi celule stem mezenchimale datorită specificității cunoscute a CD146 pentru acest tip celular.

Pe lamele imunomarcate cu alfa-actina mușchiului neted (α -SMA) am identificat expresia markerului în pericite aplicate pe aspectul abluminal al celulelor endoteliale, care au prezentat un aspect dendritic. De asemenea am identificat celule fibroblastoide subțiri aplicate peste sarcolemele fibrelor musculare cardiace, care de asemenea au prezentat expresia pozitivă a α -SMA; aceste celule de aspect telocitar erau localizate histologic în lungul traiectelor microvasculare intramiocardice însă desenul histologic general nu a fost superpozabil cu cel obținut după imunomarcarea cu CD31 sau cea cu CD34. Un aspect interesant a fost cel în care celulele musculare netede vasculare prezentau vacuole largi și trimiteau filopode în stroma perivasculară, configurând o rețea cu aspect vasculogenetic aplicată încă pe tubul endotelial.

Am identificat expresia pozitivă a PDGFR- α în celule murale vasculare, precum celulele endoteliale și celule musculare netede vasculare; antigenul respectiv a fost exprimat de asemenea în celule stromale izolate cu raport nucleocitoplasmatic supraunitar, prezentarea histologică fiind sugestivă pentru un fenotip stem sau progenitor.

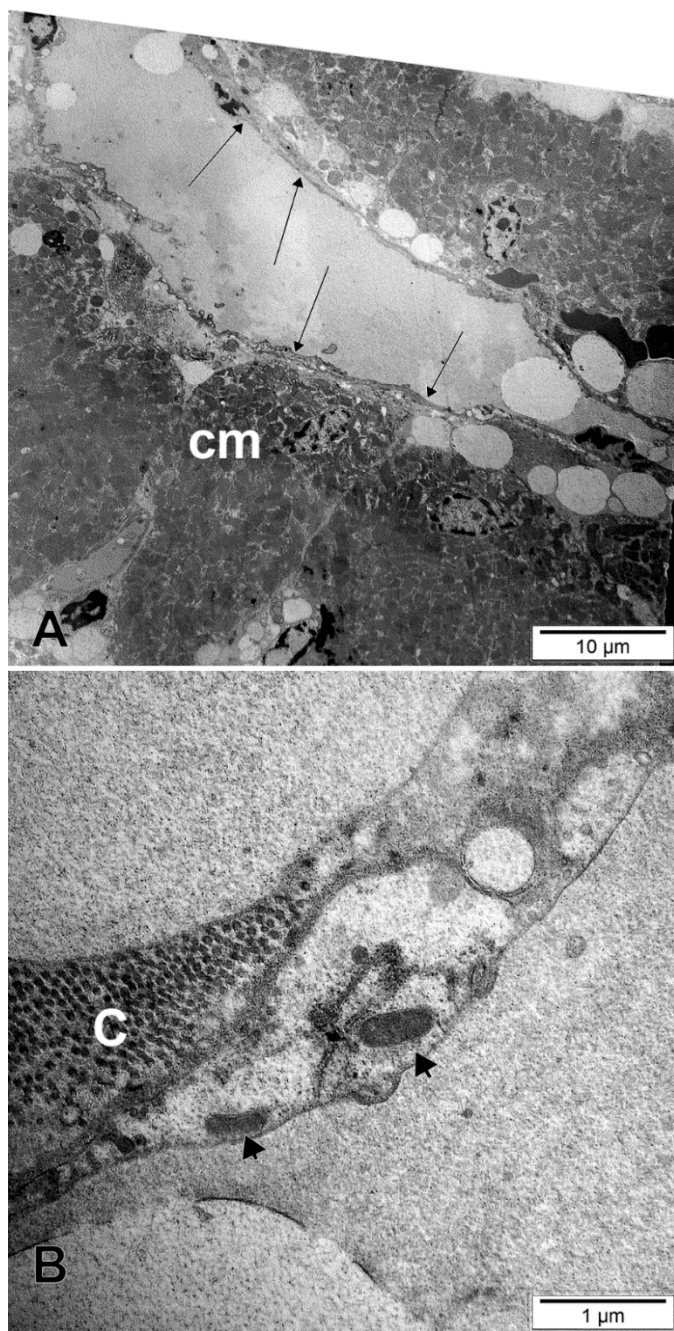
Celule musculare netede vasculare au prezentat expresia pozitivă a CD117/c-kit. La imunomarcarea cu CD34 am identificat expresia pozitivă a antigenului în celule perivascularare cu morfologie fibroblastoidă/telocitară. CD146 a fost exprimat pozitiv în pericite, celule perivascularare și în celule musculare netede vasculare. Expresia α -SMA a fost pozitivă de asemenea în pericite și în celule musculare netede vasculare, acestea din urmă apărând ocazional vacuolate și părând a forma în localizarea periendotelială rețele cu morfologie vasculogenetică. PDGFR- α a fost de asemenea exprimat în celule musculare netede vasculare. Celulele musculare netede vasculare au exprimat pozitiv și lanțul greu de miozină a mușchiului neted, precum și nestina. Enolaza neuron-specifică a fost exprimată atât în pericite cât și în celule musculare netede vasculare. La imunomarcarea cu CK7 celulele epicardice, aplatizate sau hipertrofiate, au exprimat aceste filamente intermediare epiteliale; CK7 a mai fost exprimată în celule stromale izolate, precum și în celule musculare netede vasculare și în celule cu morfologie fibroblastoidă/telocitară dispuse periendotelial.

La examinarea grilelor în microscopul electronic de transmisie am identificat interstițiile înguste dintre fasciculele de fibre musculare cardiace; aceste interstiții au conținut în aproape toate instanțele doar tubi endoteliali, neidentificând prezența nici a altor celule murale periendoteliale, nici a celulelor perivascularare. Inconstant, tubii endoteliali au conținut în lumen hematii, cel mai probabil ca urmare a realizării preparatelor.

Pe secțiuni, pereții endoteliali învecinați cu sarcolemele fibrelor musculare cardiace erau fie în contact cu acestea, fie la distanțe variabile. Pereții tubilor endoteliali secționați longitudinal au prezentat celule endoteliale caracteristice, cu morfologie fusiformă, având corpi celulari de talie mică și prelungiri lungi care din punct de vedere morfologic se asemănau telopodelor. Au fost instanțe când nu am putut identifica conturul complet al tubilor endoteliali din interstițiile miocardice, însă am pus în evidență o lamină bazală externă, pe convexitatea celulelor, însă nu și una internă pe concavitatea aceluiași celule incluse în matricea extracelulară. Pereții endoteliali care aveau morfologie telopodială conțineau mitocondrii, reticul endoplasmic rugos, ribozomi și filamente intermediare; am pus de asemenea în evidență caveole subplasmalemale și lamelipode intraluminale ale celulelor endoteliale.

Au fost situații în care am identificat prelungiri celulare subțiri care se învecinau, sau erau aplicate pe tubi endoteliali. Acestea erau foarte sugestive pentru un model morfologic telopodial însă, în cele din urmă, le-am considerat prelungiri ale fibroblaștilor deoarece nu prezentau emergența

telopodială caracteristică iar corpul celular respectiv avea un aparat de sinteză și secreție bine reprezentat, ceea ce nu este caracteristic TC. Mai mult, celulele endoteliale prezentau în secțiunile ultrafine morfologii labirintice și joncțiuni aderens, similare celor descrise pentru TC dar identificarea lumenelor vasculare a permis un diagnostic diferențial clar.



Microscopie electronică de transmisie, perete ventricular, șobolan adult. Celule cu morfologie telocitară sunt aplicate (A-aspect general, săgeți) pe sarcolemele cardiomiocitelor (cm) și înglobate în collagen (B-detaliu, c). Deși nu conformează un lumen microvascular și nu sunt menținute prin lamina bazală endotelială, aceste telocite cardiace conțin corpi Weibel-Palade (B, vârfuri de săgeți).

În lumenele capilare, mai ales în cele neumplute cu hematii, am găsit microvezicule, probabil exocitate din celulele endoteliale. Astfel de microvezicule au fost prezente și în stroma perivasculară și în cargouri multiveziculare.

Între procesele ondulate ale proceselor telopodiale, sau filopodiale, ale celulelor înglobate în stroma conjunctivă a miocardului, am identificat joncțiuni aderens și joncțiuni strânse; celulele respective proiectau extern și lamelipode și au fost considerate celule endoteliale germinative (endothelial tip cells) aparținând germenilor angiogenici.

Procese telopodiale perivascularare au fost rar identificate însă au aparținut unor celule fibroblastice având un aparat de sinteză bine reprezentat.

