

*Alla mia famiglia,
Agli amici*

Indice Analitico

Riassunto Analitico	Pag 4
Introduzione	Pag 10
La Cardiomiopatia acromegalica	Pag 12
Definizione e ruolo nella storia naturale dell'acromegalia	Pag 12
Cardiomiopatia acromegalica: una specifica entità?	Pag 14
Anomalie Morfologiche e Strutturali nella Cardiomiopatia Acromegalica	Pag 15
Alterazioni Funzionali della Cardiomiopatia Acromegalica	Pag 16
Elementi di Fisiopatologia	Pag 18
Effetti della terapia sulla cardiomiopatia acromegalica	Pag 19
Altre Complicanze Cardiache dell'Acromegalia	Pag 22
Risonanza Magnetica Cardiaca e Ecografia <i>Backscatter</i> nella valutazione della cardiomiopatia acromegalica	Pag 26
Introduzione e Scopo dello studio	Pag 26
Disegno dello Studio e Popolazione analizzata	Pag 27
Metodiche di Imaging utilizzate nello studio	Pag 30
Risultati	Pag 34
Apoptosi nel cuore acromegalico: studi <i>in vitro</i> e sul topo bGH-MT	Pag 42
Premesse concettuali e Finalità dello studio	Pag 42
Disegno dello studio	Pag 43
Materiali e Metodi	Pag 44
Risultati	Pag 52
Discussione	Pag 65
Dati dall'imaging umano	Pag 65
Dati dal modello sperimentale	Pag 69
Conclusioni	Pag 74
Bibliografia	Pag 77
Ringraziamenti	Pag 87
Appendice I: Vie di trasduzione del segnale	Pag 88

Riassunto Analitico

L'acromegalia è una rara sindrome clinica caratterizzata da un'eccessiva secrezione dell'ormone della crescita (GH) derivante, nella quasi totalità dei casi, dalla presenza di un adenoma ipofisario GH secernente [1-4].

Oltre alle peculiari stigmati somatiche, l'eccesso sierico del GH e della sua molecola effettrice, l'IGF-I, si accompagna ad un coinvolgimento multi sistemico responsabile del maggior tasso di mortalità che si riscontra in questa classe di pazienti [14].

Le indagini epidemiologiche hanno posto in rilievo come l'aumento nella mortalità sia da imputare soprattutto alla frequente compromissione del sistema cardiovascolare (38-62%) [1,2,15,16].

Numerosi studi hanno permesso di riconoscere la specificità della compromissione miocardica nel paziente acromegalico portando alla nascita del concetto di cardiomiopatia acromegalica [7, 24-26]. Questa si caratterizza dal punto di vista morfologico per un'ipertrofia concentrica bi-ventricolare e, dal punto di vista funzionale, per una compromissione del riempimento diastolico isolato o associato ad un deficit sistolico evidenziabile, almeno nelle fasi iniziali della malattia, unicamente sotto sforzo. Le alterazioni funzionali ora descritte spesso hanno un carattere progressivo che può condurre fino a quadri conclamati di insufficienza cardiaca congestizia (3-10% dei pazienti acromegalici) [44,45,91].

Le cause che sottendono a queste alterazioni funzionali sono poco conosciute. Negli studi condotti in passato sono stati proposti diversi meccanismi fisiopatologici: (a) induzione GH mediata di ipertrofia dei cardiomiociti o di deposizione di fibre collagene con conseguente riduzione della distensibilità ventricolare [37,40]; (b) promozione da parte del GH dei fenomeni di apoptosi cardiomiocitaria [41].

Le ipotesi sopraelencate sono però in contrasto con i dati emersi da studi più recenti, che hanno dimostrato un ruolo del GH nell'inibire la fibrosi cardiaca TNF- α mediata nel modello animale [94], e un'azione anti-apoptotica del GH su linee cellulari cardiomiocitarie e non cardiomiocitarie [109,110-114].

Dagli studi clinici è inoltre emerso che un efficace controllo clinico e biochimico della malattia conduce alla regressione di gran parte delle alterazioni tipiche della cardiomiopatia acromegalica soprattutto nel paziente giovane e con breve durata della malattia[49-64].

Scopo di questo lavoro di tesi è quello di: (1) valutare, attraverso metodiche ecocardiografiche e di risonanza magnetica cardiaca (CMR), la prevalenza di ipertrofia ventricolare (sinistra) e l'eventuale presenza di processi evidenti di fibrosi cardiaca nel paziente acromegalico di nuova

diagnosi; (2) definire il ruolo del GH nella modulazione dell'apoptosi cardiomiocitaria attraverso esperimenti su linee cellulari di cardiomioblasti e sul modello murino bGH-MT di acromegalia.

(1) RISULTATI DALL'IMAGING UMANO

Lo studio è stato effettuato su 14 soggetti con malattia acromegalica di nuova diagnosi.

La valutazione morfologica effettuata attraverso ecocardiografia mono e bi dimensionale ha evidenziato la presenza di ipertrofia ventricolare sinistra (LVMI medio 110 ± 24 g/m²) in 5 soggetti in esame (36%); dal punto di vista funzionale è stata riscontrata un'alterazione della funzione diastolica (riduzione di IVRT e/o aumento del rapporto E/A) in 4 pazienti (29%) con conservata funzione sistolica (LVEF% 72 ± 12 %) in tutti i pazienti.

L'analisi *integrated backscatter* (IBS), utilizzata per la valutazione qualitativa della composizione tissutale del miocardio, ha rilevato la presenza di anomalie nella riflettività miocardica in 6 pazienti (medio 57.46.2%).

La valutazione con risonanza magnetica cardiaca, metodica significativamente più sensibile, ha dimostrato la presenza di ipertrofia ventricolare sinistra in 10 pazienti (72%); non è stata riscontrata alcuna alterazione morfologica a carico del ventricolo destro. Inoltre, l'analisi del *delayed contrast enhancement* dopo somministrazione di gadolinio non ha mostrato la presenza di aree fibrotiche nel contesto dello spessore miocardico dei soggetti in studio.

L'ecocardiografia rimane al momento la metodica di prima istanza nella valutazione morfo-funzionale della cardiomiopatia acromegalica nonostante sia meno sensibile della CMR nell'identificare l'alterazione cardiaca più caratteristica della malattia acromegalica. Inoltre, la mancata individuazione di aree di fibrosi all'indagine CMR mette in discussione il ruolo della fibrosi cardiaca nella patogenesi della disfunzione diastolica osservata nella cardiomiopatia acromegalica. Va tuttavia sottolineato come le alterazioni all'ecografica backscatter riconosciute nel gruppo in studio rappresentano un indice di aumentata disomogeneità tissutale riconducibile, nella maggior parte dei casi, ad un modesto aumento nel contenuto di fibre collagene interstiziali tale da non esser individuato con la CMR, o, in alternativa, ad un aumento delle dimensioni dei cardiomiociti [100,101] o ad un'espansione della matrice extracellulare [146].

(2) RISULTATI DALLO STUDIO SPERIMENTALE DEL MODELLO MURINO

Lo studio è stato effettuato su tre gruppi di animali ciascuno dei quali è stato valutato all'età di 3 e di 9 mesi: 1) topi wild type (Wt); 2) topi acromegalici bGH-MT (Acro); 3) topi bGH-MT trattati con Pegvisomant (AcroPeg).

Per ciascun gruppo e per le due età in studio sono stati sacrificati 5 animali. Su campioni tissutali provenienti dal ventricolo sinistro è stato valutato il tasso di apoptosi (mediante metodica TUNEL e con il saggio dell'ANNESSINA V) e l'espressione proteica attraverso metodica Western blot.

I dati preliminari su colture cellulari di cardiomioblasti (H9c2) sono coerenti con l'ipotesi emersa in letteratura di un'azione antiapoptotico del GH: (a) nelle colture esposte al GH (5 nM) è stato difatti riscontrata una riduzione nel numero di cellule apoptotiche, mentre nelle colture esposte a GH e pegvisomant (antagonista recettoriale del GH) non si è assistito a questo effetto. Inoltre, saggi effettuati dopo incubazione delle colture cellulari con specifici inibitori di vie coinvolte nella trasduzione del segnale (SB202190, PD098059 e Ly294002) suggeriscono un ruolo della via della p38MAPK (SB) e della p44/42MAPK (PD) nella modulazione GH mediata del fenomeno apoptotico. La via del PI3K (Ly) non sembra esser direttamente coinvolta in questo processo.

Nel gruppo Acro di tre mesi è stata riscontrata una riduzione nel tasso di apoptosi rispetto a quanto riscontrato nel topo wild type ($P < 0.0001$). Questa sembra essere dovuta ad un'azione diretta del GH come dimostrato dal ripristino nei topi AcroPeg di un tasso di apoptosi paragonabile a quello osservato nel gruppo dei Wt ($P < 0.0001$ vs. Acro). Il Western blot delle principali molecole coinvolte nella via apoptotica intrinseca conferma questo dato evidenziando la riduzione dei livelli citosolici di citocromo-C ($P < 0.002$), Bad, Bax, Apaf-1, Caspasi 9 e Caspasi 3 ($P < 0.0001$ per tutti queste vs. Wt) e di un aumento dei livelli mitocondriali del citocromo-C e dell'espressione di Bcl-XL e Bcl-2 ($P < 0.0001$ vs. Wt). Inoltre, la determinazione dell'espressione di molecole chiave nelle vie di trasduzione del segnale valutate in vitro, ha confermato (i) il mancato coinvolgimento della via della PI3K (di cui sono state valutate le subunità p110 alpha e gamma e l'espressione della proteina Akt, $P = ns$ vs Wt) nella trasduzione del segnale antiapoptotico del GH e (ii) il coinvolgimento delle vie della p38MAPK (p38) e della p44/42MAPK (ERK1/2, MEK 1/2, p90RSK). Tuttavia nel modello murino queste vie sembrano esercitare un ruolo antitetico rispetto a quello evidenziato in vitro. Infatti, l'espressione di p38, ERK 1/2 e p90RSK appare ridotta nel topo Acro ($P < 0.0001$ vs. Wt) suggerendo che l'effetto antiapoptotico del GH nel topo bGH-MT sia dovuto ad un'inattivazione di queste vie piuttosto che ad una loro attivazione. La somministrazione di pegvisomant modifica in modo sostanziale l'espressione proteica nei topi di 3 mesi portando ad un quadro sovrapponibile tra il gruppo dei topi AcroPeg e quello dei topi Wt. L'azione dell'antagonista recettoriale del GH è evidenziabile sia per l'espressione delle proteine coinvolte nella cascata apoptotica sia per quelle delle tre vie di trasduzione in studio.

Nei topi acromegalici più anziani (9 mesi) è stato riscontrato un aumento del tasso di apoptosi rispetto al gruppo Wt ($P < 0.0001$). Questo non sembra tuttavia essere direttamente GH mediato, come suggerito dalla mancata riduzione del tasso di apoptosi nel gruppo dei topi AcroPeg rispetto al gruppo dei topi bGH-MT non esposti al pegvisomant. L'analisi dell'espressione proteica conferma l'attivazione della cascata finale comune dell'apoptosi rivelata dall'aumento nell'espressione di Apaf-1 e delle caspasi 9 e 3 ($P < 0.0001$ vs. Wt). Il quadro che emerge dalla valutazione delle proteine della famiglia delle Bcl-2 non evidenzia una chiara modulazione positiva dell'apoptosi con aumento dell'espressione di Bad, Bcl-2, Bcl-XL e con una riduzione dell'espressione di Bax ($P < 0.0001$). L'espressione di tutte queste proteine non sembra esser influenzata in maniera statisticamente significativa dalla somministrazione del pegvisomant.

La valutazione dell'espressione delle proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale sembrano evidenziare una perdita della sensibilità al GH della via della p38MAPK e della p44/42MAPK nel topo anziano mentre la via di trasduzione del segnale della PI3K si è dimostrata essere, almeno in parte, regolata dal GH (p110 γ).

Per verificare ulteriormente l'efficacia dell'azione antiapoptotica del GH abbiamo esposto un gruppo di topi bGH-MT e uno di topi Wt dell'età di 3 mesi a dosi progressivamente crescenti di adriamicina (0,05, 0,5 e 2 mg/kg). La valutazione del tasso di apoptosi in questi gruppi ha confermato la capacità del GH nel ridurre i fenomeni di apoptosi nei topi bGH-MT sottoposti a basse (riduzione del 50%) o moderate (riduzione del 35%) concentrazioni di adriamicina ($P < 0.005$ vs gruppo Wt). Tuttavia, se sottoposti ad alte dosi dell'agente cardiotossico, l'azione protettiva del GH sembra venir meno come testimoniato dall'assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi sottoposti all'antraciclina.

I dati emersi da questo studio suggeriscono che il GH possa esercitare, almeno nel modello murino, un'azione antiapoptotica sui cardiomiociti; questa si esplica attraverso un aumento delle concentrazioni cellulari di proteine coinvolte nella modulazione negativa dell'apoptosi ed una parallela riduzione di quelle ad azione proapoptotica. Questo dato è coerente con quanto emerso (i) dagli studi preliminari sulle colture cellulari, (ii) dall'analisi del miocardio del topo giovane e (iii) dalla riduzione della cardiotossicità da adriamicina nei topi esposti ad elevate concentrazioni di GH.

Più controverso è il dato emerso nel topo anziano dove l'aumento del tasso di apoptosi non appare direttamente correlato ad un'azione del GH. Questa affermazione è suffragata sia dalla valutazione all'immunofluorescenza sia da quella Western Blot. Inoltre, il quadro non univoco emerso dalla valutazione delle proteine ad azione modulatore può rappresentare un indizio della contemporanea presenza di stimoli pro o antiapoptotici a carico dei cardiomiociti del topo esposto per un lungo periodo ad elevate concentrazioni di GH.

La natura degli stimoli in grado di attivare il processo apoptotico a livello cardiaco è varia e l'emergere di uno o più di questi processi (alcuni dei quali, come la deformazione meccanica ed il sovraccarico emodinamico possono esser osservati nel cuore acromegalico) potrebbe rendere conto dell'aumento nel tasso di apoptosi osservato nel topo anziano bGH-MT. E' da sottolineare tuttavia come anche una reazione adattativa e fisiologica, quale è la risposta iniziale miocardica al GH, possa condurre, qualora lo stimolo permanga per un intervallo di tempo non fisiologico, all'insorgenza di quadri di rimodellamento miocardico mal adattativo e quindi ad una progressiva perdita di cardiomiociti non più direttamente correlata allo stimolo iniziale e, pertanto, non più sensibile alla correzione dello squilibrio iniziale [150].

(3) CONCLUSIONI

Il primo concetto che emerge da questo lavoro di tesi è che l'utilizzo di metodiche di *imaging* caratterizzate da elevata sensibilità permette di riconoscere una maggiore prevalenza delle alterazioni cardiache tipiche della malattia acromegalica rispetto a quanto evidenziato con il tradizionale esame ecocardiografico.

Questo dato suggerisce chiaramente l'importanza dell'*imaging* cardiaco nell'attuale inquadramento clinico - patologico del paziente acromegalico. Difatti, le alterazioni morfo-funzionali evidenziabili da queste metodiche possono rappresentare un indice periferico di attività di malattia in grado di indirizzare il medico nella scelta del più corretto iter terapeutico.

Questa affermazione è corretta soprattutto in virtù degli studi clinici sull'efficacia della terapia, soprattutto nel paziente giovane e con un'acromegalia di breve durata, nel condurre ad una regressione delle anomalie caratteristiche della cardiomiopatia acromegalica.

Inoltre, a supporto dell'ipotesi della reversibilità delle alterazioni miocardiche del paziente acromegalico possono esser portati i risultati acquisiti dalla valutazione del delayed contrast enhancement in CMR. Infatti, il mancato riconoscimento di aree evidenti di fibrosi miocardica nel contesto dello spessore miocardico pone in dubbio il ruolo della deposizione di fibre collagene, e quindi di un processo di rimodellamento ritenuto irreversibile, nella genesi delle alterazioni diastoliche tipiche del paziente acromegalico.

Anche gli studi effettuati in vitro e sul modello sperimentale supportano il concetto dell'importanza di un precoce riconoscimento e di un'efficace terapia della cardiomiopatia acromegalica. Infatti, sebbene i risultati della nostra indagine escludano un diretto ruolo del GH nella stimolazione dell'apoptosi cardiomiocitaria, il dato che emerge dai gruppi Acro e AcroPeg anziani indica comunque che la stimolazione prolungata da parte del GH si può accompagnare all'insorgenza di fenomeni di sofferenza tissutale e di rimodellamento mal adattativo secondari attivati da meccanismi secondari ma non direttamente correlabili con l'azione del GH a livello miocardico.

I dati emersi dallo studio delle vie di trasduzione del segnale non possono essere considerati conclusivi. In particolare deve essere chiarito il reale ruolo delle vie di p38MAPK e di p44/42MAPK nella modulazione GH dipendente dell'apoptosi. Tuttavia, i dati ottenuti dal nostro studio forniscono uno schema molecolare, seppur generico, delle vie cellulari di trasduzione del segnale attivate dal GH a livello miocardio.

Infine, la dimostrazione del coinvolgimento delle vie di p38MAPK, p44/42MAPK e PI3K nella trasduzione del segnale del GH a livello cardiaco apre interessanti prospettive di ricerca sul ruolo del GH e di queste vie nel controllo della proliferazione cellulare e dell'ipertrofia cardiomiocitaria.

Introduzione

*Qui un uomo aveva tana, un mostro, che greggi
Pasceva, solo, in disparte, e con gli altri
Non si mischiava, ma solo viveva, aveva animo ingiusto.
Era un mostro gigante; e non somigliava
A un uomo mangiatore di pane, ma a picco selvoso
D'eccelesi monti, che appare isolato dagli altri*

[Odissea, Libro IX vv. 187-193

Traduzione di R Calzecchi-Onesti]



Fig. 1: L'ira di Polifemo. Annibale Carracci 1600 circa, particolare dell'affresco. Palazzo Farnese, Roma.

Potrebbe sembrare inusuale, parlando di acromegalia, utilizzare come *incipit* dei versi omerici, eppure una delle figure che meglio esemplifica questa patologia è sicuramente il ciclope Polifemo.

Infatti, se per “gioco” o, più probabilmente, per deformazione professionale cercassimo di inquadralo nell'ambito di qualche patologia medica, potremmo trovare dei parallelismi quanto meno curiosi tra le tipiche stigmate della malattia e la descrizione che la cultura greca ci ha lasciato dell'amante respinto di Galatea: ad esempio l'aumento delle dimensioni corporee, in particolare della testa e degli arti, la voce pesante e profonda, la ciclopia (che potrebbe esser rapportata ad una delle manifestazioni cliniche di una massa ipofisaria, l'emianopsia bitemporale).

Volendo continuare il nostro “gioco” e pensando alle complicanze che avrebbero afflitto il nostro sfortunato ciclope avremmo potuto ricordare tutta una serie di patologie, da quelle articolari alla sindrome del tunnel carpale, dalla sindrome da apnee ostruttive nel sonno fino alle più gravi patologie attualmente responsabili del decesso di questi soggetti, quali l'aumentata incidenza di neoplasie, il diabete mellito e, *venenum in cauda*, le malattie cardiovascolari.

Abbandoniamo ora il nostro omerico acromegalico. Fin dalla sua descrizione la malattia acromegalica è stata associata ad un'elevata morbilità e mortalità. Il miglioramento del *management* clinico della malattia acromegalica si è accompagnato ad un miglioramento nella qualità e nella prospettiva di vita di questi pazienti. Cionondimeno le complicanze cardiovascolari dell'eccesso del GH e dell'IGF-I continuano ad esser responsabili di un'importante morbilità.

Tra queste, il quadro sicuramente più frequente e peculiare è rappresentato dalla cardiomiopatia acromegalica. Questa si caratterizza dal punto di vista morfologico per un'ipertrofia ventricolare

concentrica e, dal punto di vista funzionale, da un difetto iniziale a carico del riempimento diastolico isolato o associato a alterazioni sistoliche fino a giungere a gravi quadri di insufficienza miocardica congestizia.

Sebbene il quadro clinico appaia quindi ben delineato, ciò non è vero per i meccanismi fisiopatologici che determinano le alterazioni morfofunzionali tipiche del miocardio del paziente acromegalico.

Infatti, se è nota l'azione ipertrofizzante del GH a livello miocardico, questa non sembra giustificare *in toto* il quadro funzionale. Ciò ha portato ad avanzare l'ipotesi, corroborata dagli studi autoptici e biotici, che il GH fosse implicato nella promozione dei processi di fibrosi miocardica e di apoptosi cardiomiocitaria.

Queste teorie sono tuttavia messe in discussione sia da evidenze sperimentali e, soprattutto, cliniche.

Finalità di questo lavoro di tesi sarà quella di fornire utili informazioni sul reale ruolo dell'eccesso di GH nei processi di fibrosi cardiaca e di apoptosi cardiomiocitaria.

Questo duplice risultato è reso possibile da un approccio integrato e multidisciplinare in cui la valutazione cardiaca con la risonanza magnetica cardiaca e l'ecografia backscatter alla ricerca di aree di fibrosi nello spessore del paziente acromegalico, si associa al dato sperimentale *in vitro* e sul modello murino bGH-MT di acromegalia sul ruolo del GH nella modulazione dei processi di morte cellulare programmata e sulle vie di trasduzione del segnale attraverso cui questa azione si esplica.

Il primo capitolo ha lo scopo di presentare sinteticamente le caratteristiche morfofunzionali tipiche della cardiomiopatia acromegalica e d'illustrare le evidenze a favore della specificità del quadro clinico e della possibilità di regressione delle anomalie morfologiche e funzionali a seguito del raggiungimento del controllo biochimico dell'acromegalia.

Il secondo ed il terzo capitolo sono rivolti alla descrizione dei due protocolli dello studio, delle metodiche di *imaging* e di laboratorio utilizzate ed alla presentazione dei dati ottenuti in questo lavoro di tesi.

Questi sono quindi analizzati e commentati nelle ultime due sezioni della presente tesi assieme ad alcune prospettive future di ricerca, suggerite dai nostri risultati.

In conclusione, vorrei sottolineare come questo argomento, apparentemente di nicchia, potrebbe rivelarsi di ben più ampio respiro. Infatti, da una parte la cardiomiopatia acromegalica rappresenta un interessante modello di scompenso cardiaco congestizio ad alta portata e di ipertrofia ventricolare concentrica; dall'altra il riconoscimento di un'azione del GH nella modulazione negativa dei processi di apoptosi cardiomiocitaria o di un suo ruolo nei processi di rimodellamento cardiaco potrebbero aprire interessanti spunti di ricerca nell'ambito di patologie di ben diverso peso epidemiologico, rispetto alla malattia acromegalica, quali l'insufficienza cardiaca e l'infarto acuto del miocardio.

Capitolo primo:**La Cardiomiopatia acromegalica****DEFINIZIONE E RUOLO NELLA STORIA NATURALE DELL'ACROMEGALIA**

L'acromegalia è una rara sindrome clinica caratterizzata da un eccesso cronico nei livelli plasmatici dell'ormone della crescita (*growth hormone*, GH) e della sua molecola effettrice, l'IGF-I dovuto, nella maggioranza dei soggetti (circa il 98%), alla presenza di un adenoma ipofisario GH-secrente insorto dopo la chiusura delle cartilagini di coniugazione [1,2,3,4].

Già i primi studi hanno posto in evidenza come questa patologia, al di là delle tipiche stigmate somatiche, sia caratterizzata da un ampio spettro di complicanze sistemiche che sono responsabili dell'elevata morbilità e mortalità osservabili nel paziente acromegalico.

Sebbene i primi studi epidemiologici effettuati quando non vi erano possibilità terapeutiche riportino che circa il 90% dei pazienti andava incontro ad *exitus* prima dei 60 anni [12], il riconoscimento dell'importanza del controllo biochimico della malattia [13] e l'introduzione di approcci terapeutici efficaci nel raggiungerlo hanno portato ad un progressivo miglioramento sia della qualità che delle prospettive di vita del paziente acromegalico.

Ciononostante ancor oggi il paziente acromegalico presenta un rischio di morte aumentato rispetto alla popolazione generale. A testimonianza di quest'ultima affermazione si sottolinea come una recente meta-analisi riporti per il paziente acromegalico un tasso standardizzato di mortalità (SMR) pari a 1.72 volte quello della popolazione generale e che, anche qualora si raggiunga un controllo ottimale della malattia, questo rimanga più elevato rispetto alla popolazione generale (SMR: 1.32) [14].

Tabella 1.1 Cause di morte nei pazienti acromegalici

	Decessi Osservati	Cause cardio- e cerebro-vascolari	Cause respiratorie	Cause Neoplastiche
Wright (1970)	50/194	38.5	18	18
Alexander (1980)	45/64	60	15.5	15.5
Nabarro (1987)	47/256	35	6	24.5
Bengtsson (1988)	119/166	47	0	24.5
Bates (1993)	28/79	57	25	11
Rajasoorya (1994)	32/151	62.5	0	9
Orme (1998)	366/1362	48.6	12	22
Swearingen (1998)	13/149	38	7	30
Ayuk (2004)	95/419	8.3	3	5
Holdaway (2004)	72/208	61	3	24
Colao (2005)	13/149	38	7	30

Numerosi studi hanno analizzato quali fossero le più frequenti cause di morte nel paziente acromegalico riconoscendo, in maniera sostanzialmente concorde, un ruolo di primaria importanza per gli eventi cardiovascolari (tabella 1.1) [5-9,12,15,16].

Le ragioni dell'alta incidenza di eventi cardiovascolari nel paziente acromegalico sono varie. Molte di queste - come l'ipertensione arteriosa, la ridotta tolleranza glucidica, il diabete mellito, le alterazioni della funzione endoteliale, la dislipidemia - non implicano un'azione diretta dell'eccesso di GH/IGF-I a livello cardiaco ma rappresentano piuttosto dei fattori di rischio cardiovascolare comuni anche alla popolazione generale [5,7,9-11].

Tuttavia è oramai evidente che il cuore rappresenti un organo bersaglio dell'azione del GH [9] e che un suo eccesso, quale si osserva nell'acromegalia, porti invariabilmente a delle alterazioni morfologiche e funzionali a carico del tessuto cardiaco.

In particolare il cuore del paziente acromegalico presenta alcune alterazioni che sembrano esser dovute alla diretta azione del GH/IGF-I e che sono solitamente indicate sotto il nome di **cardiomiopatia acromegalica** [5-11].

Questa, descritta per la prima volta da Huchard nel 1895 [17], può pertanto esser definita in termini generali come il complesso delle alterazioni morfologiche e funzionali miocardiche determinate dall'effetto diretto del GH e dell'IGF-I sul tessuto miocardico in assenza di altre patologie cardiache concomitanti [5-11].

Le caratteristiche principali di questa patologia sono rappresentate dal punto di vista morfologico dall'ipertrofia concentrica bi-ventricolare e, dal punto di vista funzionale, dalla compromissione del riempimento ventricolare diastolico isolato o associato ad un deficit sistolico evidenziabile, almeno nelle fasi iniziali della malattia, unicamente sotto sforzo [5-11,18].

L'importanza di questo quadro è quanto mai consistente sia a causa della sua alta prevalenza, che è stata stimata essere del 90% nel paziente acromegalico di lunga data, sia poiché, almeno nelle fasi iniziali della malattia, queste alterazioni morfo-funzionali sembrano poter andare incontro a regressione a seguito del raggiungimento del controllo di malattia [7].

Nei paragrafi successivi verranno presentate le prove a carico della specificità della cardiomiopatia acromegalica, le sue caratteristiche morfo-funzionali peculiari nonché i risultati degli studi clinici che ne suggeriscono la possibile reversibilità.

Nell'ultimo paragrafo verranno sinteticamente illustrate le altre complicanze cardiache dell'acromegalia. Per una trattazione più accurata di queste si rimanda alla letteratura specialistica [10].

CARDIOMIOPATIA ACROMEGALICA: UNA SPECIFICA ENTITÀ ?

In letteratura è stato dibattuto a lungo se l'eccesso di GH e di IGF-I sia direttamente responsabile delle alterazioni morfofunzionali tipiche del paziente acromegalico o se queste rappresentino la semplice conseguenza delle complicanze cardiovascolari della malattia acromegalica.

Attualmente la specificità di questo quadro patologico è riconosciuto da tutti gli autori.

I dati a sostegno della peculiarità del quadro sono numerosi: sia diretti che indiretti. Ne ricordo ora solo i più significativi. Una trattazione più accurata di molti di questi è riportata nei paragrafi seguenti e nella letteratura specializzata [4-11].

I dati diretti derivano da studi sperimentali e consistono essenzialmente in tre aspetti: (i) a livello del tessuto miocardico sono stati riconosciuti i recettori specifici sia per il GH che per la sua molecola effettrice [19,20]; (ii) studi *in vitro* hanno dimostrato che il GH e l'IGF-I agiscono in maniera endocrina e paracrina a livello cardiaco dove, attraverso l'attivazione della via di Akt, stimolano l'ipertrofia cardiomiocitaria [21,22]; (iii) nel modello murino eccessi cronici di GH portano ad alterazioni cardiache simili a quelle osservate nel paziente acromegalico [23].

Le evidenze indirette derivano dall'osservazione clinica del paziente acromegalico. Le principali sono le seguenti: (i) circa la metà dei soggetti acromegalici presenta all'ecocardiografia quadri

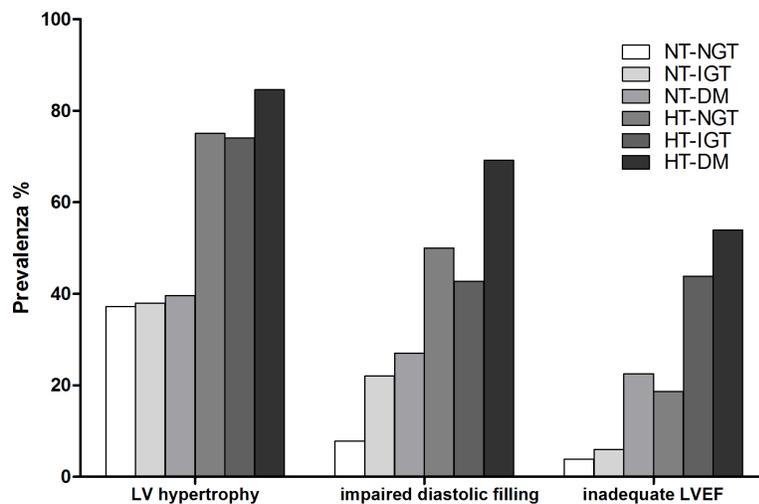


Figura 1.1 Prevalenza dell'ipertrofia ventricolare sinistra, di anomalie del riempimento diastolico ($E/A < 1$) e della funzione sistolica ($LVEF < 50\%$) in 130 pazienti acromegalici suddivisi in 6 gruppi sulla base della presenza o assenza di ipertensione arteriosa e alterazioni nel metabolismo glucidico. NT-NGT pazienti senza ipertensione arteriosa e alterazioni nel metabolismo glucidico; NT-IGT paz. non ipertesi ma con alterata tolleranza glucidica; NT-DM paz. non ipertesi ma con diabete mellito; HT-NGT paz. ipertesi senza alterazioni nel metabolismo glucidico; HT-IGT paz. ipertesi con alterata tolleranza glucidica; HT-DM paz. con ipertensione e diabete mellito (ridisegnata da fig 1 pag 196 di ref [26])

compatibili con un'ipertrofia ventricolare concentrica [5-11]; (iii) tali quadri possono essere osservati anche nell'acromegalico non complicato da ipertensione o da alterazioni nella tolleranza glucidica [24-26]; (iii) sebbene sia supportato da un numero limitato di studi, l'ipertrofia sembra coinvolgere anche le sezioni destre del cuore suggerendo quindi che questa non sia esclusivamente una risposta funzionale all'ipertensione arteriosa [5,24]; (iv) la maggior parte dei pazienti con acromegalia, ma senza ipertensione o aterosclerosi, ha evidenza subclinica di disfunzione cardiaca, soprattutto diastolica [27]; (v) le alterazioni morfo-funzionali osservabili in questi pazienti possono andar incontro a regressione a seguito di una terapia in grado di controllare biochimicamente la malattia [5-11,49-64]; (vi) fino al 10% degli acromegalici presenta insufficienza cardiaca congestizia franca. Probabilmente un quarto di tali individui non ha una causa predisponente nota [5,6,8-10]; (vii) circa il 50% dei pazienti acromegalici presenta alterazioni elettrocardiografiche [28].

ANOMALIE MORFOLOGICHE E STRUTTURALI NELLA CARDIOMIOPATIA ACROMEGALICA

L'anomalia cardiaca di più frequente riscontro nel soggetto acromegalico è rappresentata indubbiamente dalla cardiomegalia [5-11].

L'aumento delle dimensioni cardiache è stato indagato dal punto di vista autoptico e, soprattutto, dal punto di vista ecocardiografico. Il quadro che ne emerge è che la cardiomiopatia acromegalica si configuri come un'ipertrofia bi-ventricolare concentrica.

Difatti l'esame ecocardiografico evidenzia, nella gran parte degli acromegalici, un aumento della massa ventricolare (LVM) e dello spessore delle pareti ventricolari (parete posteriore del ventricolo sinistro, LVPWT, e setto interventricolare, IVST) associati a diametri ventricolari sostanzialmente nella norma [18,24-27,29-34,36]. Inoltre, sebbene queste alterazioni siano state osservate a carico delle sezioni sinistre, vi sono evidenze sperimentali del contemporaneo coinvolgimento delle sezioni destre [5-11].

La conferma che l'ingrandimento osservato rappresenti un vero e proprio quadro ipertrofico e non sia più semplicemente inquadrabile nella visceromegalia generalizzata del paziente acromegalico è fornita dalla valutazione della massa ventricolare sinistra indicizzata per la superficie corporea (LVMi, *left ventricular mass index*).

Questo parametro, che rappresenta il *gold standard* per porre diagnosi di ipertrofia ventricolare, indica un tasso di prevalenza dell'ipertrofia cardiaca variabile in base agli autori ed alle caratteristiche della popolazione in studio. Tuttavia, se si estrapola in maniera grossolana un valore medio dalla letteratura, il LVMi permette di evidenziare quadri d'ipertrofia ventricolare sinistra in circa il 50% dei pazienti [6,7,10,18,33-35].

Vari studi hanno provato a correlare il grado di ipertrofia ventricolare con i livelli circolanti sia di GH che di IGF-I [18, 34] senza giungere tuttavia ad un dato conclusivo. Al contrario è stato dimostrato che, seppur il quadro ipertrofico sia osservabile anche nel paziente non complicato, la sua prevalenza aumenta in maniera significativa se la malattia acromegalica si complica con il diabete mellito e, soprattutto, con l'ipertensione arteriosa (figura 1.1) [26].

Più controversa è invece la correlazione tra il grado di ipertrofia e la durata stimata della malattia in quanto alcuni autori hanno riscontrato una correlazione statisticamente significativa [18,29] mentre altri non hanno trovato differenze significative nel LVMi sulla base della durata della malattia [36].

Queste informazioni derivate dagli studi ecocardiografici sono concettualmente in accordo con quanto rilevato dagli studi autoptici.

I dati anatomopatologici ed ultrastrutturali a nostra disposizione sulla cardiomiopatia acromegalica sono scarni a causa del ridotto numero dei casi che afferiscono ai singoli istituti.

Inoltre, questi derivano ancor oggi dalle prime serie autoptiche che indicano nell'ipertrofia cardiaca e in un'estesa fibrosi interstiziale le caratteristiche cardinali della cardiomiopatia acromegalica [37-40].

A titolo esemplificativo riporto come, nello studio che ha raccolto il numero maggiore di casi (27 soggetti) ha evidenziato la presenza di ipertrofia ventricolare in quasi la totalità dei pazienti (fino 90% nei casi con durata di malattia superiore a 10 anni) e di fibrosi interstiziale nell'85% dei tessuti esaminati [37].

Altre alterazioni strutturali osservate nel cuore del paziente acromegalico sono rappresentate dalle valvulopatie (mitraliche e soprattutto, aortiche) e dalla dilatazione delle camere cardiache che si osserva tuttavia unicamente nelle fasi terminali della malattia e si associa ad una prognosi infausta [37].

Dal punto di vista ultrastrutturale questi studi hanno riscontrato l'ipertrofia dei cardiomiociti, la disorganizzazione delle miofibrille e la deposizione extracellulare di fibre collagene.

Inoltre queste serie riferiscono frequentemente la presenza di un infiltrato linfo-monocitario rassomigliante ad un quadro di miocardite e, in alcuni soggetti, di aree di necrosi [37-40].

Infine, vorrei qua ricordare come, sulla base di dati bioptici cardiaci, Frustaci *et al* abbiano proposto che nel cuore acromegalico vi sia un aumento del tasso di apoptosi sia a carico dei cardiomiociti che delle cellule non cardiomiocitarie associato anche ad estesi processi di deposizione di fibre collagene (8 volte maggiore rispetto ai controlli) [41].

ANOMALIE FUNZIONALI DELLA CARDIOMIOPATIA ACROMEGALICA

Dal punto di vista funzionale, il quadro più caratteristico della cardiomiopatia acromegalica, almeno nelle sue fasi iniziali, è rappresentato dall'inadeguata capacità di riempimento diastolica (riscontrata di circa il 30% dei pazienti di nuova diagnosi [5-11,26]).

Questa è evidenziabile all'esame ecocardiografico dalla (i) riduzione nella pendenza dell'onda di riempimento diastolico, (ii) dalla diminuzione del rapporto E/A (il rapporto tra la velocità del flusso ematico nelle fasi precoci e quelle tardive del riempimento ventricolare) e (iii) dall'allungamento del tempo di rilasciamento isometrico [7,10].

Le alterazioni funzionali possono rimanere silenti per anni prima che il coinvolgimento cardiaco diventi evidente. Tuttavia vi sono evidenze cliniche che dimostrano come, in condizioni di stress cardiaco, sia possibile evidenziare in alcuni pazienti un deterioramento nella funzione sistolica; questo è probabilmente secondario ad un precarico inadeguato a causa della ridotta *compliance* ventricolare. [7,10].

In particolare, studi clinici effettuati con la scintigrafia miocardica da stress su pazienti non affetti da altre complicanze (diabete ed ipertensione arteriosa), hanno confermato il quadro ora esposto dimostrando un decremento della tolleranza all'esercizio fisico ed un mancato aumento o perfino una riduzione della frazione di eiezione. Questo quadro è stato evidenziato in circa il 40% dei giovani pazienti acromegalici studiati e nel gruppo dei soggetti più anziani, fino al 95% [27,42].

I dati ora esposti supportano quindi l'ipotesi che una lunga esposizione ad elevati livelli di GH e IGF-I abbia degli effetti detrimenti sulle performance cardiache anche in assenza di diabete e ipertensione arteriosa. Tuttavia, come prevedibile, la presenza di uno od entrambi questi quadri si associa ad una prevalenza maggiore sia delle alterazioni morfologiche che di quelle funzionali (se presenti entrambi l'ipertrofia ventricolare è stata riscontrata in circa 85% dei soggetti studiati mentre le alterazioni diastoliche e sistoliche sono state evidenziate rispettivamente nel 70 e nel 50% dei casi, vedi figura 1.1 pag 14) [26].

Va inoltre sottolineato che le alterazioni diastoliche possono essere osservate anche nei soggetti che non presentano ipertrofia ventricolare sinistra all'ecocardiografia. Questo concetto è stato dimostrato da Herrmann *et al* [43] valutando *in toto* la funzione ventricolare del paziente acromegalico attraverso l'indice di Tei (un indice ecocardiografico dato dal rapporto tra la somma dei tempi di contrazione isometrica e del tempo di rilasciamento ventricolare e il tempo di eiezione).

Questo autorevole studio suggerisce inoltre che le alterazioni funzionali diastoliche del paziente acromegalico siano correlabili sia con la durata stimata che con l'attività di malattia suggerendo quindi la possibilità di un recupero funzionale a seguito del controllo biochimico dell'acromegalia.

Sebbene siano stati compiuti numerosi studi sulla compromissione funzionale del cuore acromegalico, pochi dati sono presenti in letteratura sulle caratteristiche e sulla prevalenza dell'insufficienza cardiaca nel paziente acromegalico.

Il primo studio su questa tematica risale a circa 20 anni fa e suggerisce che l'insufficienza cardiaca sia una complicanza poco frequente del paziente acromegalico (solo 2 pazienti dei 256 analizzati presentavano un quadro clinico evidente e 7 segni clinici di insufficienza cardiaca) [44].

Più recentemente, Damjanovics *et al* sono andati a valutare quale è l'incidenza dei segni e dei sintomi dell'insufficienza cardiaca di nuova diagnosi dimostrando che, sulla base della valutazione clinica dell'esame ecocardiografico, è possibile riconoscere segni e/o sintomi di scompenso cardiaco nel 10% dei pazienti. Inoltre, questi autori hanno evidenziato che l'insufficienza cardiaca del paziente acromegalico si configura con le caratteristiche dell'insufficienza ad alta portata caratterizzata quindi da una funzionalità sistolica che non si discosta dai valori normali e da un aumento dell'indice cardiaco (ovvero della portata cardiaca corretta per le dimensioni corporee) [45].