Prezintă importanță evidența la nivelul proceselor celulare telopodiale aplicate pe sarcoleme a corpi Weibel-Palade, care au indicat fără îndoială celule ale liniei endoteliale.

Morfologia convențională a pereților vaselor intramiocardice exclude prezența telocitelor, susținând rezultatele cercetărilor mele. Astfel, Moore și Ruska observau în 1957 pereții vasculari intramiocardici în microscopia electronică de transmisie, fără a sesiza, după cum reiese și din figurile prezentate, prezența unor celule speciale perivascularare cu morfologie telocitară. Pe secțiunile capilarelor și arterelor mici miocardice autorii au decelat detalii ultrastructurale asumate a fi în legătură cu pinocitoza. Citoplasma celulelor endoteliale conține vezicule de 50-75 μm diametru, care se apropie și fuzionează adeseori atât la interiorul cât și la exteriorul plasmalemei. Sunt prezenți de asemenea intracitoplasmatic tubuli de reticul endoplasmic ce asociază ribozomi. Veziculele de pinocitoză se pot conecta la plasmaleme. În toate capilarele miocardice observate au fost apreciate joncțiunile interendoteliale; între plasmalemele alăturate au fost decelate spații înguste, de circa 10 μm , pe alocuri cu dilatații. S-a pus problema diferențierii celulelor endoteliale de fibrocite, care au mai mult reticul endoplasmic și nu prezintă vezicule intracitoplasmatic. Aceeași problemă se poate pune și legat de telocite și aici trebuie luate în seamă observații recente, comprehensibile și argumentate, care indică faptul că la nivel stromal telocitele, fibroblaștii și fibrocitele ar reprezenta unul și același tip celular, fiind vorba doar de o terminologie nesincronizată între diferitele grupuri de cercetare. În acest sens, Diaz-Flores și colaboratorii (2014) citează observația făcută de Barth și Westhoff (2007), că „*probabil autorii nu au fost conștienți de faptul că populațiile celulare pe care le-au investigat și descris erau identice*”. Aceși din urmă autori comentează modelele imunofenotipice de identificare a celulelor stromale cu morfologie fibroblastoidă, așa cum sunt descrise și telocitele, chiar dacă având dimensiuni mai mici, evaluând ca și autorii spanioli diagnosticul pe baza expresiei CD34; celule CD34+/CD31+/FVIII+ sunt celule endoteliale, cu aceeași morfologie ca și fibrocitele și telocitele; fibrocitele circulante descrise de Bucala și colaboratorii în 1994 aparțin liniei mielomonocitare și co-exprimă astfel CD11, CD13, CD18 și CD45 iar fibrocitele rezidente sunt CD34+ și exprimă de asemenea vimentina. Diverse studii ale imunofenotipului telocitelor au indicat expresia la nivelul acestora, inclusiv în cord, a CD34 și vimentinei, ceea ce poate explica confuziile create, între telocite și fibrocite rezidente și între telocite și celule ale liniei endoteliale. Pe de altă parte, am studiat atentă publicațiile ce enunță fenotipurile moleculare ale telocitelor și am observat că acestea nu au fost testate pentru expresia markerilor mielomonocitari precum CD11, CD13 și CD18 ; expresia CD45 a fost testată doar în 3 studii, unul dintre acestea indicând pe lângă expresia CD45 în telocite și expresia pozitivă a Oct-4, un marker cheie de fenotip stem, și a nestinei, de asemenea un marker stem convingător.

Înainte ca grupul Acad.L.M.Popescu să redenumescă celulele interstițiale Cajal-like (ICLC) în telocite (TC), cercetătorii respectivi au discutat că ICLC ar putea reprezenta celule stromale progenitoare, pot participa în semnalizare stromală de tip juxtacrin și paracrin și joacă roluri în controlul imun. Au întărit această teorie și mai târziu, când au observat faptul că TC ar putea fi considerate un stadiu primitiv al procesului de diferențiere al celulelor mezenchimale, făcând astfel referire la, probabil, celulele tranzitorii de amplificare. Autorii au documentat alte studii și au discutat faptul că TC c-kit pozitive co-exprimă și CD34, CD44 și nestina, însă nu discută sau observă că c-kit și CD34 sunt markeri asociați de regulă cu HSC, cu celulele endoteliale progenitoare (EPC), nestina fiind de asemenea cunoscută pentru expresia în endotelii vasculare neoformate. Studiile mele au documentat posibilitatea ca structuri pe care studii precedente le-au privit precum TC în microscopia electronică de transmisie să fie similare celulelor endoteliale. Aceasta înseamnă că cel puțin un subset de celule considerate anterior precum TC, care sunt celule definite doar printr-un pattern morfologic, să trebuiască reconsiderate și explorate aprofundat pentru a exclude ferm un fenotip endotelial, lucru care nu a fost făcut în studii precedente ale TC cardiace. Trebuie avut în vedere că fenotipul ultrastructural propus pentru TC nu este absolut specific acestora; de exemplu caveole se pot găsi și în celule endoteliale și în TC. Am deasemenea în vedere faptul că studii anterioare ale TC nu au căutat identificarea corpilor Weibel-Palade pentru a face distincția clară între TC și celulele endoteliale sau progenitorii endoteliali. Nici joncțiunile intercelulare dintre TC nu sunt absolut specifice acestora; joncțiunile interendoteliale sunt similare sau, cel puțin, comparabile.

Angiogeneza germinativă este condusă de celule endoteliale germinative denumite *Endothelial Tip Cells* (ETC), care proiectează filopode conținând actină ce pătrund în stroma conjunctivă unde sunt expuse influențelor micromediului. În lipsa filopodelor, germeii endoteliali sunt ghidați de lamelipode. Filopodele și telopodele sunt asemănătoare, astfel încât diagnosticul diferențial în microscopia electronică de transmisie trebuie făcut atent. Filopodele nu caracterizează un anumit tip celular, ele apar în diverse celule și au rolul unor antene prin care celulele analizează

micromediul respectiv. Și celulele stem și progenitoare proiectează filopode iar, pe de altă parte, fibroblaștii cardiaci pot avea morfologii hibride care să determine confuzia cu telopodele.

Diagnosticul pozitiv al ETC și al filopodelor în microscopia optică este dificil. Trebuie avut în vedere faptul că remodelarea microvasculară miocardică se poate realiza prin trei mecanisme, guvernate de semnale specifice: (a) angiogeneza germinativă; (b) vasculogeneza la adult, din celule endoteliale progenitoare și (c) creșterea de vase colaterale sau arteriogeneza adaptativă. Aceasta face ca ETC să fie confundate ușor cu vase colaterale, sau invers.

Deoarece potențialul regenerativ este limitat la om, terapia cu celule stem rămâne o speranță. Până în prezent au fost investigate numeroase metode și linii celulare în vederea utilizării lor în medicina regenerativă, precum celulele stem embrionare, celulele stem hematopoietice, celulele stromale mezenchimale multipotente derivate din sânge, din cordonul ombilical și din țesutul adipos. Sunt publicații care precizează faptul că telocitele și celulele stem sunt legate funcțional și telocitele ar putea avea un potențial reglator asupra celulelor stem/progenitoare, având capacitatea de a controla creșterea și diferențierea celulară și angiogeneza. Telocitele ar putea fi actori în procesele regenerative și pot exprima în anumite instanțe markeri ai celulelor stem, precum c-kit, Sca-1 și Oct4. Telocitele pot interveni în decursul reparațiilor tisulare în angiogeneză și în stabilizarea vasculară. Telocitele exprimă diferiți markeri, precum VEGF, PDGFR- β , receptori de estrogen și de progesteron, și au fost identificate în numeroase țesuturi. Expresia markerilor în telocite este țesut-specifică ceea ce indică diverse subseturi de telocite ce par a își adapta morfologia și fenotipul la funcțiile organelor și țesuturilor. Numeroase publicații indică rolul telocitelor în regenerarea cordului: telocitele pot acționa precum mediatori ai compactării cordului din trabecule miocardice embrionare în decursul morfogenezei cardiace la șoareci, dinamica extensiilor și ramificațiilor telopodelor este influențată de proteinele din matricea extracelulară, telocitele mențin progenitorii cardiomiocitari din nișele stem subepicardice.

Pericitele au fost izolate din numeroase țesuturi umane dar în ciuda unei identități comune, chiar și în același țesut, ele sunt heterogene și au origini diferite pe parcursul dezvoltării. În numeroase organe, precum mușchii scheletici, pericitele derivă din mezoderm – compartimentul sclerotomal. Sunt circumstanțe, rare, precum activarea forțată a receptorilor căilor de semnalizare Notch și PDGFR, în care pericitele pot fi generate din mioblaști care sunt deja dedicați liniei miogenice și care suferă o dediferențiere cu modificarea liniei celulare. Studii ale liniilor celulare au arătat faptul că pericitele cerebrale derivă din creasta neurală și au deci origine neuroectodermală.