In conclusione i dati proposti in questo paragrafo e nel precedente hanno portato alcuni autori ad ipotizzare che l'evoluzione naturale della cardiomiopatia acromegalica avvenga attraverso tre fasi [5]:

- La maggior parte dei pazienti acromegalici è asintomatica per molti anni. Durante questa fase talvolta è possibile osservare una sindrome ipercinetica caratterizzata da un aumento della frequenza cardiaca e della gittata sistolica e da una parallela diminuzione delle resistenze vascolari [50].
- In seguito l'ipertrofia ventricolare diviene più evidente e la funzione diastolica inizia a deteriorarsi. Una compromissione della funzione sistolica può esser evidente durante lo sforzo fisico.
- Qualora la malattia acromegalica e le alterazioni cardiologiche non vengano riconosciute la funzionalità cardiaca si deteriora ulteriormente fino a giungere a quadri di insufficienza cardiaca congestizia con marcata riduzione nella capacità eiettiva e con un parallelo aumento della pressione tele diastolica ventricolare.

ELEMENTI DI FISIOPATOLOGIA

Nei paragrafi precedenti sono state illustrate le caratteristiche morfo-funzionali della cardiomiopatia acromegalica.

Sebbene queste alterazioni siano state chiarite in larga misura dal punto di vista clinico, le cause che le determinano sono poco note.

La teoria che gode della maggior solidità scientifica si fonda sulle proprietà trofiche e inotrope dell'asse GH/IGF-I a livello cardiaco.

Difatti, evidenze sperimentali [19-22] dimostrano che a livello cardiomiocitario sia il GH che l'IGF-I portano all'attivazione della via di trasduzione del segnale di PI3K e che questa induca un aumento nell'espressione di alcune proteine sarcomeriche quali la catena leggera della miosina e la troponina.

Le nuove fibre contrattili prodotte si appongono l'una di fianco all'altra determinando in definitiva, l'aumento del diametro cardiomiocitario trasverso.

Tuttavia, gli studi autoptici hanno portato ad ipotizzare che questo non sia il solo meccanismo attraverso il quale l'eccesso di GH conduce al progressivo danno cardiaco dell'acromegalico ma che sia parimenti importante anche una presunta azione dell'ormone della crescita nello stimolare alla sintesi ed alla deposizione interstiziale di fibre collagene [37-41].

Inoltre, sulla base di uno studio biotico è stata avanzata l'ipotesi che il GH stimoli i processi di morte cellulare programmata [41] e che il progressivo depauperamento nel numero dei cardiomiociti sia responsabile della progressiva diminuzione delle funzionalità miocardica osservata in alcuni soggetti acromegalici.

Un ulteriore elemento che potrebbe essere all'origine delle alterazioni cardiache tipiche dell'acromegalia è l'aumento del volume extracellulare e del contenuto di acqua nell'interstizio [47]. Infatti, da tempo è noto che il GH ha delle proprietà antidiuretiche e antinatriuretiche.

Un'ipotesi che è stata avanzata è che il GH espliciti queste azioni attraverso la modulazione dell'espressione a livello del tubulo renale del cotrasportatore $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ (NKCC2) [48].

EFFETTI DELLA TERAPIA SULLA CARDIOMIOPATIA ACROMEGALICA

Un numero consistente di studi clinici indica che la normalizzazione dei valori di GH ed IGF-I è in grado di arrestare la progressione della cardiomiopatia acromegalica [49-55].

Questo concetto è confermato dai dati epidemiologici dai quali si desume come l'ottenimento di un buon controllo della malattia sia associato ad una consistente riduzione sia della morbilità che della mortalità cardiovascolare in questa classe di pazienti [12,14-16].

Sebbene siano stati effettuati studi sull'efficacia della terapia chirurgica [56] e della terapia radiante [57], sicuramente la maggior parte degli studi ha focalizzato l'attenzione sull'efficacia della terapia con analoghi della somatostatina.

In particolare, dall'analisi della letteratura, emerge che il trattamento con octreotide sc [58,59], octreotide LAR [54] e lanreotide [60,61] siano in grado di migliorare significativamente gli indici cardiovascolari.

Inoltre, sebbene un effetto positivo sulle performance cardiache sia stato osservato già dopo 24 ore di infusione continua per via sottocutanea di octreotide [62] o dopo un'unica somministrazione per via intra muscolare di lanreotide [61], la riduzione dell'ipertrofia cardiaca e il miglioramento della funzione diastolica sono visibili in maniera più evidente solo dopo 6-12 mesi di terapia [49,51-56, 60,61].

Importante è inoltre sottolineare come i migliori risultati nel recupero funzionale sisto-diastolico siano più marcati nei pazienti in cui viene raggiunto un buon controllo della malattia. *Contra*, qualora non si riesca ad ottenere un soddisfacente controllo della malattia, tali effetti non si evidenziano ma si ha un ulteriore peggioramento della funzione cardiaca [5-11,52-54].

L'azione benefica della terapia si esplica anche qualora il quadro clinico sia evoluto al punto di portare a quadri di insufficienza cardiaca [50]. Questo è particolarmente importante in quanto, sebbene si tratti di una minoranza dei pazienti, l'insufficienza cardiaca del paziente acromegalico si è dimostrata essere poco responsiva alle terapie convenzionali del cuore scompensato [5-11].

La remissione dell'ipertrofia ventricolare e delle alterazioni funzionali sembra comunque dipendere non solo dallo stretto controllo biochimico della malattia acromegalica ma anche dall'età del paziente e dalla durata dell'eccesso di GH e IGF-I prima dell'inizio della terapia. Questo importante dato si ricava dai risultati di uno studio del gruppo della professoressa A.M. Colao [63]. Nello specifico in questo studio condotto su 22 pazienti acromegalici in terapia da un anno con Lanreotide-LAR e con raggiungimento del controllo biochimico di malattia (IGF-I normale per età), la regressione dell'ipertrofia ventricolare sinistra e il ripristino della frazione di eiezione al momento del massimo sforzo fisico sono risultati statisticamente più frequenti nei soggetti più giovani (età inferiore a 40 anni) rispetto a quanto osservato nei pazienti più anziani (età maggiore di 40 anni) (figura 1.X).

Recentemente Maison et altri hanno condotto un'interessante meta-analisi sull'effetto della terapia con analoghi della somatostatina sulla cardiomiopatia acromegalica [64].

In questa sono stati esaminati un totale di 18 studi a partire dal 1989 al 2003 per un totale di 290 pazienti trattati con octreotide, octreotide LAR o lanreotide per un periodo di trattamento variabile tra i 6 e i 12 mesi.

Da questa valutazione, di cui riporto nella figura 1.X la tabella conclusiva, è emerso che gli analoghi della somatostatina determinino una significativa riduzione della massa ventricolare sinistra (LVM e la sua forma indicizzata, LVMi) evidente soprattutto a carico dello spessore del setto interventricolare (IVS) e di quello della parete posteriore del ventricolo sinistro (PWLV). Inoltre, dai dati presentati in questo studio sembra possibile concludere che l'entità della riduzione divenga più marcata quanto più ampia è la riduzione dei livelli di GH e IGF-I.

Oltre ai parametri morfologici anche degli indicatori di funzionalità cardiaca sono risultati essere corretti dalla terapia con analoghi della somatostatina. In particolar modo è stato possibile evidenziare un significativo miglioramento della tolleranza all'esercizio fisico, una riduzione della frequenza cardiaca (HR), un aumento del rapporto E/A e una tendenza, seppur con supportata dalla significatività statistica, verso un aumento della frazione di eiezione.

Nel complesso i dati esposti in questo paragrafo sembrano suggerire in maniera forte che il raggiungimento di un controllo biochimico dell'acromegalia possa accompagnarsi ad una regressione delle anomalie tipiche della cardiomiopatia acromegalica e che questo sia possibile con una maggior frequenza nel paziente giovane o con durata limitata di malattia.

Inoltre, questi risultati pongono in evidenza come la necessità di una diagnosi il più precoce possibile della malattia acromegalica sia sempre più un'esigenza clinica indubbia. [63]

In appendice a questo paragrafo vorrei sottolineare che sia a livello cardiomiocitario (ss1 e ss2) che a livello dei fibroblasti del tessuto miocardico (tutti e 4 i sottotipi) è stata dimostrata l'espressione dei recettori di membrana della somatostatina [65]. Questo dato è importante in quanto pone in dubbio che l'effetto osservato durante la terapia con gli analoghi della somatostatina sia imputabile unicamente alla riduzione dei valori di GH e IGF-I oppure sia,

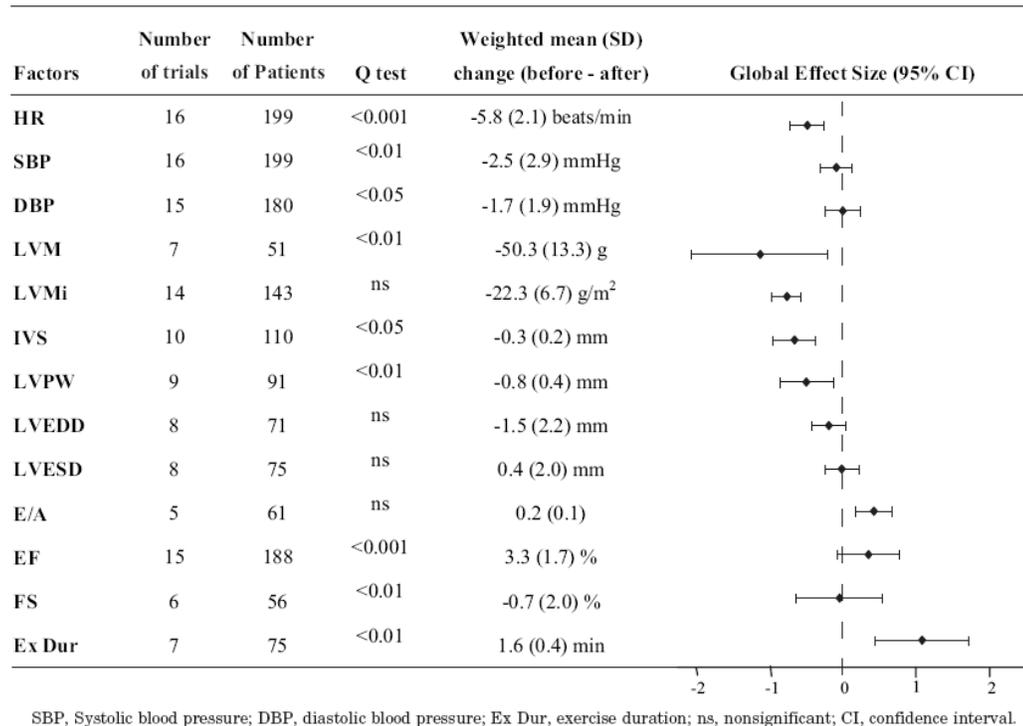


Figura 1.X Risultati della meta-analisi sulla azione degli analoghi della somatostatina a livello cardiaco (tabella 2 pag 1745 di ref [64])

almeno in parte, dovuto ad un'azione diretta di questi farmaci a livello miocardico.

Supporto alla prima ipotesi è dato da un recente articolo in cui, per la prima volta, è stato valutato l'effetto dell'antagonista recettoriale del GH (pegvisomant) sulle alterazioni cardiache del paziente acromegalico [66]. In questo studio Pivonello *et al.* hanno difatti osservato che la somministrazione dell'antagonista recettoriale del GH (dosi comprese tra 10 e 40 mg/die) per 6 mesi si accompagna ad una significativa riduzione degli indici di ipertrofia ventricolare sinistra (massa ventricolare sinistra, indice di massa ventricolare sinistra ($P<0.001$), spessore della parete posteriore del ventricolo sinistro, spessore del setto interventricolare) mentre non è in grado di influenzare in maniera statisticamente significativa i parametri funzionali.

Tuttavia, quando l'effetto del pegvisomant è stato valutato dopo 12 mesi dall'inizio della terapia è stato possibile rilevare una riduzione del tempo di rilasciamento isometrico, un aumento del rapporto E/A e un aumento della frazione di eiezione. Questi dati indicano pertanto che la somministrazione prolungata di pegvisomant non solo si accompagna ad una riduzione della prevalenza dell'ipertrofia ventricolare sinistra (anch'essa più marcata nel gruppo dei pazienti trattati più a lungo) ma determina anche un miglioramento della funzionalità sistolica e della capacità di riempimento diastolica.

ALTRE COMPLICANZE CARDIACHE DELL'ACROMEGALIA

Non è negli scopi di questo scritto analizzare in maniera accurata tutte le alterazioni cardiologiche che si possono accompagnare alla cardiomiopatia acromegalica, tuttavia per completezza riporto in questa sezione alcuni elementi cardinali delle altre patologie che colpiscono il sistema cardiovascolare del paziente acromegalico. Una trattazione più esaustiva si trova in letteratura [5-11].

Anomalie del ritmo

Sebbene la letteratura sulle complicanze aritmiche dell'acromegalica sia estremamente limitata, tuttavia, dall'analisi di questi dati è possibile evidenziare una maggior frequenza di anomalie del ritmo nel paziente acromegalico rispetto a quanto osservato nella popolazione generale [28,67,68].

Queste alterazioni sono rappresentate soprattutto da battiti ectopici, da episodi di fibrillazione atriale parossistica, di tachicardia ventricolare e da blocchi di branca evidenti soprattutto durante l'esercizio fisico.

Circa il 40% dei pazienti acromegalici presenta una di queste aritmie al momento della diagnosi la cui frequenza sembra correlarsi alla durata della malattia mentre la gravità è stata

associata soprattutto al grado dell'ipertrofia ventricolare sinistra ma non ai livelli sierici di GH [28].

Le cause alla base di questi quadri di alterazione nei fenomeni elettrici sono lungi dall'esser compresi. Le ipotesi che è sono state avanzate indicano nel sovvertimento strutturale miocardico [68] o nella deposizione di tessuto fibroso nello spessore del miocardio [7] le cause scatenanti. Queste ipotesi debbono esser tuttavia ancora verificate.

Un contributo alla comprensione delle cause scatenanti delle alterazioni dell'attività elettrica cardiaca potrebbe venire dagli studi sugli effetti della terapia con analoghi della somatostatina. Tuttavia il dato che emerge dai pochi studi effettuati non è al momento conclusivo in quanto alcuni studi evidenziano una reversibilità delle complicanze aritmiche [69,70] mentre altri autori non hanno osservato differenze nel quadro elettrico dovute al raggiungimento del controllo della malattia [67,68].

Disfunzioni endoteliali e aterosclerosi

L'endotelio è un tessuto estremamente attivo dal punto di vista metabolico e gioca un ruolo chiave nei processi di omeostasi vascolari soprattutto attraverso il rilascio di sostanze vasoattive ad azione paracrina e autocrina. Tra le varie sostanze prodotte quella che sicuramente rappresenta la più studiata è rappresentata dall'ossido nitrico (NO).

Tra le numerose azioni di questa molecola possiamo brevemente ricordare la modulazione del tono vascolare e l'inibizione di alcuni processi proaterogenici quali l'adesione piastrinica e monocitaria, l'ossidazione delle LDL, la sintesi di citochine ad attività pro infiammatoria, la proliferazione della muscolatura liscia e l'aggregazione piastrinica.

La disfunzione endoteliale rappresenta lo stadio iniziale dell'aterosclerosi [71] ed è attualmente considerata un fattore predittivo del futuro sviluppo della cardiopatia ischemica [72].

Sia il GH che l'IGF-I sono stati dimostrati essere in grado di influenzare l'azione della eNOS [73-75].

Gli studi sulla funzione endoteliale del paziente acromegalico sono limitati, sebbene vi si siano delle evidenze di alterazioni emodinamiche in questa classe di pazienti.

Ad esempio, Chanson *et al.* Hanno dimostrato una riduzione nel flusso ematico a livello dell'arteria brachiale con un significativo aumento delle resistenze vascolari a livello dell'avambraccio nei pazienti acromegalici confrontati con dei soggetti di controllo [76]. In un secondo studio Maison ha evidenziato, a carico del circolo cutaneo della mano, una ridotta vasodilatazione endotelio-indotta ed una maggiore risposta vasocostrittrice mediata dal sistema nervoso simpatico in pazienti acromegalici senza ipertensione arteriosa [77].

Sebbene non sia stata riportata un'aumentata prevalenza di placche aterosclerotiche nei pazienti acromegalici rispetto alla popolazione generale Colao *et al* hanno documentato, per via ecocardiografica, un ispessimento medio-intimale a livello carotideo in pazienti acromegalici con malattia attiva o in remissione [78] documentando anche la capacità della terapia con analoghi della somatostatina di portare ad una significativa regressione di tali lesioni [79].

Al contrario il gruppo dell'università di Osaka ha riportato una minor incidenza di ispessimento parietale nelle carotidi dei pazienti acromegalici rispetto a quanto osservato nei controlli ipotizzando pertanto un ruolo protettivo dell'IGF-I sullo sviluppo dell'aterosclerosi [80].

Questi dati, insieme a quelli proposti da Brevetti [81] suggeriscono a mio avviso che le alterazioni medio-intimali che vengono riscontrate nel paziente acromegalico siano più probabilmente secondarie all'aumentata prevalenza in questa popolazione di fattori di rischio aterosclerotici (quali l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito e la dislipidemia) piuttosto che all'eccesso di per sé e che gli effetti benefici della terapia con analoghi della somatostatina sia imputabile ad un miglioramento del profilo del rischio aterosclerotico piuttosto che alla riduzione dei livelli di GH e IGF-I.

Cardiopatía ischemica e acromegalia

Anche per quanto riguarda la patologia coronarica i dati ottenuti nella popolazione acromegalica sono esigui e discordanti con un tasso di prevalenza che varia tra il 3 e il 37% in base alle diverse statistiche [10].

Studi *in vivo* hanno rilevato che nel paziente acromegalico la scintigrafia miocardica perfusionale è in grado di rilevare un difetto di vascolarizzazione nel 20% dei casi [27].

Più recentemente alcuni studi sono andati a valutare il rischio di cardiopatía ischemica nel paziente acromegalico utilizzando il Framingham Score (FS) e la valutazione dei depositi di calcio a livello coronarico attraverso TC del cuore. Tuttavia anche in questo caso i risultati non sono conclusivi in quanto in uno studio è risultato un importante aumento del rischio cardiopatía ischemica nel 41% dei soggetti valutati e una similare prevalenza di calcificazione coronarica [82] mentre in uno studio prospettico eseguito presso il nostro dipartimento su 52 pazienti acromegalici studiati per 5 anni ha evidenziato che utilizzando il FS nel 71% il rischio di eventi cardiovascolari è basso ($FS < 10$), nel 27% è considerabile intermedio e solo nel 2% dei casi elevato ($FS \geq 20$) [83].

Ipertensione arteriosa

La prevalenza dell'ipertensione arteriosa nei pazienti con acromegalia è riportata in vari studi epidemiologici e varia dal 18 al 57% dei pazienti con tuttavia un ampio grado di variabilità per quanto concerne i *cut off* utilizzati per identificare i pazienti con ipertensione arteriosa [10, 84-88].

La patogenesi dell'ipertensione nel paziente acromegalico non è stata chiarita in maniera completa sebbene sia dovuta ad un meccanismo multifattoriale. Infatti, il dato proposto in precedenza sull'azione del GH e dell'IGF-I sulla sintesi del monossido di azoto, nonché l'azione diretta di queste molecole sulle cellule muscolari lisce vasali potrebbero esser coinvolte nella genesi dell'aumento pressorio, soprattutto diastolico [88-90].

Un secondo elemento che può contribuire all'aumento della pressione arteriosa nell'acromegalia è rappresentato dalle alterazioni cardiache specifiche della malattia. Infatti, se nelle prime fasi l'ipertensione arteriosa potrebbe esser dovuta, almeno in parte, ad un circolo ipercinetico, nelle fasi più avanzate, la compromissione funzionale potrebbe rendersi responsabile dell'aumento pressorio.

Infine, anche le azioni antidiuretiche e antinatriuretiche del GH, con il corrispondente aumento della quantità di acqua corporea di questi pazienti potrebbe esser implicato nella genesi di questo quadro.

Capitolo secondo

Risonanza Magnetica Cardiaca ed ecografia *backscatter* nella valutazione della cardiomiopatia acromegalica

INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO

Nel primo capitolo è stato illustrato come la cardiomiopatia acromegalica rappresenti una delle più importanti conseguenze dell'eccesso di GH tipico della malattia acromegalica.