Pericitele acoperă intim celulele endoteliale de la nivelul capilarelor și microvaselor (arteriole, venule), formând un strat unic de celule cu morfologie dendritică. De regulă, pericitele sunt privite precum componente vasculare structurale, ce asigură stabilitatea vasculară și reglează contractilitatea vaselor. Multă vreme, pericitele au fost identificate doar pe baza localizării lor anatomice. Studii moleculare au identificat expresia pozitivă în pericite, indicate precum celule perivasculare, a CD146, NG2, PDGFR- β și lipsa expresiei CD45 și a markerilor endoteliali (CD31, CD34, CD144, factor von Willebrand). La nivelul microvaselor, dar nu și la nivelul capilarelor, a fost identificată expresia pozitivă a α -SMA. Acoperirea microvaselor cu pericite este heterogenă.

Celulele stem și progenitoare hematopoietice apar la embrion și se dezvoltă în vecinătatea vaselor de sânge din sacul vitelin, în regiunea aortă-gonadă-mezonefros, în ficatul embrionar și în măduva osoasă fetală. Și celulele stem/stromale mezenchimale derivă parțial din celule perivasculare. Corselli și colaboratorii (2013) au testat experimental capacitatea celulelor perivasculare CD146-pozitive purificate de a susține în culturi celulele hematopoietice, stem și progenitoare. Acest fapt a fost demonstrat experimental de autorii respectivi, fiind realizat pe seama contactelor intercelulare și cel puțin în parte prin activarea Notch. De asemenea s-a demonstrat că celulele perivasculare ce exprimă CD146 exprimă, nativ și în culturi, markeri moleculari ai nișei hematopoietice vasculare. Această capacitate este identificată și în celulele perivasculare CD146+ extrase din țesutul adipos non-hematopoietic. Prin studiul respectiv autorii au demonstrat că celulele perivasculare CD146+ exprimă la om *in vivo* nestina, CXCL12 și Lep-R; celulele CD146+ umane sunt un subset de MSC ce pot susține direct menținerea *ex vivo* a HSC umane. Autorii conchid că celulele perivasculare CD146+ umane ar putea fi de bună seamă echivalentul nișei hematopoietice perivasculare ale cărei componente au fost identificate prin experimente pe șoareci.

Există controverse asupra proceselor de recrutare pericitară, după cum rezultă și din studiul lui Goritz și colaboratorii (2011) realizat experimental pe țesut cicatriceal realizat la nivelul măduvei spinării; autorii au identificat două tipuri de pericite, denumite A și B; tipul A exprimă PDGFR- α și $-\beta$

și CD 13 iar tipul B exprimă desmină și/sau α -SMA. Pericitele de tip A intră în leziuni împreună cu germenii vasculari și formează compartimentul stromal al țesutului cicatriceal. Evaluarea în microscopia electronică de transmisie a pericitelor de tip A demonstrează o morfologie telocitară a acestora; pericitele de tip A ar putea fi la fel de bine considerate precum TC perivascularare. Goritz și colaboratorii (2011) nu discută aspectele legate de morfologia telocitară a celulelor pe care le denumesc pericite tip A și nici nu aduc în studiu țesut control. Un alt studiu, publicat de grupul Popescu, aduce evidențe ce susțin posibilitatea ca pericitele să fie recrutate din compartimentul stromal, respectiv din populația de telocite.

Celulele *veil* au fost descrise de Majno în 1965 și explorate de acesta împreună cu Isabelle Joris în 1974 prin electronmicroscopia arterelor coronare la șobolani. Adventicea coronariană conținea straturi de celule cu prelungiri extrem de subțiri, înfășurate în jurul vaselor, celule *veil* care corespund ca morfologie telocitelor identificate în situsuri perivascularare.

Într-un studiu de referențial publicat în 2009, Pacilli și Pasquinelli apreciază nișa stem vasculară și discută un studiu prin care populații de MSC cu origine din diferite țesuturi au fost identificate ca având morfologie similară și, în oarecare măsură, exprimând aceași markeri; însă, aceste populații celulare au prezentat un potențial de diferențiere osteogenic și adipogenic diferit, probabil determinat de influența micromediului din care proveneau acele celule, ceea ce susține relevanța nișei în determinarea fenotipului celulelor stem. Autorii discută de asemenea informațiile conform cărora MSC ar putea deriva din celule perivascularare mezangioblast-like, ceea ce face acceptabil conceptul ca MSC să derive de la nivelul microvaselor; cercetările au demonstrat că compartimentul de MSC se extinde în țesuturile postnatale datorită localizării perivascularare, numeroase studii recente identificând pericitele precum MSC *in situ*; Pacilli și Pasquinelli (2009) discută faptul că nu doar pericitele, care sunt celule murale, pot susține populațiile de MSC rezidente în țesuturi ci și fibroblaștii perivasculari care au fost identificați inițial de Majno sub denumirea de celule *veil*. Astfel, termenii de „fibroblast perivascular”, „celule *veil*” și „telocite perivascularare” fac practic referire la același tip celular, care posedă potențial stem/progenitor și aparține nișei stem perivascularare a adultului.

Numeroase studii ale telocitelor au fost realizate în culturi, însă sortarea acestora s-a făcut doar pe criteriul morfologic, fără a se putea utiliza un anumit marker specific, deoarece un astfel de marker nu este încă identificat cu certitudine. Am în seamă că telocitele sunt celule stromale, la fel cum sunt considerați fibroblaștii, diferența principală fiind telopodele. Prezintă importanță în acest context părerea lui Hematti (2012) conform căreia, în culturi, MSC și fibroblaștii nu pot fi diferențiați nici prin morfologie, nici prin markeri de suprafață și nici prin potențialul de diferențiere și proprietățile imunologice. Consider că acest mod de abordare fenotipică trebuie extins și telocitelor, mai ales dacă am în vedere studiile mele publicate recent care indică faptul că subseturi de telocite sunt în fapt celule progenitoare.

În sensul celor discutate trebuie analizate și celulele stromale indicate în diverse studii precum „fibroblast-like cells”. Komuro, încă din 1990, indica faptul că date fiind asemănările lor, este aproape imposibil de făcut distincția între fibroblaști și celulele fibroblast-like. Același lucru consider că se poate postula și legat de telocite. Komuro aduce în discuție rezultatele altor cercetători conform cărora celule fibroblast-like corespund destul de bine descrierii telocitelor deoarece prezintă forme neregulate cu procese subțiri, frecvent ramificate, conțin incluzii lipidice, nu posedă lamină bazală la suprafața celulei, prezintă reticul endoplasmic rugos și aparat Golgi și conțin filamente intermediare și microtubuli, fiind localizate în compartimente stromale, fie perivascular fie subepitelial. Din această perspectivă am căutat să documentez expresia citokeratinelor în fibroblaști, priviți din perspectiva unor celule telocit-like, având în vedere faptul că am identificat în locații perivascularare și periendoteliale expresia CK7 în miocard; expresia CK7 în epicard a fost sugestivă pentru CK7 ca adecvat identificator al celulelor progenitoare derivate din epicard, cunoscute ca având potențial de diferențiere în cadrul liniei endoteliale. Am identificat un studiu mai vechi în care celule stromale cultivate împreună cu celule epiteliale au dobândit expresia citokeratinelor, conducând către concluzia că celulele stromale sau mezenchimale pot dobândi o diferențiere epitelială *in vitro* iar citokeratinele la nivelul acestora se pot organiza și în absența unui centru de organizare și a joncțiunilor interepiteliale. Un alt grup de lucru a descris celule stromale atipice care exprimau actină și vimentină însă și citokeratină; ultrastructural au prezentat caracteristici comune atât celulelor musculare netede cât și fibroblaștilor, fiind în cele din urmă considerate precum miofibroblaști reactivi, fapt ce aduce acum în discuție telocitele precum componente celulare ale unei strome reactive, de regulă caracterizată prin

exprimarea α -SMA^{64, 106, 181-183}, un marker asociat frecvent și cu telocitele, abordare care poate explica de ce fenotipul imunohistochimic al telocitelor este practic imposibil de stabilizat conceptual, după cum susțin publicații recente. Mecanismul prin care rezultă celule stromale având expresia pozitivă a citokeratinelor este clar formulat, fiind vorba de transformarea epitelial-mezenchimală¹⁸⁸, un proces acceptat, și în privința epicardului. Fenotipul celular hibrid epitelial-mezenchimal a fost caracterizat în studii anterioare și a fost asociat cu celule progenitor-like.