Questa si caratterizza, dal punto di vista morfologico, per un'ipertrofia concentrica bi-ventricolare e, dal punto di vista funzionale, per una compromissione del riempimento diastolico isolato o associato ad un deficit sistolico evidenziabile, almeno nelle fasi iniziali della malattia, unicamente sotto sforzo.

Le cause che sottendono al tale quadro sono tuttavia poco conosciute.

Fino a pochi anni fa, l'ipotesi accolta dalla maggior parte degli autori vedeva il momento patogenetico fondamentale nell'induzione, GH mediata, della deposizione di fibre collagene all'interno delle pareti ventricolari.

Pertanto, le alterazioni sisto-diastoliche tipiche del paziente acromegalico rappresenterebbero essenzialmente il risultato della compromessa *compliance* ventricolare che si accompagna ai processi di rimodellamento fibrotico del miocardio [5-11].

Il razionale alla base di quest'ipotesi derivava dall'analisi delle prime serie autoptiche di pazienti acromegalici [37-40]. Difatti, tali studi evidenziavano un'elevata prevalenza di fibrosi interstiziale nel miocardio di questi pazienti (circa il 50% dei soggetti esaminati).

Recentemente si è assistito ad una profonda revisione di questa ipotesi. Infatti, un esame più critico ha rilevato il possibile ruolo dei fenomeni ischemici nella genesi dei processi cicatriziali individuati nei primi studi; inoltre lo sviluppo di un efficace approccio terapeutico alla malattia acromegalica ha portato dati consistenti a dimostrazione della reversibilità, soprattutto nel paziente giovane e con minor durata di malattia, delle alterazioni morfo-funzionali caratteristiche del miocardio di questi pazienti [49-64].



Figura 2.1 Mark Rothko N° 14. (White and Greens in Blue); 1957. National Gallery of Art, Washington DC.

Questi dati clinici, supportati anche da dati anatomopatologici su soggetti acromegalici andati incontro a trapianto cardiaco [91], sono manifestamente in contrasto con l'ipotesi iniziale data la supposta irreversibilità dei processi di rimaneggiamento fibrotico del miocardio.

Anche gli studi su modelli sperimentali pongono in discussione il ruolo del GH nella promozione dei processi di fibrosi cardiaca. Infatti, se da una parte gli studi sul modello murino di acromegalia non evidenziano un significativo aumento nel contenuto miocardico di fibre collagene [92-93], dall'altra parte altri autori si sono spinti oltre suggerendo un'azione protettiva del GH nei confronti della fibrosi indotta dal TGF- β [94]. Oppure nel determinare una cicatrice di minor dimensione a seguito dell'insulto ischemico sperimentale [95].

Un secondo punto di parziale disaccordo tra gli studi anatomo-patologici e quelli clinici è rappresentato dalla stima della prevalenza dell'ipertrofia ventricolare nel paziente acromegalico. Infatti, gli studi autoptici rilevano la presenza di ipertrofia concentrica in più dei due terzi dei pazienti, la valutazione ecografica ha riconosciuto questa alterazione in circa il 50% dei soggetti analizzati.

Il marcato progresso nelle metodiche di *imaging* cardiaco, quali la risonanza magnetica cardiaca, caratterizzate da una maggiore sensibilità nel riconoscere quadri di ipertrofia ventricolare sinistra e in grado di valutare le sezioni destre del miocardio [96-99] nonché la possibilità di ottenere una valutazione qualitativa della composizione del tessuto miocardico attraverso l'ecografia in retrodiffusione (*backscatter*) [100,101] o attraverso la metodica del *delayed contrast enhancement* con la risonanza magnetica cardiaca danno al medico dei nuovi e potenti strumenti per comprendere le alterazioni morfologiche, strutturali e funzionali del miocardio del paziente acromegalico.

Scopo del presente studio è quello di utilizzare queste nuove metodiche per valutare *in vivo* con l'ecografia tradizionale e la risonanza magnetica cardiaca la prevalenza dell'ipertrofia ventricolare nei pazienti acromegalici non ancora sottoposti a terapia e di ricercare l'eventuale presenza di aree di evidente fibrosi nel contesto dello spessore delle pareti miocardiche attraverso lo studio del segnale IBS ecografico e del *delayed contrast enhancement*.

DISEGNO DELLO STUDIO E POPOLAZIONE ANALIZZATA

Lo studio era rivolto alla valutazione *in vivo* della morfologia e delle alterazioni funzionali miocardiche in pazienti acromegalici nei quali non fosse stata ancora istaurata alcuna terapia tesa alla normalizzazione dei livelli di GH ed IGF-1.

Il protocollo di studio prevedeva l'arruolamento di tutti i pazienti affetti da malattia acromegalica di nuova diagnosi giunti all'attenzione del Dipartimento di Endocrinologia dell'Università di Pisa durante l'anno solare 2006. Dopo aver posto diagnosi di acromegalia

sulla base dei rilievi clinici, laboratoristici e dopo valutazione con risonanza magnetica dell'encefalo della lesione sottostante, sono stati arruolati 14 pazienti.

Ciascun paziente è stato quindi sottoposto ad una valutazione ecografica accurata comprendente: una valutazione morfologica ecocardiografica tradizionale trans-toracica mono- e bi-dimensionale; una valutazione ecocolor-Doppler della cinetica del flusso ematico e delle variabili funzionali; un'analisi con ecocardiografia in retrodiffusione (*integrated backscatter*, IBS) volta alla valutazione qualitativa della composizione tissutale miocardica.

Il secondo momento del protocollo prevedeva l'esecuzione di una risonanza magnetica cardiaca senza e con mezzo di contrasto. Durante questo esame sono stati valutati parametri morfologici, funzionali ed è stata ricercata la presenza di aree di fibrosi cardiaca attraverso la metodica *delayed contrast enhancement* (DE).

Il gruppo studiato era costituito da 14 soggetti (8 donne e 6 uomini, età media 46 ± 10 anni) giunti all'attenzione del nostro Dipartimento con il sospetto clinico di malattia acromegalica e in cui i criteri clinici e laboratoristici hanno portato alla diagnosi di acromegalia [102].

La caratteristica peculiare di questi pazienti è quindi quella di essere affetti da acromegalia e di non aver ancora ricevuto, al momento dell'esecuzione dello studio, alcuna terapia chirurgica, medica o radioterapica volta alla normalizzazione dei livelli sierici di GH. Nessuna selezione dei partecipanti è stata effettuata.

Le caratteristiche dei soggetti inseriti nello studio sono riportate nella tabella 2.1. Tra le comorbilità riscontrate in questi pazienti sono rappresentate principalmente dall'ipertensione arteriosa, dalla riduzione della tolleranza glucidica o dal diabete mellito e dall'ipercolesterolemia.

Nello specifico, otto pazienti inseriti nel protocollo erano affetti da ipertensione arteriosa al momento dell'arruolamento. Cinque di questi erano sottoposti ad una terapia antiipertensiva (due pazienti con calcio antagonisti, uno con un beta bloccante e due con antagonisti recettoriali dell'angiotensina) mentre i restanti tre pazienti non ricevevano alcuna terapia antiipertensiva.

Alterazioni del metabolismo glucidico sono state riscontrate in 6 pazienti; 2 di questi presentavano un'alterata tolleranza glucidica mentre i restanti 4 di diabete mellito (tre di questi erano sottoposti a terapia con metformina al momento della diagnosi).

Elevati valori di colesterolo totale sierico [103] sono stati evidenziati in 3 soggetti già in trattamento, peraltro con inibitori della HMG-CoA reduttasi (statine).

In questi pazienti la diagnosi di acromegalia è stata posta in accordo alle caratteristiche cliniche e di laboratorio tra le quali l'aumento dei livelli sierici di IGF-I paragonati all'età ed al

Sesso e la mancata soppressione dei livelli sierici di GH al di sotto di 1 µg/L dopo un test di tolleranza glucidica orale (OGTT) con 75 g di glucosio.

La lesione responsabile dell'eccessiva secrezione di GH/IGF-I è stata ricercata attraverso risonanza magnetica dell'encefalo con mezzo di contrasto. In tutti i soggetti è stata riconosciuta la presenza di un adenoma ipofisario GH secernente.

La valutazione clinica e biochimica dei diversi assi ipofisari non ha evidenziato in nessun soggetto quadri patologici concomitanti.

Nessuno dei pazienti arruolati nello studio aveva un reperto anamnestico di cardiomiopatia ischemica. La presenza di fenomeni di sofferenza ischemica misconosciuta è stata esclusa attraverso l'esecuzione di un elettrocardiogramma da sforzo su cicloergometro il quale non ha evidenziato quadri patologici in nessuno tra i pazienti arruolati nello studio.

La valutazione della durata della malattia è ottenuta per via anamnestica da un medico esperto nella gestione della malattia acromegalica andando ad indagare l'epoca dei sintomi e dei segni clinici della malattia acromegalica e attraverso la valutazione fotografica delle variazioni nell'aspetto del volto ed eventualmente delle mani dei soggetti.

Tutti i pazienti arruolati nello studio hanno dato il proprio consenso scritto dopo esser stati informati in maniera accurata circa lo scopo dello studio e le metodiche utilizzate.

Il protocollo non prevedeva l'arruolamento di un gruppo di soggetti di controllo. Come valori normali dei parametri ecocardiografici e di risonanza magnetica sono stati utilizzati quelli codificati dalla letteratura specialistica. [104-106].

Tab 2.1 Dati clinici e biochimici dei soggetti arruolati nello studio

Paz N°	Sesso	Età (anni)	[GH] (µg/L)	[IGF-I] (µg/L)	Adenoma ipofisario	Diabete Mellito/IGT	Iperensione arteriosa	Ipercolest.	Durat stim. di mal. (anni)
1	F	50	3.4	1198	Macro	Si	Si	Si	10
2	F	54	2.8	508	Micro	Si	Si	Si	10
3	F	63	1.47	506	Micro	No	Si	No	2
4	F	52	6.01	673	Macro	No	Si	No	5
5	F	52	5.9	844	Micro	Si	No	No	2
6	F	26	25.7	866	Macro	Si	No	No	6
7	F	43	2.02	495	Micro	No	No	No	2
8	F	55	3	755	Micro	No	Si	No	20
9	M	51	1.5	511	Macro	No	No	No	10
10	M	29	2.1	535	Macro	No	No	Si	4
11	M	41	9.9	886	Macro	No	No	No	2
12	M	39	11	863	Macro	Si	Si	No	8
13	M	51	30	782	Macro	Si	Si	No	10
14	M	42	15	1074	Micro	No	Si	Si	8

L'ipertensione arteriosa è stata qui considerata come un valore di PA ≥ 140/90 mmHg (oppure dalla presenza di una terapia specifica con farmaci antiipertensivi); i soggetti sono inoltre definiti diabetici secondo i criteri dell'American Diabetes Association, ipercolesterolemia quando i livelli di colesterolo totale erano ≥ a 200 mg/dL in accordo con (NCEPATP III).

IGT = impaired glucose tolerance.

Valori normali presso il nostro laboratorio: GH 0-5 µg/L, IGF-I 182-780 µg/L, 16-24 anni; 90-492 µg/L, 25-50 anni; 71-290 µg/L > 50 anni

METODICHE UTILIZZATE NELLO STUDIO

Metodiche ecografiche

Prima della valutazione ecocardiografica ciascun soggetto è stato sottoposto a misurazione della pressione arteriosa sistolica e diastolica in posizione supina ed è stato sottoposto ad un esame ecocardiografico preliminare per valutare l'adeguatezza della finestra acustica.

Tutte le valutazioni ecocardiografiche sono state effettuate in collaborazione con l'equipe del Prof. Vitantonio Di Bello del Dipartimento CardioToracico.

L'esame ecocardiografico convenzionale è stato effettuato per via trans toracica ed è stato refertato successivamente da un ecografista esperto non direttamente coinvolto nello studio.

La massa ventricolare sinistra (LVM) è stata valutata utilizzando la convenzione del cubo di Penn mentre l'indice di massa ventricolare sinistra (LVMi), è stato calcolato dividendo la LVM per l'area di superficie corporea.

La frazione di eiezione del ventricolo sinistro è stata calcolata in maniera automatica dal software dell'ecografo a partire dal valore del volume telediastolico e tele sistolico valutati in modalità monodimensionale utilizzando l'equazione di regressione di Teicholtz. Come da convenzione lo spessore della posteriore del ventricolo sinistro (LVPW) e lo spessore del setto interventricolare (IVS) sono stati misurati durante la diastole.

La capacità di riempimento diastolica è stata valutata all'ecocardiografia Doppler attraverso la determinazione del rapporto E/A, ovvero il rapporto tra la velocità del flusso ematico ventricolare durante la fase iniziale (early) del riempimento ventricolare e la velocità del flusso durante la fase tardiva del riempimento o fase atriale (definito patologico quando ≥ 1 nel paziente con età inferiore a 50 anni e ≥ 0.5 nei pazienti ultracinquantenni) ed attraverso la determinazione del tempo di rilasciamento isometrico (IVRT) considerato patologico se < 92 ms sotto i 30 anni di età, < 100 ms tra i trenta ed i 50 anni e < 105 negli ultracinquantenni.

L'ipertrofia ventricolare sinistra è stata definita ecograficamente sulla base del LVMi come da convenzione (ipertrofia ventricolare sinistra se. LVMi ≥ 125 g/m² nel sesso maschile e ≥ 110 g/m² nel sesso femminile).

La valutazione backscatter si basa sulla valutazione della riflettività delle diverse strutture cardiache paragonate a quella ottenuta a livello del pericardio [100,101].

Per una migliore standardizzazione e riproducibilità durante tutto lo studio sono stati mantenuti costanti tutti i *settings* della macchina così come i filtri, le zone focali, la compressione ed il post-processing. Il valore di IBS telediastolico campionato a livello della parete posteriore del ventricolo sinistro è stato quindi indicizzato a quello pericardico (IBSpwi). La riflettività dell'interfaccia pericardica è, infatti, considerata, nell'ambito della valutazione statica, pari al 100% della riflettività IBS delle strutture cardiache. Scopo

dell'indicizzazione è quello di garantire una riproducibilità e la comparabilità dei valori ottenuti all'interno del gruppo evitando così le differenze determinate dalla presenza di artefatti dovuti alla presenza di fenomeni di attenuazione. Valori normali del parametro IBSpwi sono considerati quelli $\leq 45\%$.

Risonanza Magnetica Cardiaca (CMR)

La valutazione della morfologia cardiaca e dell'eventuale presenza aree di fibrosi nello spessore del miocardio è stata effettuata in collaborazione con il gruppo del dottor M. Lombardi presso il Laboratorio di Risonanza Magnetica dell'Istituto di Fisiologia Clinica presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Pisa.

L'indagine è stata effettuata utilizzando uno scanner in risonanza magnetica da 1.5 T (CV/I.GE, Milwaukee Wisconsin, USA) utilizzando una bobina *phased-array* a 8 canali dedicata alla valutazione miocardica. Le immagini sono state acquisite sfruttando il *gating* ecocardiografico per guidare l'acquisizione delle immagini.

L'approccio utilizzato è stato quello cine-RM acquisendo, durante una pausa respiratoria della durata di 8 secondi (*breath hold technique*), delle sequenze *steady-state free precession* (SSFP). Questo protocollo rappresenta uno dei più innovativi ed utilizzati nell'ambito della risonanza magnetica cardiaca in quanto le sequenze SSFP hanno la caratteristica di mantenere l'equilibrio (*steady state*) tra la magnetizzazione longitudinale e trasversale mentre il campo magnetico viene esposto a un treno di impulsi di radiofrequenza; questo fa sì che il segnale che ne deriva risulta essere strettamente dipendente dalle proprietà intrinseche del tessuto (rapporto T2/T1).

La valutazione dei parametri funzionali bi ventricolari è stata quindi effettuata utilizzando sezioni ortogonali all'asse maggiore del ventricolo sinistro (asse corto) acquisendo *slice* sequenziali dello spessore di 8 mm a partire dall'anello atrioventricolare fino a giungere all'apice cardiaco (specifiche tecniche: gap 0, TE/TR 1.6/3.2 msec, *flip angle* 60°, *field of view* 38 cm, matrice 324x256).

Il ciclo cardiaco è stato ricostruito in 30 fasi permettendo una risoluzione spaziale di 33 msec. Lo spessore delle pareti del ventricolo sinistro è stato valutato in fase tele-diastolica.

Tutte le determinazioni morfo-funzionali sono state effettuate off-line. Nello specifico sono stati ottenuti i valori nel singolo paziente dei volumi tele diastolico e tele sistolico, la frazione di eiezione e la massa miocardica (volume miocardico moltiplicato per il peso specifico del muscolo miocardico 1.05 g/ml) [105].

I valori normali alla CMR utilizzati nel nostro studio sono i seguenti: LVMi uomo 46-84 g/m², donna 53-112 g/m²; LVEF 54-77%; volume telediastolico (EDV) uomo 53-112

ml/m², donna 56-99 ml/m²; indice di massa ventricolare destra RVMi uomo 20-47 g/m², donna 18-38 g/m² [106].

Le immagini *delayed contrast enhanced* (DE) [107] per la quantificazione e l'identificazione della fibrosi miocardica sono state acquisite utilizzando delle sequenze *inversion recovery segmented gradient-echo* nella stessa proiezione utilizzata per la cine-RM dopo 10-20 minuti dalla somministrazione di gadolinio (Gadobutrolo 0,2 mmol/kg).

Nelle proiezioni ad asse corto l'acquisizione delle immagini è stata iniziata subito al di sotto del tratto di efflusso aortico e è terminata subito prima dell'apice cardiaco. Il tempo di inversione (T1), ovvero il tempo espresso in millisecondi compreso tra l'applicazione del preimpulso a 180° e l'acquisizione del segnale al centro del K spazio [105], utilizzato nel protocollo è compreso tra 210 msec e 300 msec. Questi valori sono quelli ottimali per le sequenze DE dal momento che sono quelli in corrispondenza dei quali il tessuto miocardico presenta una magnetizzazione pari a zero (assenza o scarsa intensità del segnale), il sangue delle camere cardiaco appare tenuamente iperintenso e l'area fibrotica, a causa del ritardato wash-out del mezzo di contrasto, raggiunge un'intensità di segnale maggiore di circa 400 volte rispetto al tessuto miocardico vitale.

La presenza di *delayed enhancement* è stata valutata con due modalità. La prima valutazione è qualitativa è stata effettuata da due osservatori indipendenti esperti nell'analisi di immagini di risonanza magnetica cardiaca i quali, posti di fronte alle immagini off-line dell'esame, dovevano esprimere indipendentemente il proprio parere sulla presenza o assenza di enhancement. Il DE è stato considerato positivo quando l'iperintensità di segnale è stata riconosciuta da entrambi gli operatori.

Inoltre, allo scopo di rivelare anche le aree non visibili di *enhancement* compatibili con un quadro di fibrosi cardiaca, è stata effettuata anche una valutazione quantitativa semiautomatica indipendente dall'operatore dell'intensità del segnale di ogni singolo voxel. Questa è stata effettuata attraverso l'utilizzo di un apposito software ideato con lo scopo di analizzare il rapporto tra contrasto e rumore nel singolo voxel, (contrasto tra tessuto iperintenso e miocardio normale diviso per il valore medio di rumore del tessuto miocardico).

I valori superiori rispetto ai valori del background miocardico circostante più 15 deviazioni standard sono stati considerati positivi per fibrosi e definiti *hyperenhancement*. Inoltre valori di intensità paria al valore del background miocardico + un numero di DS compreso tra 5 e 15 è stato considerato come borderline e definito nello studio come *mild-enhancement*. [105].

E' stato quindi effettuato un conteggio del numero di voxel con *hyperenhancement* e con *mild-enhancement* valutandolo in percentuale rispetto al totale e rispetto alla massa ventricolare.

Nello studio sono considerati come reperti normali l'assenza completa di aree fibrotiche nel contesto delle pareti ventricolari (*hyper-enhancement* 0%) e un valore di *mild-enhancement* inferiore al 5%.

Analisi statistica

Le variabili continue sono espresse come media \pm una deviazione standard. Il coefficiente di correlazione interclasse (r_i) è stato calcolato secondo il metodo di Bland e Altman.

La correlazione tra i valori ottenuti dalla risonanza magnetica cardiaca, dall'ecocardiografia bidimensionale, dai dosaggi ormonali e dalla durata stimata della malattia sono stati valutati utilizzando la correlazione di Pearson. Le differenze tra le variabili qualitative sono state valutate attraverso il test del χ^2 mentre la valutazione delle differenze tra le variabili quantitative sono state valutate attraverso il test di Mann-Whitney. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato come cut-off per indicare la significatività statistica.

RISULTATI

Nella tabella 2.2 vengono riportati i dati clinici e biochimici medi osservati nella popolazione acromegalica studiata.

Come descritto in precedenza otto pazienti presentavano ipertensione arteriosa, quattro diabete e due alterata tolleranza glucidica; tre pazienti presentavano ipercolesterolemia.

Le concentrazioni sieriche medie di GH e IGF-I del gruppo dei soggetti in esame erano rispettivamente $6.4 \pm 9.9 \mu\text{g/L}$ e $724.8 \pm 212 \mu\text{g/L}$.

Tabella 2.2 Dati clinici e biochimici medi del gruppo in studio

Parametro	Media \pm DS
Body Mass Index (kg/m ²)	29 \pm 4.1
IGF-I	724.8 \pm 212.0
GH	6.4 \pm 9.9
Frequenza cardiaca (bpm)	76.4 \pm 17.0
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	131.9 \pm 11.8
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	80.7 \pm 11.1
[glucosio] sierico (mg/dl)	101 \pm 21.2
[insulina] sierico (mU/l)	16.6 \pm 16.3
[colesterolo] sierico (mg/dl)	193.6 \pm 33.2
[trigliceridi] sierico (mg/dl)	184.1 \pm 155.5

I dati sono espressi come media \pm SD. I valori normali per il nostro laboratorio sono: GH 0–5 $\mu\text{g/L}$; IGF-1 182–780 $\mu\text{g/L}$, (16–24 anni); 90–492 $\mu\text{g/L}$, (25–50 anni); 71–290 $\mu\text{g/L}$, (> 50 anni); i limiti superiori della glicemia, delle insulinemia, del colesterolo totale e dei trigliceridi sono stati definiti in accordo con quanto indicato dalle linee guida del *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*

Ecocardiografia 2D ecocolorDoppler e IBS

I valori medi dei parametri ecografici valutati nello studio sono riportati in sintesi nella tabella 2.3.

Il valore medio della massa ventricolare sinistra calcolata utilizzando la convenzione di Penn è risultato di $209 \pm 48 \text{ g}$ indicando un generalizzato aumento delle dimensioni cardiache di questi soggetti.

Al fine di valutare se tale aumento si potesse configurare in un quadro di vera ipertrofia

Tabella 2.3 Parametri medi dei pazienti in studio ottenuti dall'ecocardiografia color Doppler

Parametro	Media \pm DS	Range
LVM (g)	209 \pm 48	141.4 - 288.0
LVMi (g/m ²)	110 \pm 24	79.0 - 160.0
Donne (n=8)	102.6 \pm 18.4	79 - 129
Uomini (n=6)	121.5 \pm 28.1	93 - 160
Ipertrofia del ventricolo sinistro (si/No)		5/9
LVPWT (mm)	8.7 \pm 1.3	7.3 - 11.0
IVST (mm)	9.4 \pm 1.0	7.9 - 11.5
LVEF (%)	72 \pm 12	57.9 - 87.7
Riduzione della funzionalità sistolica (si/no)		0/14
Rapporto E/A	0.6 \pm 0.25	0.7 \pm 1.3
IVRT (s)	85.4 \pm 19.4	65 - 114
Riduzione della funzionalità diastolica (si/no)		4/10
IBSpwi (%)	50.5 \pm 9.6	35 - 64
IBSpwi anomalo (si/no)		6/8

miocardica oppure fosse più semplicemente dovuto al generale processo di visceromegalia riscontrato nell'acromegalia è stato valutato anche l'indice di massa ventricolare sinistra (LVMi). Il valore medio di questo parametro, calcolato sulla base delle misurazioni effettuate sui pazienti arruolati nello studio, è pari $110.7 \pm 24 \text{ g/m}^2$ qualora si consideri la totalità dei soggetti mentre, suddividendo i soggetti in base al sesso, risulta essere di $102,6 \pm 18.4 \text{ g/m}^2$ nei soggetti di sesso femminile e di $121,5 \pm 28.1 \text{ g/m}^2$ in quelli di sesso maschile.

Se il valore medio della LVMi non rivela un quadro complessivo di ipertrofia ventricolare sinistra, la valutazione di questo parametro nel singolo paziente evidenzia 5 quadri ecografici classificabili come un'ipertrofia ventricolare sinistra (3 soggetti di sesso femminile e due di sesso maschile, 36% del campione; figura 2.2).

E' stato quindi valutato se vi fossero delle differenze statisticamente significative nella ripartizione dei valori di LVMi tra i pazienti con una malattia acromegalica di breve (minore di 5 anni) e quelli di lunga durata (maggiore di 5 anni). Come si può osservare nel riquadro a della figura 2.3, il valore medio dell'indice di massa ventricolare sinistra tra questi due gruppi è simile, seppure nei pazienti con malattia acromegalica di più lunga durata sia osservabile una maggior disomogeneità nella distribuzione dei valori ($113.1 \pm 30.8 \text{ g/m}^2$ vs. $106.8 \pm 11.1 \text{ g/m}^2$; $P=0,5430$, ns).

Un simile approccio è stato utilizzato per valutare se vi fosse una differenza nel valore stimato di LVMi tra il gruppo dei pazienti ipertesi e non ipertesi senza tuttavia riscontrare una differenza statisticamente significativa (valore medio del gruppo dei pazienti ipertesi $121.8 \pm 26.0 \text{ g/m}^2$, nel gruppo dei pazienti non ipertesi $95.40 \pm 11.3 \text{ g/m}^2$; $P=0.9913$, ns).

E' stato inoltre effettuata un'analisi di correlazione per valutare se vi fosse una relazione tra i valori di LVMi e la durata stimata della malattia o i livelli di IGF-1 nel singolo paziente. Come si può osservare nella figura 2.3 pannello c e d, non è stata riscontrata una correlazione

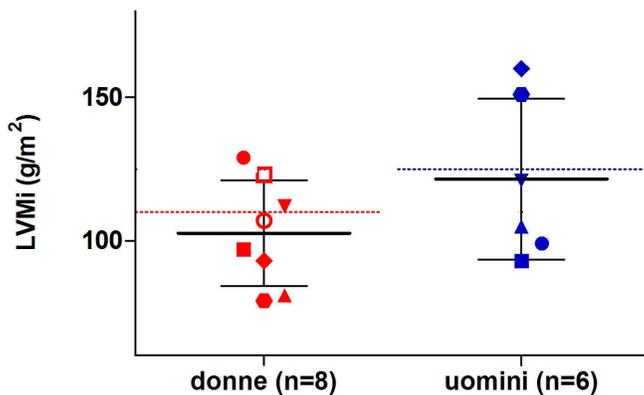


Figura 2.2 Rappresentazione grafica della distribuzione nei valori di LVMi ottenuti attraverso valutazione ecocardiografica bidimensionale. Le linee tratteggiate orizzontali rappresentano i *cut off* per porre diagnosi di ipertrofia ventricolare sinistra in base al sesso dei soggetti esaminati ($>125 \text{ g/m}^2$ nel sesso maschile e $>110 \text{ g/m}^2$ nel sesso femminile). I diversi simboli identificano i diversi pazienti esaminati (vedi tabella 2.5).

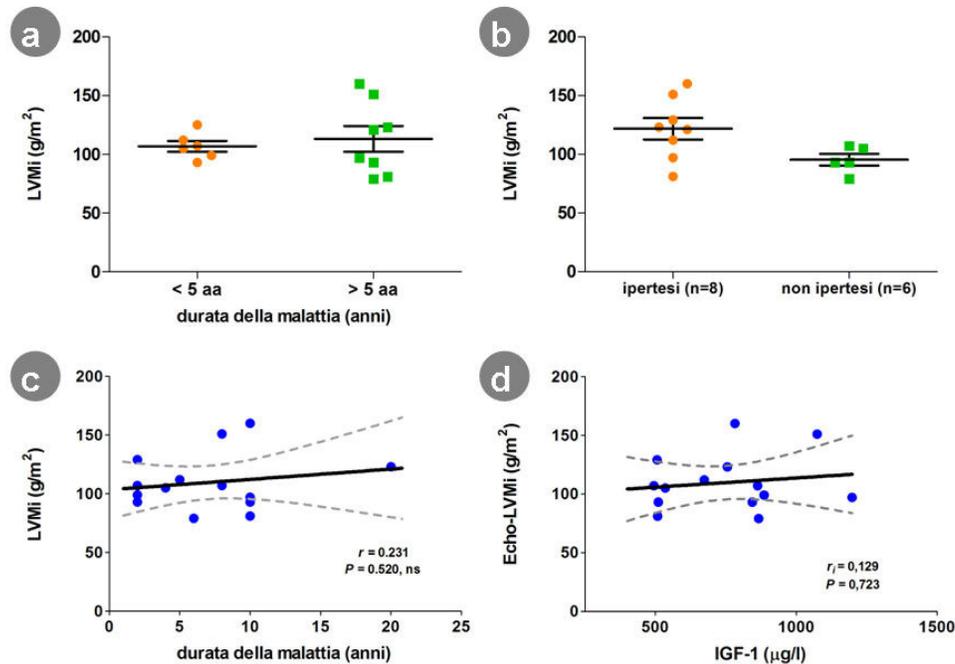


Figura 2.3 Analisi statistica del valore dell'indice di massa ventricolare sinistra (LVMI) valutato attraverso l'ecocardiografia. Nel pannello **(a)** è rappresentata la distribuzione dei valori di LVMI nei singoli soggetti in base alla durata della malattia; nel pannello **(b)** lo stesso approccio è stato utilizzato per evidenziare se vi fossero delle differenze nei valori di LVMI tra i pazienti ipertesi e non ipertesi. La valutazione della correlazione tra i valori di LVMI e la durata della malattia **(c)** e i livelli sierici di IGF-1 al momento dell'arruolamento **(d)** sono riportati negli ultimi due pannelli.

statisticamente significativa tra queste variabili e i valori del LVMI (durata della malattia: $r = 0.231$, $P = 0.520$; valori sierici di IGF-I: $r = 0.129$, $P = 0.723$).

La valutazione della funzionalità ventricolare effettuata attraverso l'esame ecocardiografico non ha permesso di riconoscere delle alterazioni significative della funzione sistolica con valori di frazione di eiezione del ventricolo sinistro (LVEF) nella norma in tutti i pazienti (valore medio del gruppo di studio $72 \pm 12\%$). Anche in questo caso non è stato possibile riconoscere una correlazione statisticamente significativa con i valori sierici di IGF-I al momento della diagnosi ($r = -0.536$, $P = 0.110$) o con la durata stimata della malattia ($r = -0.049$, $P = 0.893$).

Per quanto concerne la valutazione della capacità di riempimento diastolico, l'esame ecocardiografico ha individuato anomalie in 4 soggetti (29% dei soggetti). Più precisamente è stata riconosciuta una riduzione (rispetto ai valori considerati normali in base all'età) nel tempo di rilasciamento isometrico (IVRT) in quattro pazienti in uno dei quali è stato riscontrato anche un aumento del rapporto E/A (valore di 1.3 nel paziente numero 3).

La valutazione qualitativa ecografica della composizione attraverso analisi *integrated backscatter* della parete posteriore del ventricolo sinistro (IBSpwi) ha evidenziato un valore medio di $50.7 \pm 9.6\%$. Andando a valutare i valori nel singolo paziente il dato che emerge è che in 6 dei

pazienti arruolato l'IBSpwi è risultato al di sopra di quello considerato normale (valore medio in questi soggetti $59.5 \pm 4.6\%$, $P < 0.04$ vs. gruppo di pazienti con normalità di IBSpwi).

Risonanza Magnetica Cardiaca

I principali dati ottenuti dalla valutazione con la risonanza magnetica cardiaca dal nostro studio sono riportati nella tabella 2.4 di pagina seguente.

La valutazione morfologica anche in questo caso è stata incentrata sulla determinazione della massa ventricolare sinistra (LVM) e della sua forma indicizzata (LVMi) i cui valori medi sono risultati rispettivamente di 151 ± 17 g e 77.6 ± 9.5 g/m². Suddividendo i soggetti in base al sesso i valori medi del LVMi sono risultati 76.1 ± 6.7 g/m² nel sesso femminile e 79.7 ± 12.8 g/m² in quello maschile.

Come si può osservare dalla figura 2.4, la risonanza magnetica cardiaca ha mostrato una maggior sensibilità nel riconoscimento dell'ipertrofia ventricolare sinistra rispetto a quanto osservato con l'esame ecocardiografico. Nello specifico la CMR ha evidenziato alterazioni del LVMi tali da configurare un quadro di ipertrofia ventricolare sinistra in 10 dei 14 pazienti studiati (8 donne e 2 uomini, 72% del campione).

Come per il dato ecocardiografico è stato valutato se vi fossero delle differenze nei valori di LVMi in base alla durata stimata della malattia acromegalica o in base alla presenza o assenza della patologia ipertensiva (figura 2.5 pannelli a e b). Anche in questo caso non sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative (LVMi medio: pazienti con durata di malattia ≤ 5 anni $75,8 \pm 4,8$ g/m² e $79,0 \pm 12,1$ g/m² nei pazienti con malattia da più di 5 anni, $P = 0,886$; soggetti ipertesi $79,5 \pm 11,1$ g/m², soggetti normotesi $75,1 \pm 7,0$ g/m², $P = 0,271$).

L'analisi della correlazione tra il valore di LVMi del singolo paziente e la durata stimata

Fig 2.4 Rappresentazione grafica della distribuzione nei valori di LVMi ottenuti attraverso risonanza magnetica cardiaca. Le linee tratteggiate orizzontali rappresentano i *cut off* per porre diagnosi di ipertrofia ventricolare sinistra in base al sesso dei soggetti esaminati (> 86 g/m² nel sesso maschile e > 67 g/m² nel sesso femminile). I diversi simboli identificano i diversi pazienti esaminati (vedi tabella 2.5).

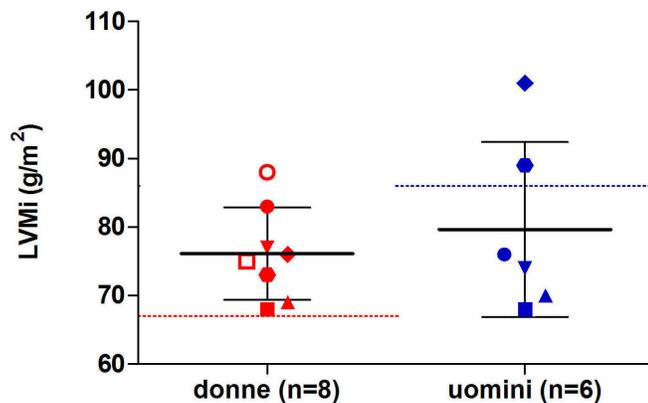


Tabella 2.4 Parametri medi ottenuti dalla Risonanza Magnetica Cardiaca

Parametro	Media DS	range
LVMi (g/m ²)	77±9	68 – 101
Donne studiate (n=6)	74±5.5	68 – 83
Uomini studiati (n=8)	80±11	68 – 101
Ipertrofia ventricolo sinistro (Si/No)		10/4
LVEDV (ml/m ²)	82 ± 12	64 – 103
LVESV (ml/m ²)	27.0 ± 10.5	12 – 48
LV stroke volume index (ml/m ²)	55 ± 12	37 – 82
LVEF (%)	67 ± 11	53 – 84
Deterioramento della funzionalità sistolica (si/no)		0/14
LV delayed hyperenhancement (%)		0
LV delayed hyperenhancement (si/no)		0/14
LV delayed mild enhancement (%)	1.96 ± 3.1	0 – 13
LV delayed mild enhancement (si/no)		1/13
RVMi (g/m ²)	21 ± 4	14 ± 27
RV hypertrophy (si/no)		0/14

L'ipertrofia del ventricolo sinistro viene definita negli studi con CMR quando l'indice di massa ventricolare sinistra risulta essere > 86 g/m² nel maschio e > 67 g/m² nella donna; il deterioramento della funzionalità sistolica viene definito qualora la frazione di eiezione del ventricolo sinistro (LVEF) risulti > 54%; L'ipertrofia del ventricolo destro è definita come un RVMi > 47 g/m² nel sesso maschile e > 38 g/m² nel sesso femminile. La fibrosi miocardica viene definita come la presenza di delayed contrastographic hyperenhancement

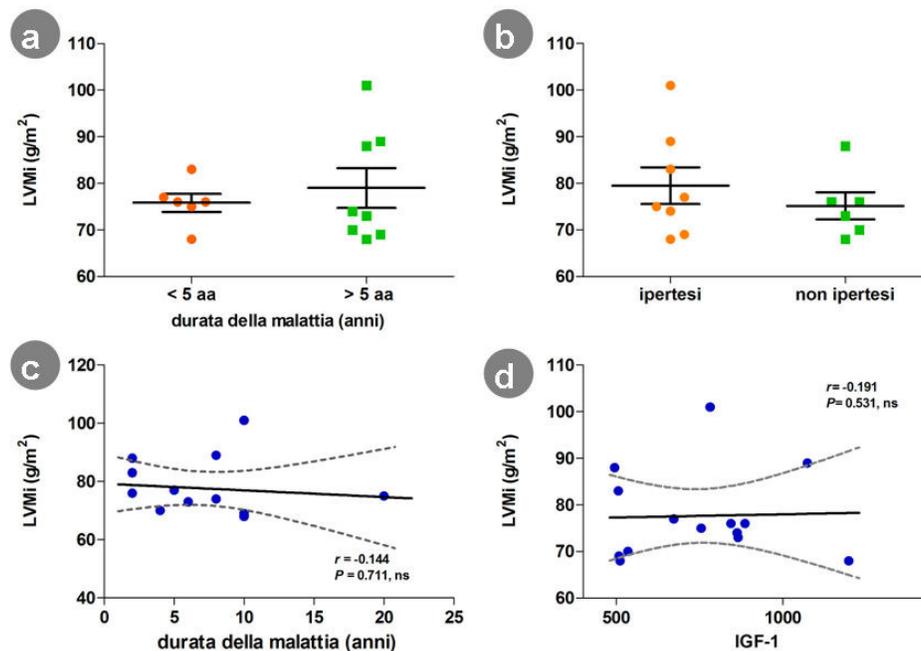


Figura 2.5 Analisi statistica del valore dell'indice di massa ventricolare sinistra (LVMi) valutato attraverso la CMR. Nel pannello (a) è rappresentata la distribuzione dei valori di LVMi nei singoli soggetti in base alla durata della malattia; nel pannello (b) lo stesso approccio è stato utilizzato per evidenziare se vi fossero delle differenze nei valori di LVMi tra i pazienti ipertesi e non ipertesi. La valutazione della correlazione tra i valori di LVMi e la durata della malattia (c) e i livelli sierici di IGF-1 al momento dell'arruolamento (d) sono riportati negli ultimi due pannelli.

della malattia ($r = -0.144$, $P = 0.711$) o tra i valori di LVMi e quelli di IGF-1 ($r = -0.191$, $P = 0.531$) non ha evidenziato delle differenze statisticamente significative (figura 2.5 pannelli c ed d).

La risonanza magnetica cardiaca permette inoltre di valutare l'indice di massa ventricolare destra (RVMi). Tuttavia ed inaspettatamente sulla scorta dei dati in letteratura, i dati ottenuti nel nostro studio non hanno evidenziato in nessun paziente un quadro di ipertrofia ventricolare destra. (valore medio del RVMi nella popolazione acromegalica: $21 \pm 4 \text{ g/m}^2$ (range 14-27 g/m^2)).

La valutazione dello spessore del setto interventricolare (IVRT) nei soggetti arruolati nello studio non ha rilevato delle differenze significative tra il gruppo dei pazienti ipertesi e quello dei normotesi (rispettivamente $11.0 \pm 2.3 \text{ mm}$ e $10.1 \pm 2.7 \text{ mm}$, $P=0.563$).

Non è stata riconosciuta una correlazione statisticamente significativa tra quest'ultimo parametro CMR ed i livelli di IGF-I ($r=0.170$, $P=0.579$) o la durata di malattia ($r=0.483$, $P=0.094$).

La valutazione della funzione sistolica non ha evidenziato alterazioni significative. Tutti i pazienti presentano un normale valore di frazione di eiezione sinistra (valore medio $67 \pm 11\%$, range 53-84%) che non risulta esser correlato ai livelli sierici di IGF-I ($r = 0.263$, $P = 0.386$) o alla durata stimata di malattia ($r = -0.098$, $P = 0.751$). La gittata cardiaca sinistra è risultato normale in tutti i pazienti analizzati.