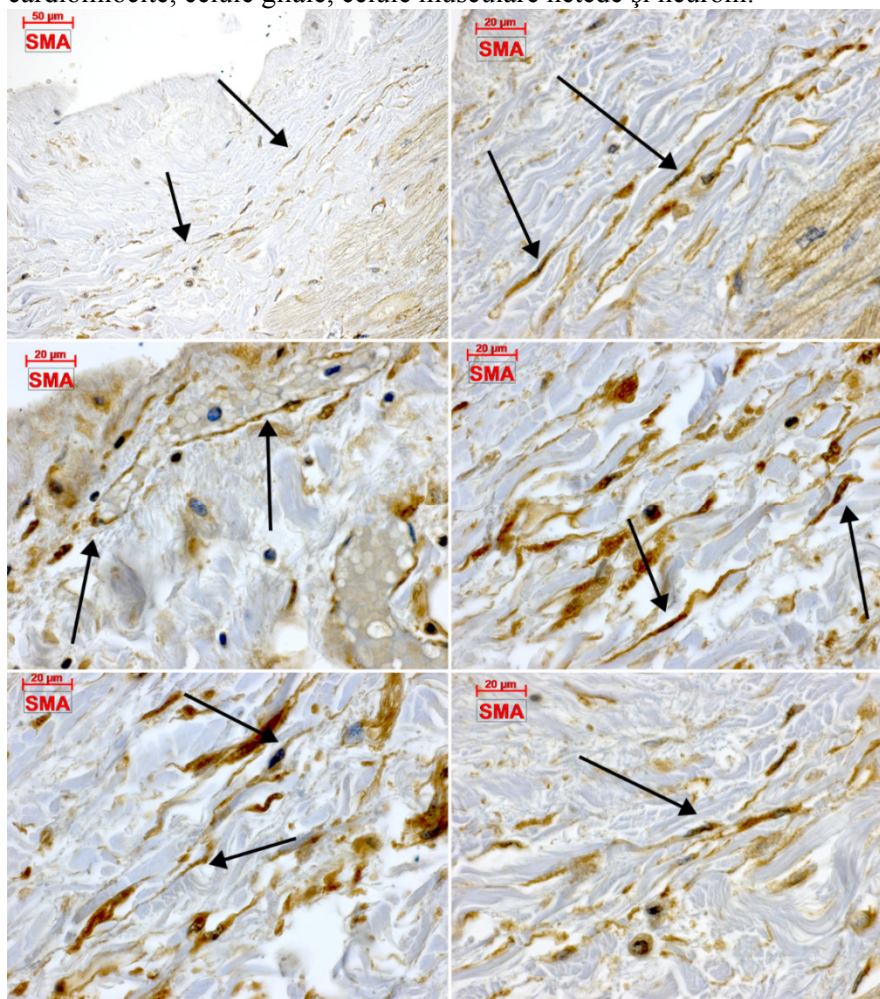
Am identificat expresia pozitivă a enolazei neuron-specifice (NSE) în celulele musculare netede vasculare și în pericite. Documentând acest fenotip am identificat puține studii care descriu fenotipul NSE+ al telocitelor în modele de expresie neurală asociind și alți markeri neurali. Un studiu la nivelul placentei a indicat faptul că celule cu morfologie telocitară distribuite în stroma perivasculară și având fenotip c-kit+ au exprimat, însă inconsistent, NSE, nestină, proteina S100, CD34, CD44 sau α -SMA; nu s-a realizat însă dublă imunomarcare care să elucideze tipul celular funcțional. Deși nu am putut identifica direct studii care să indice expresia NSE în celule musculare netede vasculare și în pericite, am în vedere aici faptul că, dat fiind că acestea aparțin unui rezervor perivascular de MSC potențiale care, la rândul lor, pot exprima NSE, considerând astfel că expresia NSE în celulele respective este obiectivă și indică potențialul lor MSC.

Nișa stem endocardică și telocitele endocardice

În ultima decadă diferite studii realizate atât la animal cât și la om au pus în evidență prezența celulelor progenitoare cardiace adulte care se pot diferenția în linia cardiomiogenică și se pare că ar contribui la turnover-ul celulelor musculare cardiace, atât în decursul dezvoltării cât și în situații patologice. În populația de celule progenitoare cardiace a fost pus în evidență un subset de celule numite celule progenitoare „side population” (SP), ceea ce s-ar putea traduce precum populație colaterală de celule progenitoare; acestea sunt caracterizate specific prin capacitatea de a realiza efluxul coloranților de legare a ADN prin intermediul unei casete transportoare care leagă ATP. În anul 2001 s-a descoperit posibilitatea de a utiliza celule cu un fenotip primitiv nediferențiat, înrudite cu cele utilizate pentru transplantele de măduvă osoasă, pentru implantare cardiacă și transdiferențiere în cardiomiocite. Studiile respective au izolat celule derivate din măduva osoasă care prezentau expresia pozitivă a c-kit și le-au injectat direct în regiunile de infarct miocardic experimental la animale, ceea ce a condus la regenerarea miocardului pierdut. Secvența de evenimente de cercetare ulterioară a condus și la sugestia că diferite subpopulații de celule derivate din măduva osoasă ar avea capacitate de regenerare diferită. În ultima decadă au fost conduse numeroase studii clinice care au apreciat potențialul regenerativ cardiac al unor subpopulații variate de celule derivate din măduva osoasă însă rezultatele acestor studii clinice au fost îndoielnice, un punct negativ legat de aceste transplantate fiind reprezentat de faptul că celulele derivate din măduva osoasă care au fost implantate au avut o supraviețuire slabă, indiferent de calea de implantare. A urmat apoi cronologic identificarea de progenitori cardiaci endogeni, odată cu un raport publicat de Hierlihy și colaboratorii în 2002, care au pus pentru prima dată în evidență celulele cardiace progenitoare SP, urmând apoi studii care au confirmat această subpopulație celulară. Hierlihy și colaboratorii (2002) concluzionează că identificarea de celule stem miocardice endogene nu mai fusese realizată până atunci iar rezultatele studiului lor demonstrează existența unei populații celulare miocardice rezidente stem-like, celulele SP respective păstrând caracteristici ale altor populații de celule stem, cum ar fi capacitatea de fuziune cu alte tipuri celulare non-stem, deși celulele cardiace SP nu realizează ușor conversia profilului genic, ceea ce indică o funcție restricționată la miocard. Este important de precizat aici faptul că în studiile lor, Hierlihy și colaboratorii (2002) au utilizat markeri pentru linii stem hematopoietică și musculară scheletică și au obținut evidența faptului că celulele cardiace SP nu exprimă markeri ai liniilor hematopoietică și mioidă (CD34, c-kit, Sca-1, Flk-2 și Thy 1.1).

Un studiu realizat de Rusu și colaboratorii (2012) a demonstrat expresia pozitivă a neurofilamentelor (NF) cu greutate moleculară de 200 kDa în celulele endoteliale microvasculare și endocardice; studiul respectiv a fost realizat pe specimene cardiace umane adulte. Evidența respectivă a fost privită cu circumspecție și a fost recomandată testarea expresiei nestinei pentru a se aprecia dacă, sau nu, expresia endotelială a NF se corelează cu formarea de neovase.

Un review recent al informației privind celulele progenitoare cardiace SP, realizat de Unno și colaboratorii (2012) indică faptul că „originea morfogenetică a celulelor cardiace SP și argumentele moleculare care dictează dezvoltarea acestor celule rămân de determinat” și aduc în discuție un studiu realizat în 2005 de Tomita și colaboratorii, studiu ce documentează faptul că celulele SP progenitoare cardiace exprimă markeri de celule precursorale neurale. Acești ultimi autori au realizat experimente in vitro utilizând țesuturi de rozătoare și au găsit că în ziua 0 aproape toate celulele derivate din cardiosfere exprimau nestina, celulele respective fiind considerate astfel precursori neurali nediferențiați; în ziua 14 expresia nestinei a dispărut iar celulele au căpătat expresia miozinei și a GFAP, ceea ce a indicat un statut diferențiat al acestora. Interpretarea rezultatelor a fost aceea că celule derivate din creasta neurală cardiacă populează cordul și rămân la acel nivel precum celule stem multipotente dormante care pot ca ulterior să se diferențieze în diferite tipuri celulare, precum cardiomiocite, celule gliale, celule musculare netede și neuroni.