Come descritto nel paragrafo relativo al protocollo di studio, il secondo momento dello

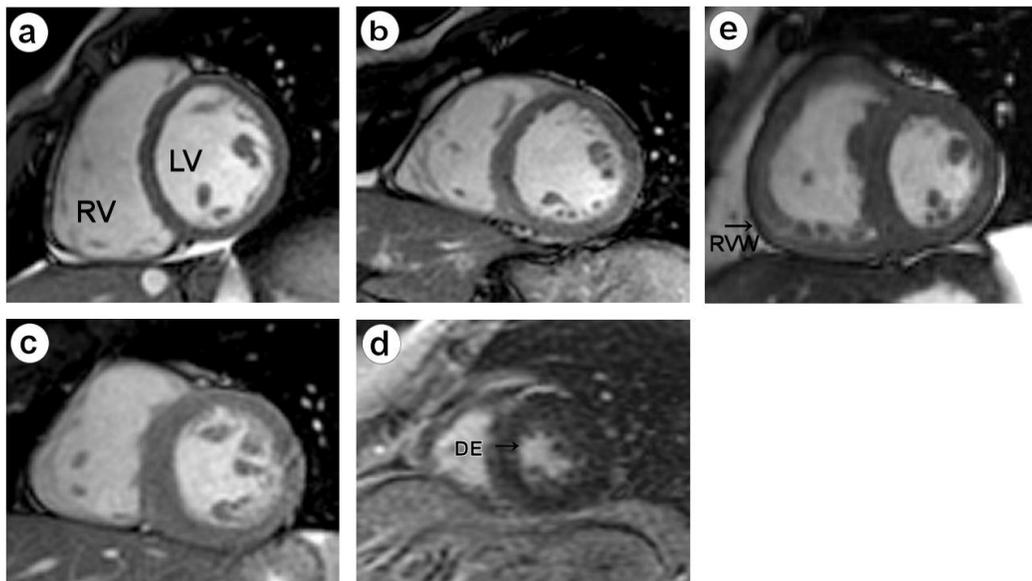


Fig 2.6 Risonanza Magnetica cardiaca di: (a) un soggetto normale; (b) paziente acromegalico con una ipertrofia ventricolare moderata; (c) paziente acromegalico con ipertrofia ventricolare sinistra marcata; (d) paziente acromegalico e *retarded contrastographic mild enhancement* (freccia); (e) paziente con ipertensione polmonare e ipertrofia ventricolare destra. Tutte le immagini raffigurano un asse cardiaco corto, le immagini a,b,c sono state ottenute in fase tele diastolica, l'immagine d è stata ottenuta in fase telesistolica

studio con risonanza magnetica prevedeva la somministrazione di mezzo di contrasto per valutare la viabilità miocardica e ricercare la presenza di aree di evidente fibrosi nello spessore delle pareti ventricolari.

Il dato più significativo che emerge dal gruppo in studio è che nessun paziente presenta il fenomeno del *delayed contrast enhancement* dopo la somministrazione di gadolinio suggerendo l'assenza di aree di evidente fibrosi nel miocardio dei soggetti studiati (figura 2.6)

Va sottolineato tuttavia che la valutazione quantitativa semiautomatica *dell'enhancement* cardiaco ha rilevato la presenza di *mild enhancement* in uno dei soggetti valutati.

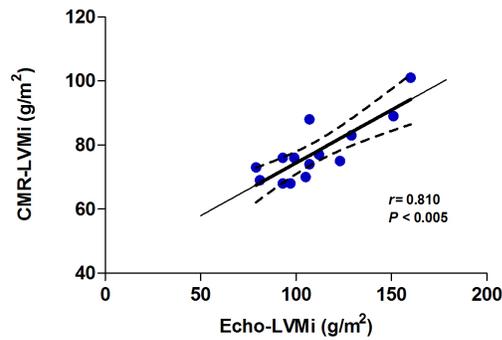


Figura 2.7 analisi di correlazione tra i valori di LVMi ottenuti dall'esame ecocardiografico (Echo) e quelli ottenuti durante la CMR.

Relazione tra il dato ecocardiografico ed la risonanza magnetica cardiaca

Come si può osservare nella tabella 2.5 e nella figura 2.7, l'indice di massa ventricolare sinistro calcolato attraverso la risonanza magnetica cardiaca è statisticamente correlato con quello calcolato attraverso l'ecografia convenzionale bidimensionale ($r = 0.810$, $P < 0.005$). Tuttavia la risonanza magnetica è in grado di riconoscere un quadro di ipertrofia in un numero maggiore di soggetti (10 vs. 5).

Tra i pazienti in cui sono state riscontrate delle anomalie alla valutazione IBS (n=6) in cinque casi l'ecografia era risultata normale mentre la CMR ha riscontrato un quadro di ipertrofia

Tabella 2.5 Confronto tra le misurazioni individuali del LVMi ottenute con l'ecocardiografia (Eco-2D) o con la risonanza magnetica cardiaca (CMR) and 2D echocardiography (2D-echo.)

Paz. N°	LVMi		Ipertrofia ventr Sin.		Simbolo
	Eco-2D	CMR	Eco-2D	CMR	
1	97	68	No	Si	■
2	81	69	No	Si	▲
3	129	83	Si	Si	●
4	112	77	si	si	▼
5	93	76	No	si	◆
6	79	73	No	Si	●
7	107	88	No	Si	□
8	123	75	Si	Si	○
9	93	68	No	No	■
10	105	70	No	No	▲
11	99	76	No	No	●
12	121	74	No	No	▼
13	160	101	Si	Si	◆
14	151	89	Si	Si	●

ventricolare sinistra nella metà dei casi.

Per quanto riguarda la correlazione tra ipertrofia ventricolare sinistra e alterazione del riempimento diastolico valutato all'esame Doppler, nel nostro gruppo di pazienti in 3 casi su quattro la CMR aveva riconosciuto anche un quadro di ipertrofia ventricolare sinistra mentre l'esame ecocardiografico tradizionale non ha individuato in nessun paziente un quadro di ipertrofia ventricolare sinistra. Inoltre se si valuta anche la correlazione con il dato IBS va detto che questa metodica ha individuato un quadro di anomalia in 2 dei 4 soggetti con *impairment* diastolico.

Capitolo terzo

Apoptosi nel cuore acromegalico: studi *in vitro* e sul topo bGH-MT.

PREMESSA CONCETTUALE E FINALITÀ DELLO STUDIO

Nel primo capitolo di questo lavoro di tesi sono state presentate le peculiari alterazioni cardiache che si accompagnano all'eccesso di GH e IGF-I caratteristico della malattia acromegalica.

Sebbene il quadro clinico morfo-funzionale di questa condizione sia stato studiato in maniera estesa, ciò non può esser certamente detto per quanto riguarda i meccanismi causali che ne sono alla base.

Infatti, sebbene sia stata dimostrata l'azione ipertrofizzante dell'asse GH/IGF-I questa non sembra giustificare *di per sé* l'evoluzione progressiva delle iniziali alterazioni diastoliche verso l'insufficienza miocardica che si osserva in alcuni pazienti acromegalici.

Studi autoptici hanno suggerito un ruolo dei processi di fibrosi interstiziale e di necrosi cardiomiocitaria [37-40]. Tuttavia queste lesioni ultrastrutturali difficilmente possono rappresentare la causa prima del quadro funzionale della cardiomiopatia acromegalica soprattutto in virtù della loro limitata estensione.

Una delle teorie che ha suscitato maggior clamore è quella che vede nei processi di morte cellulare programmata il *primum movens* della lenta progressione verso l'insufficienza cardiaca del paziente acromegalico. Secondo Causata da una progressiva perdita della capacità del muscolo cardiaco di generare lavoro a causa della perdita strutturale.

Quest'ipotesi, trae origine da uno studio di Frustaci *et al.*[41] che ha valutato il tasso di apoptosi su prelievi endobiopici ottenuti da pazienti acromegalici con insufficienza cardiaca (classe NYHA II-IV). Questi autori hanno difatti osservato un tasso di apoptosi estremamente elevato sia per quanto riguarda la componente cardiomiocitaria (495 volte quello dei soggetti di controllo) che per quella non cardiomiocitaria (305 volte il normale).

Tuttavia questa ipotesi non sembra trovare al momento ulteriori conferme dagli studi sperimentali i quali, al contrario, suggeriscono che sia il GH che l'IGF-I possano esercitare un'azione antiapoptotica.

Tale effetto è stato dimostrato sia sul tessuto intestinale prelevato dal paziente acromegalico [108] sia su colture cellulari cardiomiocitarie [109] che non cardiomiocitarie [110-114].

Inoltre l'ipotesi di un'azione proapoptotica del GH non sembra confermata anche da altri studi che dimostrano che questa molecola sia in grado di esercitare un'azione protettiva nei confronti del danno ischemico sia a livello cerebrale [115,116] che a livello miocardico [117].

Infine, va ricordato come il ruolo dei processi apoptotici durante l'insufficienza cardiaca sia ancora dibattuto, in quanto sebbene questi fenomeni siano stati osservati, solitamente a bassi livelli, nel tessuto miocardico di vari modelli sperimentali di scompenso [118] non è ancora chiaro se questi siano coinvolti nella genesi del danno o rappresentino un semplice epifenomeno [119, 120].

Tutti questi elementi pongono quindi in dubbio il reale ruolo del GH nella promozione o nella difesa dai processi di morte cellulare apoptotica.

La finalità di questo studio è quindi quella valutare quale sia l'effetto di livelli sovra fisiologici di GH sulla modulazione dell'apoptosi cardiomiocitaria e sulle vie di trasduzione del segnale attivate da questa molecola.

Per far ciò abbiamo utilizzato un classico modello murino di acromegalia ovvero il topo ipersecernente il gene bovino del GH (topo bGH-MT).

Questo modello è, infatti, particolarmente adatto allo studio della cardiomiopatia acromegalica in quanto, a causa degli elevati livelli di GH bovino, questi topi manifestano un'ipertrofia cardiaca concentrica e evidenziano delle alterazioni funzionali che evolvono in maniera simile a quanto osservato nel paziente acromegalico [121,122] giungendo, nelle fasi finali della vita dell'animale a quadri di insufficienza cardiaca conclamata.

DISEGNO DELLO STUDIO

La finalità del nostro studio è valutare sul modello murino bGH-MT il ruolo di livelli sovra fisiologici di GH nella modulazione dei processi di morte cellulare programmata a livello cardiomiocitario.

A tal fine il protocollo sperimentale prevede quattro fasi:

1. valutazione preliminare *in vitro* della capacità del GH nel ridurre il tasso di apoptosi su colture H9c2 di cardiomioblasti (frammentazione del DNA e TUNEL) e riconoscimento del ruolo delle vie di p38MAPK, p44/42MAPK e PI3K nella trasduzione del segnale mediato dal GH attraverso la preincubazione con inibitori specifici delle tre vie (p38MAPK: SB202190; p44/42MAPK: PD 098059; PI3-K: Ly294002).
2. studio del tasso di apoptosi su sezioni istologiche di tessuto miocardico murino (TUNEL e Annessina V) in topi giovani (3 mesi) o anziani (9 mesi). Questa è stata valutata su tre gruppi di topi: (i) topi *wild Type* (Wt); (ii) topi bGH-MT (Acro); (iii) topi bGH-MT sottoposti a antagonista recettoriale del GH (AcroPeg.)
3. Analisi *Western Blot* dell'espressione proteica delle principali molecole coinvolte nella cascata apoptotica intrinseca (citocromo-C, Apaf-1, Caspasi 9, Caspasi 3, Bax, Bad,

Bcl-2 e Bcl-XL) e delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale attraverso la via di p38MAPK (p38), p44/42MAPK (ERK1/2, MEK1/2, p90RSK) e di PI3-K (p110 α , p110 γ , Akt).

4. Valutazione dell'efficacia dell'ormone della crescita nel ridurre i fenomeni apoptotici cardiomiocitari mediati dall'adriamicina. Questa è stata effettuata confrontando attraverso saggio TUNEL e Annessina V, le differenze nel tasso di apoptosi cardiomiocitaria nel topo wild type e bGH-MT esposti a dosi crescenti di adriamicina.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Gli esperimenti *in vitro* sono stati effettuati su una linea cellulare di cardiomioblasti di ratto, nota come cellule H9c2, fornita dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" di Brescia. Queste cellule sono state poste in coltura in una soluzione composta da un terreno di coltura standardizzato, il DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), con aggiunta di siero bovino fetale al 20%, di 2mM di glutammina e di un pool di antibiotici (penicillina e streptomina). Le piastre Petri sono state quindi poste in coltura in incubatore a CO₂ al fine di mantenere costanti temperatura (37° C), umidità e concentrazione di CO₂ (5%).

Per valutare gli effetti della somministrazione del GH e degli inibitori delle vie di trasduzione del segnale sul tasso di apoptosi, le colture cellulari sono state poste in coltura in assenza o in presenza di 5 nM di GH per un periodo di 30 minuti. La dose del GH e la durata dell'esposizione è stata scelta sulla base di precedenti valutazioni [122]. Inoltre la specificità delle azioni del GH è stata confermata attraverso l'esposizione di queste colture ad un antagonista recettoriale del GH, il pegvisomant.

Quindi, per valutare il ruolo nella modulazione dei fenomeni di morte cellulare programmata dell'attivazione delle tre vie di trasduzione del segnale valutate nel nostro protocollo, alcune colture cellulari sono state pretrattate con degli specifici inibitori prima dell'esposizione al GH.

Inibitori delle vie di trasduzione del segnale

Allo scopo di valutare le vie di trasduzione attraverso cui il GH esercita l'azione antiapoptotica, le colture di cellule H9c2 esposte a 5 nM di GH sono state quindi esposte a degli inibitori selettivi di tre vie di trasduzione del segnale note esser implicate nei processi di apoptosi e di proliferazione cellulare:

- (i) la via di p44/42MAPK (ERK1/2),
- (ii) la via della p38 MAPK e
- (iii) quella di PI3- K.

Nello specifico il protocollo prevedeva l'incubazione per 15 minuti delle cellule H9c2 con un inibitore della p44/42 MAPK (PD 098059, PD) [124,125], con un inibitore della p38 MAPK (SB202190, SB 5 μ M) [126] o con un inibitore della via di PI3-K (Ly294002, Ly 40 μ M) [127].

La dose e la cinetica ottimale della somministrazione di queste molecole è stata scelta sulla base della letteratura specialistica [128,129] ed è stata confermata da esperimenti preliminari finalizzati alla determinazione della concentrazione massima di queste molecole tale da non inficiare la vitalità cellulare. E' stato quindi valutato il tasso di

apoptosi su queste colture paragonandolo a quello osservato nelle colture esposte unicamente al GH o al GH più antagonista recettoriale del GH.

Determinazione del tasso di apoptosi sulle colture cellulari

La valutazione dei fenomeni di apoptosi nelle colture di cardiomioblasti è stata effettuata quantificando la frammentazione del DNA nucleosomiale ed utilizzando la metodica TUNEL.

Allo scopo di quantificare la frammentazione del DNA è stata utilizzata una metodica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) a sandwich (Cell Death Detection ELISA plus kit; Boehringer Mannheim)[130]. Questa metodica si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali murini diretti contro il DNA e gli istoni e vede in suo razionale nel fatto che durante il processo apoptotico la frammentazione del DNA avviene ad opera di un'endonucleasi endogena Ca²⁺ e Mg²⁺ dipendente la quale taglia il doppio filamento di DNA a livello delle regioni di collegamento internucleosomiali che sono più facilmente accessibili dal momento che il DNA dei nucleosomi è fortemente complessato con il core istonico ed è quindi protetto dal taglio delle endonucleasi. Quindi si creano degli oligo e mono nucleosomi che si localizzano nel citoplasma e che possono essere riconosciuti dalle immunoglobuline anti istone e anti DNA.

Nello specifico il nostro protocollo prevedeva la raccolta per centrifugazione delle cellule H9c2 e la loro incubazione per 30 minuti in un'apposita soluzione lisante.

Il DNA citoplasmatico recuperato per centrifugazione è stato quindi posto in appositi pozzetti ricoperti da streptavidina. Sono stati quindi aggiunti gli anticorpi anti istone

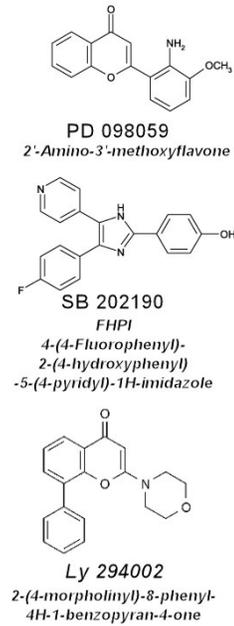


Figura 3.1 Inibitori della via di trasduzione del segnale utilizzati nello studio. PD: p44/42; SB: p38; Ly: PI3-K

biotinilati aventi azione di anticorpo catturante e gli anticorpi rivelatori anti-DNA coniugati con perossidasi.

Posti in incubazione nel pozzetto i due anticorpi si legano agli oligo e mono-nucleosomi e l'immunocomplesso che si crea si lega alla parete del pozzetto attraverso il legame tra la streptavidina e la biotina dell'Ig anti istoni.

Dopo opportuni lavaggi è stato quindi aggiunto ABTS (2,2'-azino-di[3-thylbenzthiazolin-sulfonato]) che reagendo con la perossidasi permette di quantificare i nucleosomi citoplasmatici. L'aumento relativo dei nucleosomi all'interno del citoplasma è stato espresso come *enrichment factor* ed è stato calcolato come il rapporto dell'assorbimento osservato dai lisati delle colture trattate con il GH e gli inibitori della trasduzione del segnale e quello osservato sulle colture non esposte agli agenti farmacologici.

La seconda metodica utilizzata, TUNEL *Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* è una metodica standard per il riconoscimento della frammentazione del DNA che segue all'attivazione della cascata apoptotica. In sintesi questo saggio si basa sul riconoscimento di *nicks* nei frammenti di DNA [130]. Questi possono essere, infatti, riconosciuti dall'enzima deossinucleotidil trasferasi terminale il quale catalizza l'aggiunta di molecole di dUTPs. Queste possono essere marcate secondariamente ad esempio con un fluorocromo.

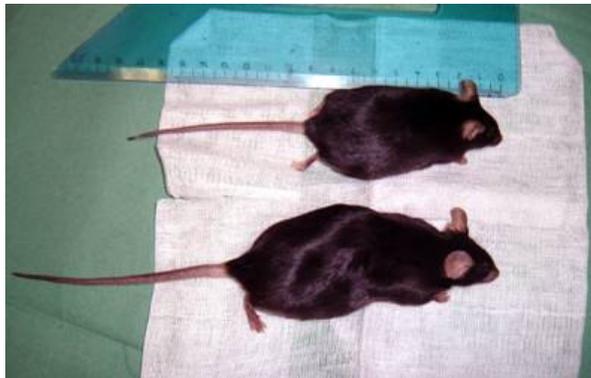
Nel nostro studio è stato utilizzato un kit commerciale (Roche Germany) seguendo il protocollo proposto dalla casa produttrice. (descritte in seguito).

Animali

Nella parte principale dello studio le determinazioni sono state effettuate sul tessuto miocardico di topi bGH-MT (generosamente forniti dal Dr. M Bohlooly-y dell'Università di Goteborg) e su quello di topi *wild type* C57BI/6JxCBA (Harlan, Italia) utilizzati come controlli.

I topi transgenici bGH-MT (figura 3.2) rappresentano al momento il modello murino più validato di acromegalia. Questi topi, creati inizialmente dal Prof. RD Palmiter della Washington University [131,132], sono dei topi C57BI/6JxCBA modificati geneticamente per iperesprimere la sequenza codificante il gene bovino del GH (bGH) sotto il controllo del promoter della metallothioneina (MT).

Figura 3.2. Topo bGH-MT (sotto) confrontato con il corrispondente topo *wild Type* (sopra). Si osservi la significativa differenza nelle dimensioni corporee



Prima di esser inseriti nel protocollo per ciascun topo bGH-MT è stata valutata l'espressione del DNA bovino mediante analisi PCR di campioni biotici della coda utilizzando specifici *primer* localizzati all'interno del promoter della metallothioneina e del gene bGH [121].

Nello studio sono stati valutati topi dell'età di 3 e di 9 mesi come rappresentativi del topo giovane ed anziano esposto a elevati livelli di GH [122].

Lo studio è stato effettuato su tre gruppi di animali ciascuno dei quali è stato valutato all'età di 3 e di 9 mesi: 1) topi *wild type* (Wt); 2) topi acromegalici bGH-MT (Acro); 3) topi bGH-MT trattati con Pegvisomant (AcroPeg).

Per ciascun gruppo e per le due età in studio sono stati sacrificati 5 animali. A questi vanno inoltre aggiunti 5 topi *wild Type* e 5 bGH-MT sacrificati allo scopo di valutare gli effetti del GH sull'apoptosi cardiomiocitaria indotta dall'adriamicina.