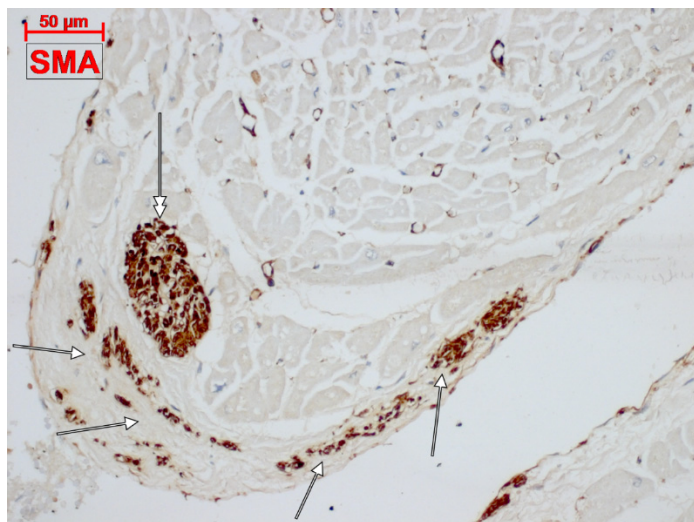
*Cord uman adult (66 ani),
perete ventricular (1229).
Expresia pozitivă a α -SMA
este identificată (săgeți) în
celule subendocardice cu
morfologie telocitară.*

Un studiu focalizat asupra telocitelor (TC) endocardice a analizat structura endocardului. Autorii respectivi au discutat faptul că endocardul are doar două straturi: endoteliul endocardic și țesutul conjunctiv lax subendotelial, indicat precum subendocard. Cu mult timp înainte însă, în 1909, Nagayo a propus două modele diferite pentru structura endocardică normală, unul atrial, cu patru straturi, și al doilea ventricular, cu cinci straturi, modele documentate în 1961 de către Okada.

Telocitele (TC) au fost redenumite din celule interstițiale Cajal-like în 2010, într-un material editorial publicat în Journal of Cellular and Molecular Medicine. Numeroase studii asupra TC au considerat o definiție morfologică a acestora, de „celule cu telopode”, telopodele fiind procese celulare lungi și extrem de lungi, subțiri, cu calibru neregulat, moniliform. Sunt încă disputate caracteristicile moleculare ale TC, fiind indicat faptul că în funcție de organ, și chiar și la nivelul aceluiași organ, TC pot prezenta profiluri imunohistochimice diferite; cum TC nu pot fi identificate prin aplicarea unui panel specific de markeri, observația recentă a lui Varga și colaboratorii (2016) că TC nu sunt indexate în Terminologia Histologica apare justificată.

Numeroase studii au testat markeri specifici ai TC; au fost indicați ca fiind exprimați în TC diferiți markeri hematopoietici și endoteliali, precum c-kit, CD34, endogлина, markeri neurali precum nestina, enolaza neuron-specifică (NSE) și nitric oxid sintetaza (NOS) sau markeri mioizi, precum alfa-actina mușchiului neted (α -SMA). Am ridicat de aceea ipoteza că TC din nișa stem endocardică ar putea fi în fapt progenitori care exprimă nestină iar acest marker arată de fapt nu originea din creasta neurală a unor progenitori cardiaci SP ci mai degrabă indică o origine endocardică a acestora.

Pentru cercetările imunohistochimice am utilizat țesut postmortem uman preservat adecvat, obținut după autopsia anatomică a zece cadavre (sex ratio de 2:3), având vârstele cuprinse între 28 și 82 de ani.



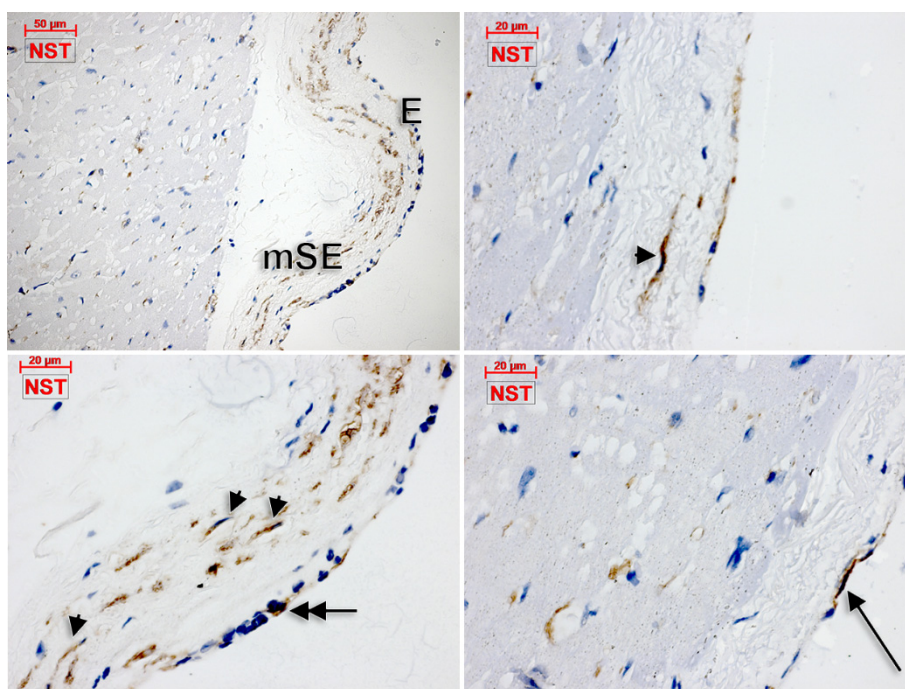
Cord uman adult, secțiune prin perete ventricular, la nivelul unei punți miocardice (#102479-2). Imunomarcare cu α -SMA. Strat imunopozitiv subendocardic (săgeți). Cordon mioicard intramiocardic (săgeata cu vârf dublu).

Studiul a fost condus în acord cu legislația națională privind utilizarea cadavrelor în scop de cercetare (inclusiv Legea 104/2003 privind manipularea cadavrelor umane) și cu principiile generale ale Declarației de la Helsinki, revizia Rio de Janeiro.

Specimenele tisulare au fost conservate adecvat în formol tamponat (8%), fiind ulterior incluse în parafină și pregătite pentru imunohistochimie. Blocurile de parafină au fost procesate cu un histoprocessor automat (Diapath, Martinengo, BG, Italy). Secțiunile au fost tăiate manual la 3 μ m și au fost montate pe lame electrostatice SuperFrost® pentru imunohistochimie (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany). Pentru evaluarea histologică am folosit secțiuni de 3-4 μ m grosime colorate cu hematoxilină-eozină. Am folosit anticorpi primari pentru următoarele antigene: c-erbB2 (HER-2, mouse monoclonal, clona CB11, Biocare Medical, Concord, CA, USA, 1:50); nestină (mouse monoclonal, clona 10c2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:500); CD146 (mouse monoclonal, clona N1238, Novocastra-Leica, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K., 1:50); alfa-actina mușchiului neted (α -smooth muscle actin, α -SMA, mouse monoclonal, clona 1A4, Biocare Medical, Concord, CA, USA, 1:50); lanțul greu de miozină al mușchiului neted (smooth muscle myosin heavy chain, SMM, mouse monoclonal, clona S131, Novocastra-Leica, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K., 1:100); enolaza neuron-specifică (neuron-specific enolase, NSE, mouse monoclonal, clona BBS/NC/VI-H14, Dako, Glostrup, Denmark, 1:200); neurofilamente (mouse monoclonal, clona RT97, Novocastra-Leica, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, U.K., 1:50).

Am evaluat histologia endocardului la nivelul pieselor atriale și ventriculare, precum și în mușchi papilari. Am identificat prezența unui strat endocardic muscular neted care, deși nu în mod exclusiv, nu era restricționat la endocardul ventricular, fiind de asemenea prezent și în endocardul atrial. Am identificat de asemenea faptul că grosimea endocardului nu a fost uniformă în speciamentele individuale iar zonele lipsite de strat muscular neted endocardic prezentau un endocard bistratificat. Am observat de asemenea faptul că endoteliul endocardic a fost heterogen din punct de vedere morfologic, în unele zone endocardice fiind constituit de celule endoteliale aplatizate fusiforme, iar în alte zone fiind prezente celule endoteliale hipertrofiate. Am identificat de asemenea zone endocardice denudate de endoteliocite. Fenotipul muscular neted al endocardului și straturilor subendocardice l-am apreciat în primul rând prin aplicarea de anticorpi anti- α -SMA la nivelul pereților atriali, auriculari și ventriculari. Expresia endotelială endocardică a α -SMA a fost variabilă, fiind zone de endocard α -SMA negative și zone care au exprimat antigenul respectiv. La nivel atrial, inclusiv la nivel auricular, am identificat unul sau două straturi α -SMA pozitive subendocardice și, în plus, am identificat