Complessivamente quindi sono stati sacrificati 40 topi nello studio.

Per tutta la durata dello studio gli animali sono stati posti in un ambiente controllato per umidità, temperatura e ciclo luce/buio. Gli animali avevano libero accesso ad acqua e cibo.

Il protocollo di studio sul modello murino è stato condotto in accordo con le linee guida sulla sperimentazione animale della NHI [133].

Trattamento farmacologico sul modello murino

Come illustrato in precedenza alcuni topi bGH-MT sono stati trattati, al fine di valutare la specificità dell'azione del GH, con l'antagonista recettoriale del GH (pegvisomant®, Pzifer). La dose somministrata nell'animale è stata di 0.1 mg/kg/die e il trattamento è iniziato 15 giorni prima del sacrificio dell'animale [121].

L'efficacia dell'azione del farmaco è stata valutata monitorando le concentrazioni sieriche dell'IGF-1 prima dell'inizio della terapia e il giorno del sacrificio dell'animale.

Nella terza fase dello studio due gruppi di animali, uno *wild type* e uno bGH-MT, sono stato sottoposto ad un agente farmacologico, l'adriamicina, di cui è nota un'azione cardiotossica e la capacità di stimolare la morte cellulare cardiomiocitaria per apoptosi [134]. L'antraciclina è

stata somministrata a dosi crescenti (0.05, 0.5, 2 mg/kg) per 24 h sulla base di quanto riportato in altri studi in letteratura [125].

Campioni tissutali e valutazione istologica

Il peso corporeo e miocardico dei tre gruppi in studio sono stati valutati dopo il sacrificio.

Immediatamente dopo il sacrificio dell'animale i ventricoli sono stati isolati dalle altre strutture cardiache e sono stati posti in azoto liquido a -150°C. I campioni tissutali miocardici sono stati quindi conservati a -80°C prima di esser trattati per le diverse valutazioni.

Per la valutazione istologica i ventricoli sinistri sono stati fissati in formalina al 10% e inclusi in paraffina e quindi valutate al microscopio ottico. Sezioni tissutali seriali di 4 µm sono deparaffinizzati e colorati con ematossilina-eosina. Il diametro delle fibre è stato determinato calcolando la media del diametro maggiore e di quello minore come descritto in letteratura [136].

Valutazione del tasso di apoptosi nel miocardio murino

Al fine di valutare il tasso di apoptosi nel miocardio murino sono state preparate delle sezioni dello spessore di 4 µm provenienti dal ventricolo sinistro dei topi sacrificati.

Questo sono state montate su dei vetrini portaoggetti e sono state quindi valutate con la metodica TUNEL e con il saggio dell'ANNESSINA V (Santa Cruz Biothecnology, California, USA) [137] secondo i protocolli proposti dalla casa produttrice del kit.

Il saggio dell'annessina V è stato utilizzato in quanto è particolarmente adatto alla valutazione delle fasi iniziali dell'apoptosi. Questa metodica si basa sull'osservazione che la fosfatidilserina, un fosfolipide che normalmente è confinato sul versante citosolico della membrana citoplasmatica, trasloca sul versante esterno della membrana citoplasmatica durante il processo apoptotico rendendo riconoscibile la cellula apoptotica da parte delle cellule vicine o dai macrofagi, facilitando in tal modo la rimozione non infiammatoria della stessa.

Una volta che è stata esposta sulla membrana citoplasmatica, la fosfatidilserina può essere riconosciuta attraverso il legame con la molecola di Annessina V marcata con FITC (*fluorescein isothiocyanate*). Le cellule marcate in tal modo possono essere quindi riconosciute al microscopio a fluorescenza o attraverso la citometria di flusso.

Per visualizzare l'intera popolazione di nuclei cellulari le sezioni sono state contro colorate con il SYTOX Orange (Molecular Probe, Invitrogen, Italy) un colorante nucleare in grado di penetrare nelle cellule con membrane citoplasmatiche lesionate [138].

Infine, allo scopo di riconoscere i cardiomiociti dalle altre cellule non cardiomiocitarie, le sezioni di cellule miocardiche sono state ulteriormente incubate con anticorpi monoclonali contro l'actina- α sarcomerica [41].

Una descrizione dettagliata del protocollo utilizzato è proposta qui di seguito.

I tessuti provenienti dal cuore degli animali in studio sono stati trattati con una soluzione fissativa (paraformaldeide al 4% in buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4) per 20 minuti a temperatura ambiente), sono stati quindi lavati con PBS per 30 minuti e sono stati incubati per due minuti in ghiaccio con una soluzione permeabilizzante per le membrane plasmatiche eucariotiche (Triton X-100 allo 0.1% in una soluzione di citrato di sodio allo 0.1%.)

Dopo un secondo lavaggio con PBS, i tessuti sono stati preincubati con gli anticorpi monoclonali rivolti verso l'actina- α -sarcomerica per un'ora e sono stati quindi incubati o con la miscela per la reazione TUNEL al buio per un'ora secondo le indicazioni della ditta produttrice oppure con l'Annessina V per un'ora a temperatura ambiente.

I sistemi rivelatori anticorpali utilizzati nel protocollo sono:

- anticorpo anti-coniglio per l'Annessina V (Molecular Probes)
- anticorpo anti-coniglio Alexa Fluor 488 per la α -actina sarcomerica (Molecular Probes)

I campioni sono stati quindi analizzati utilizzando il microscopio confocale a fluorescenza utilizzando un obiettivo 40x (Nikon eclipse 80i, Nikon Italia). In ciascun campione sono state valutate 400 cellule. Le immagini sono state fotografate digitalmente e analizzate attraverso un software apposito fornito dalla casa madre del microscopio (Act-2U) per contare i nuclei cellulari.

Solo le cellule marcate nei saggi TUNEL o Annessina V ed identificate come cardiomiociti attraverso il riconoscimento della α -actina sarcomerica sono state inserite nel novero dei cardiomiociti andati incontro a morte cellulare programmata. In ciascun campo microscopico il numero dei nuclei di cardiomiociti riconosciuti dal saggio TUNEL o da quello dell'Annessina V sono stati divisi per il numero totale di nuclei marcati dal sytox orange.

Estratti Tissutali e Western Blot

Gli estratti tissutali sono stati ottenuti attraverso l'omogeneizzazione dei ventricoli sinistri dei topi dei diversi gruppi utilizzando un buffer litico (150 mM di NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM di EDTA, 1% d Triton-X 100, con una compressa d'inibitori delle proteasi: benzamidina, fenantrolina, aprotina, leupeptina, pepstatina fluoruro di fenilmetan-sulfonile).

Dopo l'incubazione con ghiaccio per 30 minuti e la successiva centrifugazione, i supernatanti sono conservati a -80°C. La concentrazione delle proteine è stata misurata utilizzando il saggio di Bradford utilizzando i reagenti prodotti dalla Bio-Rad. Le proteine citosoliche e mitocondriali sono state isolate utilizzando un sistema di frazionamento commerciale mitocondri/citosol (IMAGENEX, Analitica De Mori, Milano) e utilizzato per valutare l'espressione mitocondriale o citosolica del citocromo-C.

La determinazione dell'espressione proteica negli estratti è stata effettuata attraverso saggio *Western Blot* [139].

Estratti proteici miocardici di mitocondrio (20 µg), citosolici (50 µg) o totali (50 µg) sono stati sottoposti ad un'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato al 12% (12% SDS-PAGE) e sono stati quindi trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. Questa è stata quindi immersa per 30 secondi in una soluzione di Rosso Ponceau per verificare il trasferimento delle proteine e quindi lavata con PBS fino alla scomparsa del colorante.

Le proteine trasferite sono state quindi incubate nottetempo a 4°C in una soluzione costituita per il 50% da TBS (*tris buffered saline*, 200 mM Tris-HCl, pH 7.6 e 1.4 M NaCl) e per il 50% da TTBS (TBS, 0.05% Tween-20) contenente 5% di latte scremato in polvere ed incubato con l'appropriato anticorpo (v. tabella 3.1) per un'ora a temperatura ambiente.

La membrana di nitrocellulosa è stata quindi lavata con TTBS e posta ad incubare per un'ora a temperatura ambientale con un'immunoglobulina IgG di pollo anti-capra coniugata con una perossidasi di rafano (*horseradish peroxidase*); le proteine positive sono state riconosciute utilizzando un sistema di riconoscimento dell'aumento della chemiluminescenza (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

Infine le membrane sono state incubate per 10 minuti a 70°C in uno *stripping* buffer (5mM Tris HCl pH 6.8%, 2% SDS, 67.5 ml di acqua ultrapura, 0.8% di β-mercaptoetanolo) e rivalutate per l'actina α-sarcomerica (per le proteine totali e citoplasmatiche) o per la sub unità IV dell'enzima citocromo IV ossidasi (per le proteine mitocondriali) allo scopo di ottenere un dato verso il quale normalizzare l'espressione proteica.

Le pellicole sono state quindi scannerizzate utilizzando un densitometro (Biorad, Life Science, Milano) e le intensità delle bande (misurate in unità arbitrarie) sono state valutate utilizzando il software GmbH (Interfocus GmbH, Sonnenblumenring, Mering, Germany). Ciascun campione è stato normalizzato per errori nella procedura dividendo per il valore di intensità ottenuto dalla valutazione della α-actina sarcomerica o della COXIV.) I valori così ottenuti da animali del medesimo gruppo ma da differenti blot sono stati quindi combinati.

Statistica

I risultati sono espressi come media ± una deviazione standard. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per valutare la presenza di differenze statisticamente significative nel tasso di apoptosi cardiomiocitaria tra i vari gruppi esaminati o nel tasso di espressione delle singole proteine analizzate. Un valore di $P < 0.05$ è stato utilizzato come cut off per la significatività statistica.

Anticorpi utilizzati nello studio

Tabella 3.1 Anticorpi utilizzati nello studio

Proteina	Nome commerciale	Tipo di Ig	Referenze	Fornitore
p38	P38(C-20) rabbit IgG antibody	Ig policlonale di coniglio	1H Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in estrogen-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage <i>American Journal of Physiology: Heart & Circulation Physiology</i> 2007; 292: H2982-H2987	Biotechnology, CA, USA
p53	P53(FL393) rabbit polyclonal IgG antibody	IgG policlonale di coniglio	Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Caver G, Linsley PS, Beijersbergen RL, Bernards R A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway <i>Nature</i> 2004; 428: 431-437.	=
Bax	Bcl-2 Associated X Protein(Bax; N-20) rabbit polyclonal IgG antibody	IgG policlonale di coniglio	Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak <i>Nature</i> 1995; 374: 736-739	=
Bad	Bad (C-7): sc-8044	IgG monoclonale murino	Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak <i>Nature</i> 1995; 374: 736-739	=
Bcl-XL	Bcl-xL (H-5): sc-8392	IgG1 monoclonale murino	Chen J, Yu WM, Bunting KD, Qu CK A negative role of SHP-2 tyrosine phosphatase in growth factor-dependent hematopoietic cell survival <i>Oncogene</i> . 2004; 23: 3659-3669	=
Bcl-2	Bcl-2 (C-2): sc-7382	Anticorpo IgG1 murino monoclonale	Kuo WW, Liu CJ, Chen LM, Wu CH, Chu CH, Liu JY, Lu MC, Lin JA, Lee SD, Huang CY Cardiomyoblast apoptosis induced by insulin-like growth factor (IGF)-I resistance is IGF-II dependent and synergistically enhanced by angiotensin II <i>Apoptosis</i> . 2006; 11: 1075-1089.	=
Citocromo-C	cytochrome c (7H8): sc-13560	Anticorpo IgG2b murino monoclonale	Wajapeyee N, Britto R, Ravishanker HM, Somasundaram K Apoptosis induction by activator protein 2alpha involves transcriptional repression of Bcl-2 <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2006; 281: 16207-16219.	=
Apaf-1	Apaf-1 (H-324): sc-8339	Anticorpo IgG policlonale di coniglio	Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia <i>Oncogene</i> . 2003; 22: 451-455	=
Caspasi 9	caspase-9 p35 (H-170): sc-8355	Anticorpo IgG policlonale di coniglio	Balasubramanian S, Chandraratna RA, Eckert RL A novel retinoid-related molecule inhibits pancreatic cancer cell proliferation by a retinoid receptor independent mechanism via suppression of cell cycle regulatory protein function and induction of caspase-associated apoptosis <i>Oncogene</i> . 2005; 24: 4257-4270	=
IAP 1/2	c-IAP 1/2 (A-13): sc-12410	Anticorpo IgG policlonale di capra	Bernal-Mizrachi L, Lovly CM, Ratner L The role of NF- κ B-1 and NF- κ B-2-mediated resistance to apoptosis in lymphomas <i>Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America</i> 2006; 103: 9220-9225.	=
Caspasi 3	caspase-3 (E-8): sc-7272	Anticorpo IgG2a monoclonale di coniglio	Yang SH, Chien CM, Lu MC, Lu YJ, Wu ZZ, Lin SR Cardiotoxin III induces apoptosis in K562 cells through a mitochondrial-mediated pathway <i>Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology</i> 2005; 32: 515-520.	=
Akt1	Akt1 (B-1): sc-5298	Anticorpo IgG1 monoclonale murino	Thrash BR, Menges CW, Pierce RH, McCance DJ AKT1 provides an essential survival signal required for differentiation and stratification of primary human keratinocytes <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2006; 281: 12155-12162	=
Mek1	MEK-1 (H-8): sc-6250	Anticorpo IgG monoclonale murino	Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Liscovitch M, Seger R Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma <i>Molecular and Cellular Biology</i> 2007; 27: 803-817	=
Erk-1	ERK 1 (K-23): sc-94	Anticorpo IgG policlonale di coniglio	Guerrero C, Martin-Encabo S, Fernández-Medarde A, Santos E C3G-mediated suppression of oncogene-induced focus formation in fibroblasts involves inhibition of ERK activation, cyclin A expression and alterations of anchorage-independent growth <i>Oncogene</i> . 2004; 23: 4885-4893.	=
p90-RSK	Rsk (H-60): sc-28773	Anticorpo IgG policlonale di coniglio	-	=
Actina	Monoclonal Anti- α -sarcomeric actin (clone 5C5)	Anticorpo IgM monoclonale murino	Skalli O, Gabbiani G, Babai F, Seemayer TA, Pizzolato G, Schürch W Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. II. Rhabdomyosarcomas <i>American Journal of Pathology</i> 1988; 130: 515-531	Sigma-Aldrich, Milano
Subunità IV del citocromo ossidasi	Anti-citocrome oxidase subunit IV (COXIV)	Ig di coniglio anti-topo	-	Molecular Probe, Invitrogen, Milano
Ig anti Ig anti actina	Rabbit anti-mouse Alexa Flour 546	Anticorpo monoclonale di coniglio	-	Molecular Probe, Invitrogen, Milano
Ig anti-coniglio per l'annessina V	Annexin V	Anticorpo nomo clonale di capra	-	Molecular Probe, Invitrogen, Milano

RISULTATI

Immediatamente dopo il sacrificio degli animali è stata valutato il peso corporeo e quello miocardico. In accordo con la letteratura [121,122], i topi bGH-MT presentavano un peso corporeo medio maggiore rispetto ai topi *wild type*. Allo stesso modo la determinazione del peso miocardico ha permesso di riconoscere l'aumento delle dimensioni di questo organo nei topi bGH-MT (tabella 3.2).

Tuttavia, un quadro di ipertrofia cardiaca è stato riscontrato, unicamente nei topi dell'età di 9 mesi e non in quelli di 3 mesi (fig. 3.3) in accordo con i dati presenti in letteratura [121,122].

Le concentrazioni sieriche di IGF-1 sono state determinate in ciascun animale inserito nel protocollo di studio riscontrando, come previsto, valori di IGF-1 significativamente più alti nel gruppo dei topi acromegalici rispetto a quanto riscontrato sia nel gruppo di topi wild type che nel gruppo dei topi acromegalici trattati con pegvisomant (v. tab 3.2) [$P < 0.04$].

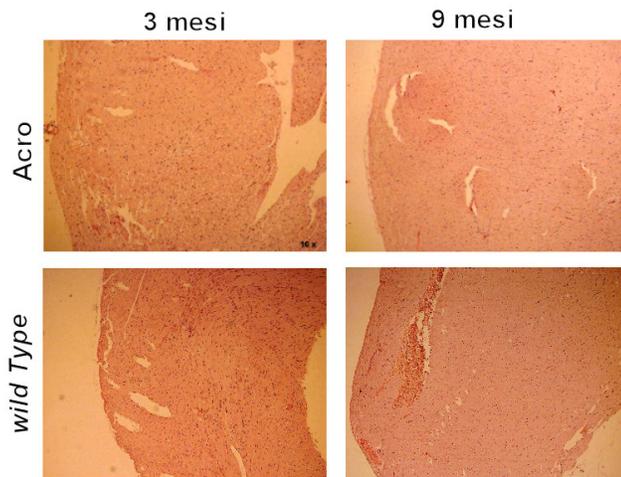


Fig 3.3 Microscopia ottica a basso ingrandimento (10x) di sezioni miocardiche provenienti dagli animali in studio. Colorazione ematossilina-eosina della parete ventricolare sinistra. Nei primi due pannelli sono riportate sezioni ottenute dal miocardio di topi bGH mentre nei pannelli inferiori si possono osservare sezioni di miocardio dei topi del gruppo di controllo. Da notare anche l'assenza di fenomeni fibrotici evidenti o di aree di infiltrazione monocitaria.

Tabella 3.2 Peso corporeo, cardiaco e valori sierici di IGF-I riscontrati nei diversi gruppi in studio al momento del sacrificio dell'animale.

Età (mesi)	gruppo	3 mesi	9 mesi
Peso Corporeo (grammi)	<i>Wild Type</i>	26 ± 4	37 ± 4
	<i>Acro</i>	47 ± 3	58 ± 3
	<i>AcroPeg</i>	46 ± 4	60 ± 2
Peso cardiaco (grammi)	<i>Wild Type</i>	0.21 ± 0.01	0.26 ± 0.03
	<i>Acro</i>	0.31 ± 0.02	0.38 ± 0.04
	<i>AcroPeg</i>	0.33 ± 0.01	0.36 ± 0.02
IGF-I (ng/ml)	<i>Wild Type</i>	293 ± 44	278 ± 56
	<i>Acro</i>	691 ± 73	757 ± 44
	<i>AcroPeg</i>	289 ± 94	301 ± 45

Valutazione del tasso di apoptosi nei diversi gruppi in studio

La valutazione del tasso di apoptosi è stata effettuata utilizzando il saggio TUNEL e il saggio dell'Annexina V (figura 3.4: topi di 3 mesi; figura 3.5: topi di 9 mesi).

La prima metodica TUNEL ha rivelato un tasso di apoptosi tendenzialmente costante tra i topi *wild type* di 3 e 9 mesi (rispettivamente $0.29 \pm 0.014\%$ e $0.25 \pm 0.08\%$).

La stessa determinazione, effettuata nel gruppo dei topi acromegalici, ha evidenziato una riduzione nel tasso di apoptosi nel gruppo dei topi sacrificati all'età di 3 mesi ($0.13 \pm 0.03\%$) e un aumento statisticamente significativo nel gruppo dei topi più anziani ($0.52 \pm 0.009\%$) ($P < 0.0001$).

I dati ottenuti con il saggio dell'Annexina V confermano i precedenti risultati. In particolare, questa ha rilevato, nel gruppo dei topi *wild type*, un tasso di apoptosi di $0.32 \pm 0.02\%$ e di $0.25 \pm 0.016\%$ rispettivamente per i topi di 3 e 9 mesi. Nel gruppo dei topi bGH-MT il tasso di apoptosi valutato con questo saggio è stato di $0.11 \pm 0.015\%$ per i topi giovani e di $0.44 \pm 0.012\%$ per i topi più anziani.