fascicule musculare intens marcate cu α -SMA care luau parte la alcătuirea fasciculelor miocardice slab marcate cu α -SMA. Structura straturilor subendocardice ventriculare a inclus, comparabil cu cea atrială, straturi α -SMA-pozitive. Am identificat de asemenea cordoane intens α -SMA pozitive, localizate atât în subendocard, cât și în miocardul de vecinătate. Straturile cu fenotip muscular neted nu au exprimat markerii mezenchimali CD34 și vimentina. Anticorpii anti-CD146 au marcat zone de endoteliu endocardic și celule ale straturilor mioide subendocardice. De asemenea expresia CD146 a fost pozitivă în celule Purkinje subendocardice. Expresia pozitivă a α -SMA a indicat prezența în subendocard a unor celule fusiforme, miofibroblastoide/telocitare, cu prelungiri celulare lungi și calibru neregulat, moniliform. Astfel de celule au exprimat de asemenea, însă mai puține, markerul Ki67 de proliferare celulară. c-erbB-2 (HER2) a marcat de asemenea telocite subendocardice însă expresia pozitivă a acestuia a apărut și în celule izolate, rare, identificate imediat sub endoteliul endocardic. Lanțul greu al miozinei mușchiului neted a fost exprimat pozitiv în astfel de telocite subendocardice, unele dintre acestea părand a configura tubi endoteliali subendocardici. La nivelul tuturor straturilor cardiace am identificat expresia endotelială a neurofilamentelor, inclusiv la nivelul subepicardului unde expresia neurofilamentelor în nervii subepicardici am considerat-o precum control pozitiv intern al veridicității imunomarcării. Am identificat expresia neurofilamentelor și în celule endoteliale endocardice. Expresia nestinei a fost pozitivă, însă nu exclusiv, în celule fusiforme sau hipertrofiate ale endoteliului endocardic, precum și în celule fuziforme (fibroblastoide/telocitare) localizate în subendocard. Am identificat expresia NSE (Neuron-Specific Enolase) la nivelul stratului mioid subendocardic.



Mușchi papilar ventricular adult. Expresia endocardică a nestinei este identificată în celule endoteliale endocardice, fusiforme (săgeata) sau hipertrofiate (săgeata cu vârf dublu), precum și în celulele fibroblastoide ale straturilor mioide (vârfuri de săgeți). E: endoteliu endocardic; mSE: stratul mioid subendocardic.

La nivel cardiac au fost descrise diferite populații de celule progenitoare SP, cum ar fi celulele stem cardiace, celulele progenitoare derivate din epicard și celulele derivate din cardiosfere. Diferențierea celulelor stem cardiace adulte prin care se poate reînnoi populația de celule cardiace, reproduce stadii evolutive observate în decursul dezvoltării embrionare. Se cunoaște faptul că în decursul dezvoltării celulele endocardice suferă o transformare endotelial-mezenchimală și livrează celule mezenchimale în țesutul adiacent. Am indicat studiul realizat de Tomita și colaboratorii (2005) în care autorii au observat celule cardiace progenitoare SP caracterizate prin expresia nestinei; în stadii de diferențiere celulele pierdeau expresia nestinei și căpătau fenotipuri variabile, neuronale, gliale, musculare netede sau cardiomiocitare. Plecând de la rezultatele respective autorii au speculat rezonabil o origine a celulelor SP din creasta neurală. Am adus prin cercetările mele evidențe care susțin originea endotelială a celulelor progenitoare nestin-pozitive, care exprimă de asemenea markeri de mușchi neted (α -SMA, SMM) și markeri neurali (NSE). Expresia nestinei în endocard și în subendocard ar putea fi un element sugestiv pentru patogenia calcificării și osificării mușchilor papilari, care a fost raportată la om deoarece, pe de o parte, celulele stem mezenchimale, precum cele din nișa endocardică, sunt cunoscute ca având potențial osteogenic iar, pe de altă parte, nestina este un marker bun pentru progenitorii osteogenici. Această similitudine conduce la două interpretări posibile.

Prima este aceea că celulele perivasculare și/sau cele periendoteliale, inclusiv cele de la nivelul peretelui cardiac, aparțin nișei stem universale a adultului, care este nișa perivasculară; de aceea acest concept ar trebui extins și ar trebui inclusă și nișa stem endocardică. A doua corelație rezultată este aceea că endoteliul cardiac ar trebui să aibă capacitatea de a realiza transformare endotelial-mezenchimală, la fel ca endoteliul vascular. Din această punct de vedere prezintă o importanță deosebită experimentele realizate de Chen și colaboratorii (2016) prin care s-a demonstrat, la șoareci, faptul că celulele endocardice suferă o transformare endotelial-mezenchimală și generează pericite și celule musculare netede la nivelul peretelui cardiac. Evidențele pe care le-am obținut permit extinderea acestui nou mecanism de geneză a progenitorilor cardiaci și la om. În plus, se pare că endocardul nu generează doar celule perivasculare ci și un strat individual și morfologic variabil de mușchi neted endocardic, cu proprietăți contractile, după cum se demonstrează prin expresia miozinei de mușchi neted, iar funcția contractilă a acestui strat de mușchi neted ar putea interfera cu activitatea fiziologică a pompei cardiace. Sunt însă necesare studii ulterioare care să testeze această ultimă ipoteză care este susținută și de un alt studiu recent, realizat de Chabot și colaboratorii (2016) care au demonstrat faptul că nestina ar putea fi utilă pentru a face distincția dintre transformarea endotelial-mezenchimală și transformarea epitelial-mezenchimală, nestina fiind exprimată doar în celulele mezenchimale derivate din endoteliu. Mecanismul prin care celulele endoteliale endocardice sunt eliberate la nivelul țesutului subendotelial ar putea să fie unul care să nu implice diviziuni celulare ci o cudare puternică urmată de detașarea din perete a unei singure celule endoteliale fuziforme, după cum s-a demonstrat la nivelul endoteliului aortic și voi detalia mai jos. De aceea, identificarea unor fenotipuri similare în celulele endocardice endoteliale și în cele subendoteliale ar putea să nu fie o evidență neobișnuită.

În ultimii ani studiile au încercat să definească populațiile celulare având caracteristicile fenotipice și funcționale ale celulelor endoteliale. Un scenariu posibil este acela în care în sânge se găsesc rare celule endoteliale progenitoare, denumite celule endoteliale formatoare de colonii, sau progenitori endoteliali tardivi, care nu au origine din măduva osoasă și au capacitatea de a genera celule endoteliale fenotipic și funcțional competente ce pot fi încorporate în pereții neovaselor. Astfel de celule se găsesc în circulație dar și în pereții vasculari, precum celule rezidente în intima vasculară endotelială. Pe lângă acești progenitori se mai găsesc celule progenitoare hematopoietice care au capacitatea de a genera descendență monocitară care are in vivo acțiune pro-angiogenică dar care nu poate fi încorporată în pereții neovaselor. Efectul proangiogenic este realizat printr-un mecanism paracrin cu acțiune prin factori de creștere și citokine.

La embrion celulele stem hematopoietice (HSC) au o origine încă disputată, mai ales în ceea ce privește descendența lor din celule endoteliale vasculare. Primul situs anatomic, la embrion, în care au fost puse în evidență ca primă apariție HSC este regiunea aortă-gonadă-mezonefros (AGM) în vecinătatea planșeului aortei dorsale (DA, Dorsal Aorta). Sunt autori care au adus evidențe asupra trecerii HSC din planșeul aortic direct în lumenul aortei dorsale. Alți autori susțin însă faptul că HSC apar pentru prima dată în mezenchimul subiacent AGM. S-a arătat convingător, într-un studiu pe embrioni de pește zebură că HSC apar direct din planșeul aortic printr-un proces stereotip care nu implică diviziuni celulare ci o cudare puternică urmată de excluderea unei singure celule endoteliale din peretele aortic ventral în spațiul subaortic, cu transformarea concomitentă a acesteia în celulă stem hematopoietică. Echivalentul la peștele zebură al regiunii AGM de la mamifere este spațiul dintre DA și vena axială (AV, axial vein), spațiu care conține celule stem/progenitoare hematopoietice multipotente care intră în circulație și colonizează alte țesuturi și se expandează și diferențiază în organe hematopoietice din aval. Acest proces este polarizat nu doar în axul ventro-dorsal ci și în cel rostro-caudal vs. cel mediolateral, depinzând de expresia Runx1 (Runx1 indică un subset de celule endoteliale care sunt hematopoietice) astfel: în embrionii cu deficiența Runx1 evenimentele din cursul excluderii sunt similare la început, deși mai rare, apoi însă procesul avortează prin moartea violentă a celulei excluse. Apare astfel evident faptul că planșeul aortic este hemogen iar HSC ies în spațiul subaortic nu după diviziuni celulare asimetrice ci printr-un comportament celular diferit, denumit tranziție endotelial-hematopoietică. CD41 poate face diferența între progenitorii hemogenici și celule/progenitori endoteliali; CD41 este pozitiv în HSC dar nu în celule endoteliale, în care este exprimat CD51. A fost urmărit exact comportamentul celulelor endoteliale aortice la embrioni de pește zebură prin microscopie confocală cu fluorescență; rezultatele, filmate și documentate exact în cronologie, au arătat un lot consistent de celule endoteliale din planșeul aortic care se cudau puternic, cu menținerea in situ a cudării, către spațiul subaortic. A urmat în secvență o nouă contracție a

celulelor cunate, în axul medio-lateral, care a adus în contact celulele endoteliale fusiforme vecine celei cunate, ceea ce va permite celulei active să părăsească stratul endotelial fără a îi afecta integritatea. Celula endotelială cunată și-a pierdut apoi contactele cu cele vecine, venite acum în contact, însă a păstrat o apropiere topografică strânsă cu acestea, timp în care se rotunjea și demonstra motilitate, care a determinat o mișcare oscilatorie a celulei în axul vascular. Contactele distale au dispărut în continuare, ceea ce a permis degajarea celulei în spațiul subaortic, aceasta prezentând o morfologie tipică progenitorilor hematopoietici. Celula hematopoietică rezultată a intrat apoi în diviziune simetrică, fiind capturată într-o microstromă rezultată după reticularea peretelui dorsal al AV adiacente; apoi a intrat în lumenul venos și în circulație.

Prezintă relevanță pentru această discuție rezultatele unui studiu realizat pe cornee distrofică, cu afectare endotelială, în care celulele endoteliale au prezentat două morfologii diferite: morfologia fusiformă/aplatizată endotelială tipică, dar și zone în care au fost identificate deopotrivă celule endoteliale aplatizate și celule poligonale cu nucleu rotunzi și citoplasmă largă. Expresia citokeratinelor în endoteliu a fost caracterizată: (a) în endoteliile control au fost exprimate doar CK8 și CK18; (b) în endoteliile anormale, deopotrivă în celulele endoteliale aplatizate și în cele rotunde/poligonale, au fost puternic exprimate CK7, CK19, CK8 și CK18 (au mai fost semnale pozitive, slabe, și pentru CK1, CK3/12, CK4, CK5/6, CK10, CK10/13, CK14, CK16 și CK17).

Legat de alterarea endotelială, aceasta poate fi legată de aterogeneză. În plăcile de aterom, la nivelul VSMC au loc procese de dediferențiere (dediferențiere embrionară, identificată cu CD31 și CD34) și de transdiferențiere (transdiferențiere epitelială, identificată cu CK7, CK18 și β -catenină) în care markerii respectivi pot fi co-exprimați.

Mi-a atras atenția expresia aceluiași markeri moleculari atât în endoteliul endocardic cât și în stratul muscular neted endocardic și în pericite. Aceasta poate indica similaritatea anatomică dintre, pe de o parte, endoteliul endocardic și stratul muscular neted plasat abluminal față de endoteliu și, pe de altă parte, endoteliul vascular și stratul mioid plasat abluminal față de acest din urmă tip endotelial.

Se pare că stratul muscular neted endocardic, slab indicat specific în studii, este prezent și la nivel atrial și la nivel ventricular și poate fi privit precum un strat progenitor, care este slab contractil și prezintă expresia pozitivă a nestinei și a markerilor de mușchi neted (α -SMA, SMM).

Cum însă studiile pe țesut uman au limitări etice nu poate fi trecut cu vederea fluxul inversat al transformărilor, de la pericite la celule mezenchimale și apoi la celule endoteliale. Acest lucru este sugerat de observația faptului că mixoamele atriale iau naștere din celule mezenchimale endocardice și subendocardice, precum cele pe care le-am identificat, celule care au capacitatea de diferențiere endotelială. Mixoamele conțin cordoane și canale vasculare care sunt similare celor pe care le-am găsit în specimene non-tumorale, structuri care au fost descrise ca indicând transformarea embrionară endotelial-mezenchimală a endocardului. Astfel, nu ar trebui îndepărtată secvența liniilor celulare în care din celulele endoteliale endocardice ar putea deriva celule endoteliale vasculare, aceasta fiind susținută de expresia cunoscută a nestinei în endoteliile vasculare neoformate.

Un singur studiu a evaluat în microscopia electronică de transmisie telocitele endocardice, la șoareci, apreciind că acestea sunt populația celulară dominantă în stratul subendotelial al endocardului. De aceea se poate considera că populația de celule fusiforme care populează endocardul, pe care am identificat-o, corespunde, cel puțin în parte, telocitelor endocardice, acest fapt fiind susținut și de evidențe precedente ale expresiei nestinei și enolazei neuron-specifice în telocite, pe care și eu le-am evidențiat exprimate pozitiv în telocitele subendocardice. Studii diferite au indicat de asemenea expresia în telocite și a altor markeri de fenotip stem precum Oct-4 și nestina, expresia acestora din urmă fiind identificată și de mine în cercetările doctorale. Este interesant că odată cu expresia pozitivă a markerilor stem în telocite, cercetătorii respectivi au decelat expresia negativă a endoglinei (CD105) care, în alt studiu privind telocitele, a fost asociată pozitiv cu acestea.

Sunt puține referințele care indică prezența în (sub)endocard a celulelor musculare netede, în strat, pe care am obținut-o și eu în cercetările doctorale. Okada, în 1961, a lucrat pe specimene post-autopsice apreciind ca model normal sau fiziologic îngroșarea fiziologică a endocardului la nivelul camerei de ejeție și mm.papilari ai ventriculului stâng, camerei de ejeție și porțiunii apicale a ventriculului drept, porțiunii anterioare a septului interatrial și la nivelul pereților atriali posteriori. Endocardul pare a se îngroșa cu vârsta, în paralel cu îngroșarea valvulelor aortice. Okada (1961) face referire la o publicație a lui Nagayo din 1909, care nu o pot identifica în nici o bază de date, în care acesta din urmă clasifică structura normală a endocardului în 5 straturi, la nivelul ventriculului stâng, și în 4 straturi, la nivelul ventriculului drept. O diferență importantă a structurilor-model prezentate,

față de rezultatele mele, este aceea că eu am identificat strat muscular neted endocardic și strat muscular subendocardic și la nivel atrial, precum în modelul ventricular al lui Nagayo, prezentat de Okada. În plus, modelul Nagayo al endocardului ventricular îmi impune prudență în identificarea cordoanelor α -SMA pozitive juxtamiocardice, acestea putând corespunde unor benzi de țesut nodal, și nu unui țesut mioid neo-format. Însă, țesutul nodal nu este țesut muscular neted, pe de o parte, iar experimente au demonstrat faptul că celulele stem cardiace c-kit pozitive se pot diferenția specific în mușchi cardiac, în mușchi neted și în celule endoteliale; mai mult, se face distincția între evoluția celulelor stem cardiace în miocardocite și în celule nodale.

Orlandi și colab. (2006) documentează și discută faptul că celulele endocardice embrionare de la nivelul canalului atrioventricular și tractului de ejeecție își modifică fenotipul din endotelial în mezenchimal, prin transformare endotelial-mezenchimală, ceea ce conduce la septarea cardiacă și valvulogeneză; în această fază celulele endocardice exprimă progresiv α -SMA și își pierd antigenele endoteliale. Gelatina cardiacă, matrice acelulară dintre miocard și endocardul primitiv, susține inițierea transformării endotelial-mezenchimale și conține fibronectină și proteoglicani, o compoziție similară matricei extracelulare din mixoamele cardiace.

Transformarea endotelial-mezenchimală a fost documentată prin imagini histologic similare celor pe care le-am prezentat eu, însă prin studii la păsări. Celulele mezenchimale rezultate sunt descrise precum miofibroblaști, deci cu morfologie fusiformă; se pare că TGF-beta este un inductor al acestei transformări iar celulele mezenchimale migratoare exprimă subplasmalemal α -SMA, reducându-și expresia antigenului endotelial QH1 225. Celulele endoteliale staționare nu exprimă α -SMA.

Heterogenitatea celulelor musculare netede este un fenomen bine cunoscut. Însă, interpretarea morfologiei, precum și corelațiile funcționale ale expresiei unor markeri, sunt subiecte de discuții. Informațiile existente au rezultat din studii efectuate in vitro sau in vivo, pe țesuturi fetale, neonatale și adulte, la diferite specii. În ceea ce privește studiile asupra celulelor musculare netede vasculare, originea celulelor studiate în culturi poate fi din intimă, media internă, media externă sau din adventice, provenind din vase normale sau din vase patologice. Numeroase date in vivo preiau informație consistentă din studii in vitro. Conform cu rezultatele privind dezvoltarea fetală primitivă, celulele musculare netede încep să exprime α -SMA, apoi 1E12 (marker de actinină) și smoothelin; în perioada fetală tardivă la acești markeri se adaugă SM22, calponina, h-caldesmon și miozina de mușchi neted (SMM, Smooth Muscle Myosin). Acești markeri sunt upreglați în timp ce alți markeri sunt reprimati (downreglați), cum ar fi citokeratina și unele variante de fibronectină. Celulele musculare netede ale intimei sunt mai puțin diferențiate decât cele din media mijlocie și media externă. În situațiile în care apare îngroșarea intimală sau apar procese aterosclerotice sau de restenoză, se raportează în general reexpresia genelor fetale. La nivel vascular, celulele musculare netede sunt orientate circumferențial în media externă, însă spre lumen au o dispoziție aleatorie. Din punct de vedere morfologic au fost diferențiate, în culturi, 4 tipuri: celule musculare netede epitelioid (poligonale), celule fusiforme (cu un aspect ondulat); la acestea se adaugă celulele subțiri, alungite (grupări dense, cu aspect de vârtej), și tipul senescent (celule largi, vacuolate, fără confluență). Celulele cu fenotip epitelioid probabil corespund in vivo la celule de tip sintetic, iar cele fusiforme, la celule contractile. Tipul celular sintetic apare referit în unele studii precum fenotip nonmuscular, deoarece nu prezintă markeri de diferențiere contractilă. Intima va fi asociată cu tipul sintetic, iar media vasculară – cu tipul contractil, însă nu în mod exclusiv. Tipul fusiform, în condiții suboptimale, se poate modifica în epitelioid. Tipul epitelioid este mai sensibil la apoptoză. Trebuie avută de asemenea în vedere o populație silențioasă de celule musculare netede care servesc drept progenitori pentru tipul celular sintetic. Originea celulelor musculare netede vasculare ar putea fi atât mezodermală, cât și ectomezodermală (creasta neurală). Creasta neurală intervine însă discutabil și specific. Un al doilea candidat pentru progenitorii celulelor musculare netede vasculare îl reprezintă celulele endoteliale, care se pot transdiferenția în celule musculare netede și au fost trasate până în media și în adventicea vasculară.

Cea mai des întâlnită tumoră cardiacă este mixomul cardiac. Denumirea de mixom cardiac este dată de aspectul mixoid al matricei extracelulare care este bogată în mucopolizaharide. De regulă mixomul cardiac se formează la nivelul septului interatrial și afectează frecvent inima stângă; au fost însă descrise și localizări biatriale sau ventriculare.

Histogeneza mixomului cardiac rămâne neclară, deși natura neoplazică a mixomului cardiac este acceptată. Studii de microscopie optică și electronică au indicat faptul că celulele tumorale derivă

din celule multipotente vasoformative ale stromei subendocardice sau endocardice, care arată o diferențiere parțială către anumite tipuri celulare precum mușchiul neted și celulele endoteliale. Dificultatea de apreciere histopatologică a mixoamelor cardiace rezultă din natura conflictuală a caracterizărilor morfologică și imunohistochimică ale tumorilor acestea. Au fost raportate expresii diferite ale proteinelor specifice diferitelor tipuri celulare ale adultului, chiar și în aceeași tumoră, sugestive pentru o origine epitelială, endotelială, miogenică, neurală sau miofibroblastică a tumorii. O astfel de heterogenitate fenotipică se observă și în cardiogeneză. La nivelul miocardului adult sunt exprimate două actine sarcomerice, cardiacă și α -scheletică, în timp ce în cardiomiocitele fetale este exprimată α -actina mușchiului neted (α -SMA). Pentru această heterogenitate și variabilitate fenotipică o explicație posibilă ar putea fi legată de originea posibilă a mixomului cardiac din celule pluripotente sau dintr-o rezervă celulară vasculogenică subendotelială. Un studiu realizat pe mixoame cardiace a identificat expresia pozitivă a factorului VIII, aglutininei *Ulex europaeus*, miozinei de mușchi neted, alfa-1 antitripsinei și alfa-1 antichimotripsinei în toate tumorile investigate, susținând astfel heterogenitatea fenotipică a acestor tumori și posibila origine a acestora din celule mezenchimale multipotente. În favoarea acestor teorii patogenice vin anumite asemănări morfologice dintre celulele mixomului cardiac și celulele pernuțelor embrionare cardiace. Mai mult, rolul în patogeniza mixoamelor al unei linii cardiomiogenice a fost întărit de cercetări care au identificat transcripse de *Nkx2.5/Csx*, tipice genei homeobox cardiace. Specimene tisulare de mixom atrial stâng au fost marcate cu anticorpi pentru factorul VIII și pentru actină. Majoritatea celulelor tumorale au fost factor VIII – negative însă o subpopulație celulară forma cordoane și canale vasculare care au prezentat un miez sau un strat de acoperire factor VIII-pozitiv și actin-pozitiv, având morfologie endotelială. Celulele tumorale care tapetau invaginările vascular-like ale suprafeței au prezentat de asemenea imunomarcare pozitivă în focare. Rezultatele studiului respectiv susțin faptul că mixoamele cardiace iau naștere din celule mezenchimale subendocardice sau endocardice primitive, celule care posedă potențialul de diferențiere în celule endoteliale. Rezultatele respective nu susțin originea mixoamelor cardiace din endoteliul cardiac. Astfel, telocitele subendocardice reprezintă candidați celulari de apreciat ca celule de origine ale mixomului cardiac. Din studiul histogenezei mixomului cardiac au reieșit detalii morfologice relevante pentru studiul meu, în care au rezultat evidențe comparabile: (1) vase intratumorale interpretate precum stromă non-neoplazică au fost identificate – vase de talie medie, formate din mușchi neted tapetat de endoteliu, mușchiul neted marca difuz cu actină iar endoteliul marca granular fin cu factor VIII; (2) celulele tumorale izolate sau în grupuri – celule legate în serie formau cordoane cu grosime de una sau mai multe celule, negative pentru actină și factor VIII – se exclude astfel posibilitatea ca la speciemenle mele structurile α -SMA pozitive să fie structuri tumorale misdiagnosticate; (3) unele cordoane celulare prezentau un miez endotelial, factor VIII pozitiv, cu un lumen conținând uneori hematii; (4) deoarece actina avea aceeași distribuție precum factorul VIII, ultimul fiind marker endotelial, se conchide că actina reprezintă un marker al diferențierii endoteliale, ceea ce are o mare relevanță pentru studiile mele.

Concluziile Tezei de Doctorat

1. Contribuția epicardului embriofetal la cardiogeneză este bine cunoscută și succede organului proepicardic în alimentarea cu precursori a tubului cardiac; contribuția pericardului embrionar la cardiogeneză reprezintă, pe de altă parte, un aspect insuficient explorat, care impune abordări experimentale pentru o caracterizare adecvată.
2. Telocitele sunt celule definite prin caracteristici morfologice, prezentând expresia variabilă a unor seturi de markeri. Sunt celule apreciate precum având roluri fiziologice importante însă studiile acestor celule trebuie să aibă în vedere excluderea unor tipuri celulare bine cunoscute și caracterizate, precum celulele endoteliale și celulele germenilor angiogenici, înainte de a alocă un diagnostic de certitudine ca telocite. Din acest punct de vedere, reprezentarea unităților funcționale miocardice trebuie să includă cardiomiocitele și vasele sangvine terminale însă trebuie să privească cu circumspecție adăugarea telocitelor la o astfel de reprezentare. Probabil utilizarea CLEM (*Correlative Light Electron Microscopy*) ce permite aprecierea concomitentă în microscopie optică și în microscopie electronică, are putea aduce evidențe care să indice clar ce tipuri celulare cunoscute corespund definiției de „celule cu telopode”. De asemenea dubla și tripla imunomarcare pot fi folosite pentru identificarea unui model imunofenotipic specific pentru telocite.
3. Deși este acceptat în prezent faptul că inima nu este un organ postmitotic și se cunoaște că regenerarea cardiacă se realizează pe seama celulelor stem adulte, nișa endocardică de celule stem și progenitoare este insuficient explorată specific. Sunt necesare studii care să detalieze potențialul endotelial și mezenchimal endocardic de a alimenta miocardul cu celule capabile de diferențiere fie în linia cardiomiogenică, fie în cea vasculogenică.
4. Astfel, telocitele subendocardice reprezintă candidați cu certitudine importanți pentru clarificarea originii mixomului cardiac.
5. Sunt necesare studii care să cuantifice contribuțiile epicardului și endocardului la nișa stem a miocardului; epicardul și celulele progenitoare cardiace derivate din epicard trebuie investigat și din perspectiva caracterizării telocitelor din acest situs anatomic.