Nel complesso il dato principale che emerge dall'analisi di questi risultati è che nel gruppo

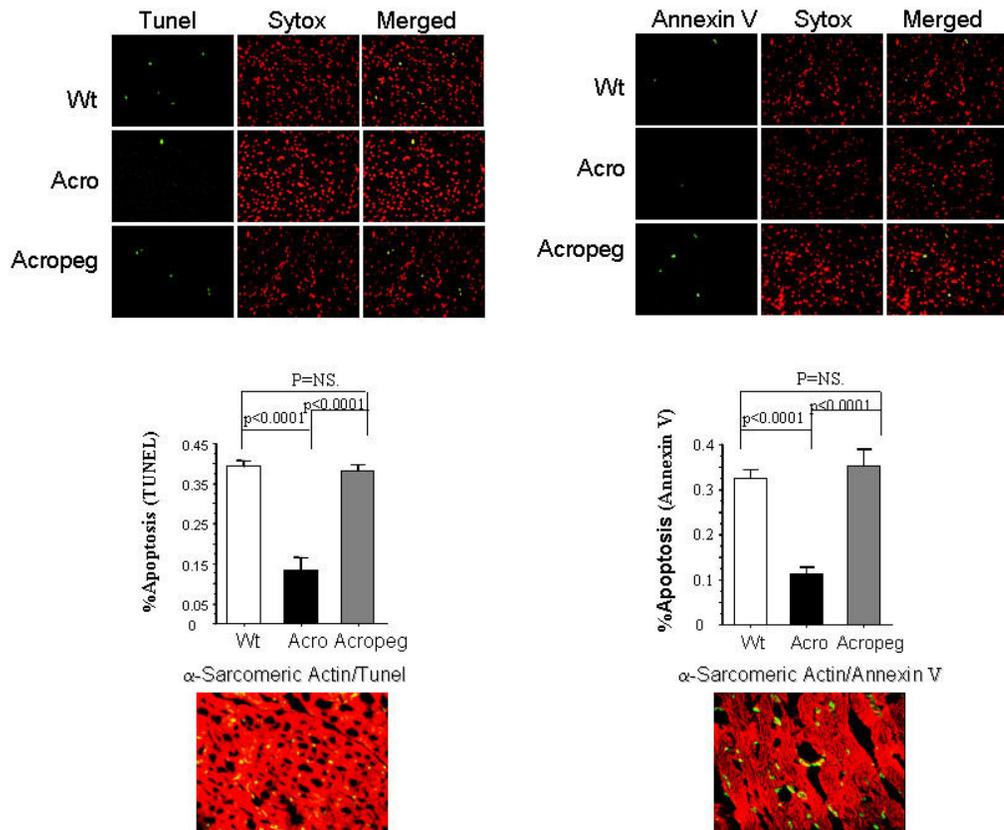


Figura 3.4 Valutazione della prevalenza dei fenomeni di apoptosi cardiomiocitaria nel topo di 3 mesi. Nel pannello a sinistra è riportata la determinazione effettuata con il saggio TUNEL mentre in quello destro è riportato il risultato della determinazione con il saggio dell'Annexina V. Il colorante Sytox è stato utilizzato per individuare i nuclei cellulari. Merged: sovrapposizione della metodica TUNEL o Annexina V e Sytox. In basso è riportata l'immagine della contro colorazione per la α -Actina Sarcomerica che è stata utilizzata per riconoscere i cardiomiociti

dei topi bGH.MT di 3 mesi vi è una riduzione di circa il 55% nel tasso di apoptosi rispetto a quanto riscontrato nel gruppo di controllo ($P < 0.001$). Al contrario, il gruppo dei topi Acro presenta un marcato tasso di apoptosi (circa 80%) nel gruppo dei topi più anziani ($P < 0.0001$ vs. Wt).

La determinazione del tasso di apoptosi nel terzo gruppo in studio, i topi bGH-MT trattati con pegvisomant conferma il ruolo del GH nella riduzione del tasso di apoptosi osservabile nel topo bGH-MT. Infatti, la somministrazione dell'antagonista recettoriale dell'ormone della crescita nel gruppo dei topi più giovani si accompagna ad un tasso di apoptosi paragonabile a quello valutato nel gruppo dei topi Wt della stessa età ($0.31 \pm 0.016\%$ attraverso il saggio TUNEL, $0.35 \pm 0.038\%$ con il saggio dell'Annessina V).

La determinazione del tasso di apoptosi in questo gruppo nei topi più anziani sembra invece escludere diretta del GH. Infatti, il tasso di apoptosi in questo gruppo non si differenzia in maniera significativa rispetto a quello riscontrato nei ventricoli dei topi bGH-MT di pari età.

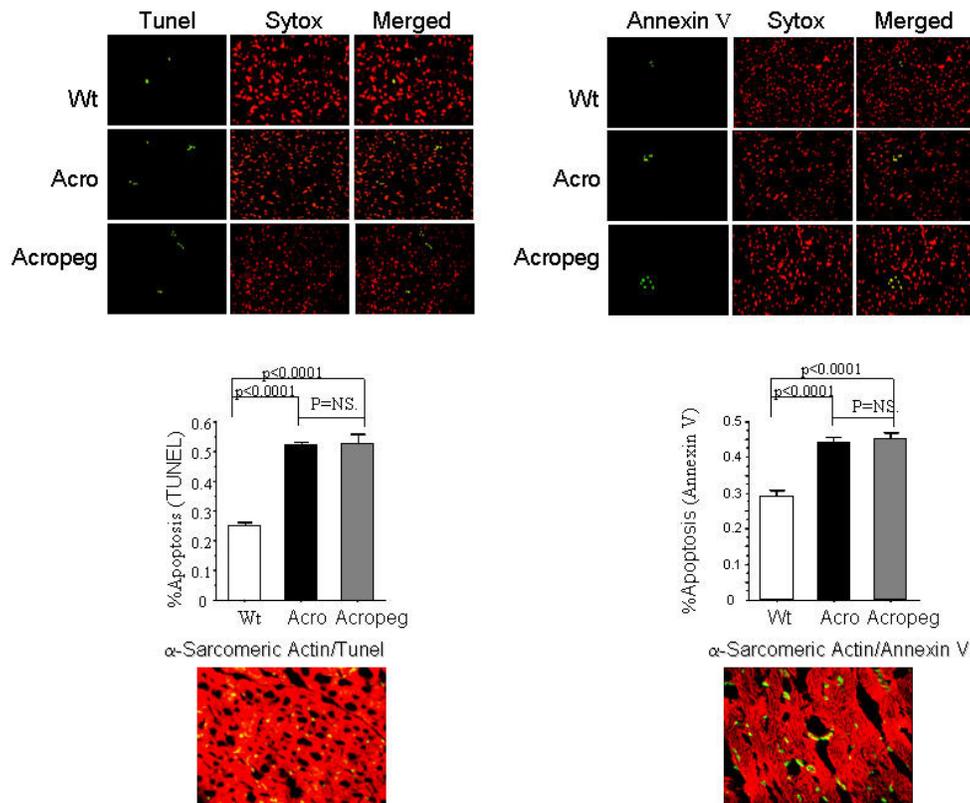


Figura 3.5 Valutazione della prevalenza dei fenomeni di apoptosi cardiomiocitaria nel topo di 9 mesi. Nel pannello a sinistra è riportata la determinazione effettuata con il saggio TUNEL mentre in quello destro è riportato il risultato della determinazione con il saggio dell'Annessina V. Il colorante Sytox è stato utilizzato per individuare i nuclei cellulari. Merged: sovrapposizione della metodica TUNEL o Annessina V e Sytox. In basso è riportata l'immagine della contro colorazione per la α -Actina Sarcomerica che è stata utilizzata per riconoscere i cardiomiociti.

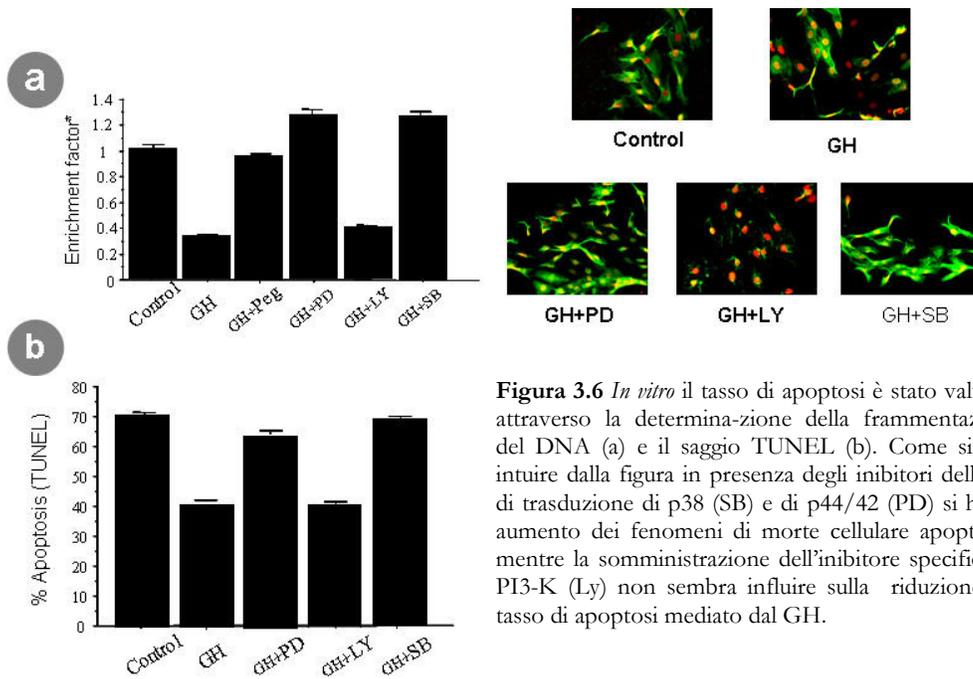


Figura 3.6 *In vitro* il tasso di apoptosi è stato valutato attraverso la determinazione della frammentazione del DNA (a) e il saggio TUNEL (b). Come si può intuire dalla figura in presenza degli inibitori della via di trasduzione di p38 (SB) e di p44/42 (PD) si ha un aumento dei fenomeni di morte cellulare apoptotica mentre la somministrazione dell'inibitore specifico di PI3-K (Ly) non sembra influire sulla riduzione del tasso di apoptosi mediato dal GH.

Vie di trasduzione del segnale nell'inibizione dell'apoptosi GH-mediata *in vitro*

Per valutare le vie di trasduzione del segnale coinvolte nella modulazione GH mediata dei fenomeni di morte cellulare, una linea cellulare di cardiomioblasti (H9c2) sono stati esposti al GH (5 nM) da solo oppure in combinazione con inibitori di tre vie di trasduzione del segnale note esser implicate nella trasduzione del GH e nella modulazione dei fenomeni apoptotici.

Come si può osservare nella figura 3.6 la riduzione del tasso di apoptosi GH mediata è abolita dalla preincubazione delle colture cellulari con PD e SB in maniera simile a quanto si osserva a seguito della contemporanea somministrazione del GH e del pegvisomant.

Al contrario, l'incubazione delle colture cellulari H9c2 con l'inibitore della via di trasduzione del segnale di PI3-K non ha determinato alterazioni sostanziali nel tasso di apoptosi.

Questi dati suggeriscono che, almeno in questo modello sperimentale *in vitro*, la via di trasduzione di p38 e di p44/42 siano implicate nella riduzione del tasso di apoptosi GH mediato.

Il secondo momento dello studio sul modello murino prevedeva la valutazione, attraverso metodica *Western Blot*, dell'espressione delle principali proteine coinvolte nella via apoptotica intrinseca e nella determinazione dell'espressione di alcune molecole chiave delle vie di trasduzione del segnale prese in esame *in vitro* nella fase preliminare dello studio.

Per rendere più agevole la comprensione del gran numero di valutazioni effettuate i dati saranno presentati suddividendoli in base all'età (3 o 9 mesi) degli animali sacrificati nello studio. Inoltre, al fine di agevolare la comprensione dei risultati nel corpo del testo non sono

stati inseriti i valori numerici ottenuti dalla valutazione *Western Blot* i quali sono riportati per esteso al termine del capitolo nella tabella 3.3.

Il ruolo delle molecole implicate direttamente nei processi di apoptosi raffigurato schematicamente nella figura 3.7 mentre la rappresentazione grafica delle tre vie di trasduzione del segnale è riportata nell'appendice I.

Meccanismi per la diminuzione del tasso di apoptosi cardiaca nel topo transgenico di 3 mesi

Per indagare i meccanismi implicati nella diminuzione del tasso di apoptosi cardiomiocitaria osservata alla valutazione istochimica dei campioni miocardici del topo Acro di 3 mesi abbiamo inizialmente valutato il rilascio dell'enzima citocromo-C dai mitocondri nel citosol.

Infatti, come si può intuire della figura 3.7 questo trasportatore di elettroni costitutivamente espresso a della membrana mitocondriale interna, viene rilasciato nel citosol a seguito ad generica *noxa* attivante la via mitocondriale dell'apoptosi. Nel citosol questa molecola va quindi a costituire assieme ad Apaf-1 e alla procaspasi 9 il cosiddetto apoptosoma il quale si rende responsabile del clivaggio e dell'attivazione delle caspasi effettrici.

Come illustrato nella figura 3.8 i livelli mitocondriali di citocromo-C sono risultati più elevati nel gruppo dei topi bGH-MT rispetto a quanto osservato nel gruppo dei topi *Wild Type* ($P < 0.001$) mentre, parallelamente si è osservato una riduzione nell'espressione citosolica della molecola ($P < 0.002$ vs. *wild Type*).

La valutazione dell'espressione mitocondriale e citosolica di questo enzima nel gruppo dei topi bGH-MT sottoposti a terapia con pegvisomant ha evidenziato un pattern di espressione

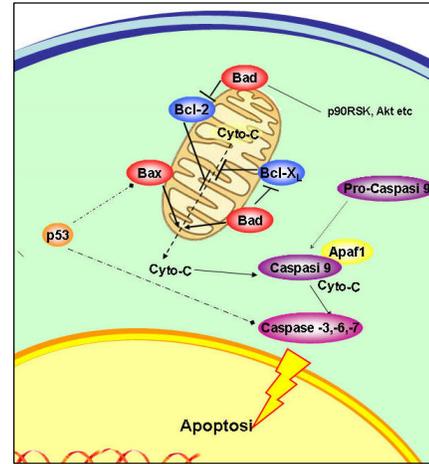


Fig 3.7 Rappresentazione grafica schematica del ruolo nella via apoptotica intrinseca di alcune delle proteine studiate.

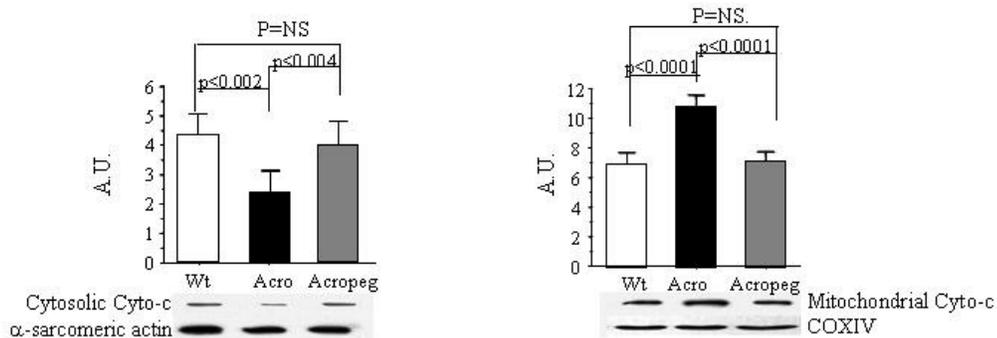


Figura 3.8 Espressione citosolica (sinistra) o mitocondriale (a destra) del Citocromo C nel topo di 3 mesi. *Western Blot* esemplificativi. I dati sono espressi come media \pm SD

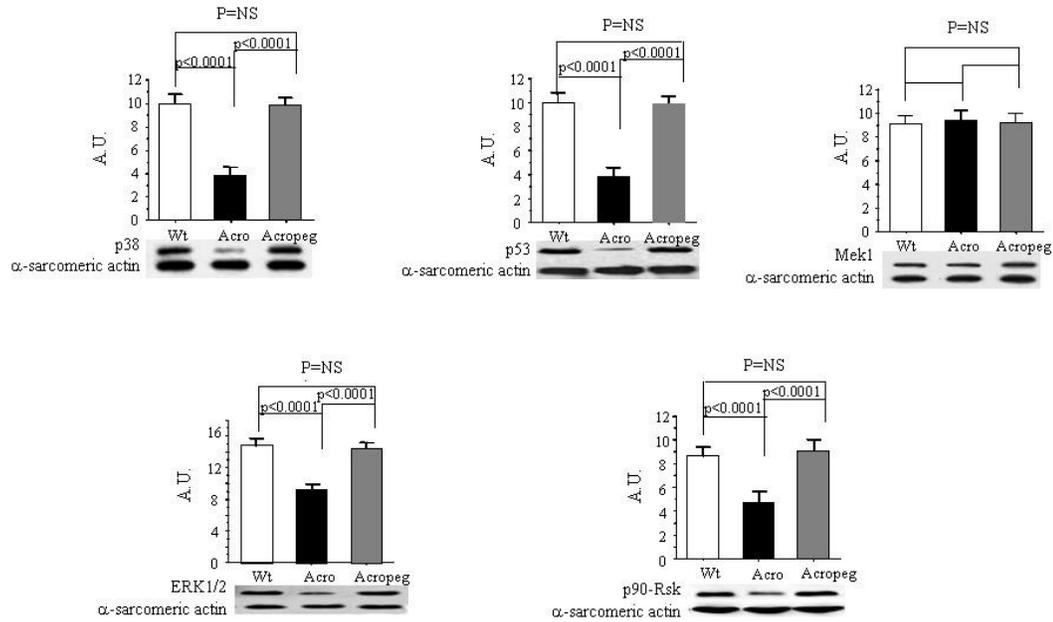


Figura 3.9 Livelli di espressione valutati attraverso metodica *Western Blot* di p38, p53, Mek1, ERK 1/2, p90RSK nel topo di 3 mesi. *Western Blot* esemplificativi. I dati sono espressi come media \pm SD

praticamente indistinguibile rispetto a quello osservato nel gruppo dei topi *Wild Type* (figura 3.8).

Pertanto, i topi bGH-MT dell'età di 3 mesi presentano un ridotto tasso di apoptosi rispetto al gruppo di controllo. Tale riduzione sembra essere direttamente correlato ad un'azione del GH, e si esplica attraverso una riduzione nell'attivazione della via apoptotica mitocondriale e quindi attraverso una diminuzione nel rilascio mitocondriale del citocromo-C.

Per comprendere ulteriormente i meccanismi alla base di questa riduzione sono state valutate l'espressione delle proteine coinvolte nella via di trasduzione del segnale di p38MAPK, di p44/42MAPK e di PI3-K (fig. 3.9).

L'espressione delle proteine p38, p53, ERK1-2, p90RSK è risultata ridotta nel gruppo dei topi Acro rispetto al gruppo di controllo ($P < 0.0001$). Come in precedenza, anche per queste proteine l'espressione sembra essere modulata dal GH come suggerito dalla valutazione *Western Blot* del gruppo AcroPeg. L'espressione di MEK1 non sembra essere influenzata in maniera significativa da GH (figura 3.8) con valori simili tra i 3 gruppi in esame.

La valutazione dell'espressione proteica delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale di PI3-K (p110 α , p110 γ) non mostra alterazioni significative tra il gruppo Acro e quello *wild type* ($P = ns$) (figura 3.10). Questa osservazione è concorde con quanto riscontrato negli studi preliminari sulle colture cellulari e porta ad ipotizzare che la via di PI3-K non sia direttamente coinvolta nella modulazione GH mediata del processo di morte cellulare cardiomiocitaria.

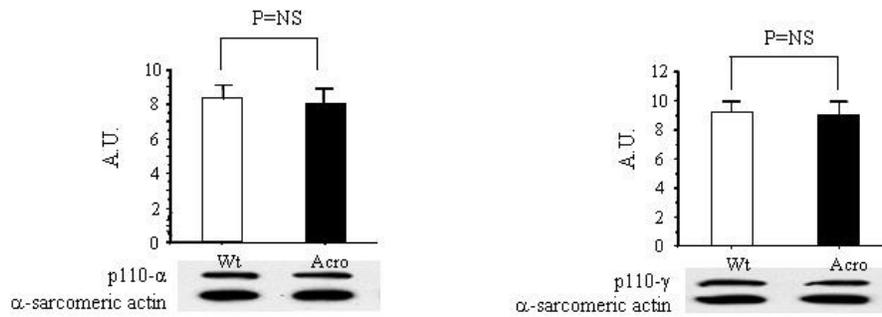


Figura 3.10 Espressione delle proteine della via di PI3-K (p110 α , p110 γ nel topo Acro e Wt di 3 mesi). *Western Blot* esemplificativi. I dati sono espressi come media \pm SD

Per chiarire maggiormente i meccanismi alla base dell'azione antiapoptotica è stata valutata l'espressione di alcune proteine note per la loro azione regolatrice sul programma di morte cellulare. In particolare nel nostro studio è stata valutata l'espressione di quattro proteine (Bax, Bad, Bcl-X_L e Bcl-2) appartenenti alla famiglia delle proteine bcl-2 per le quali è stato riconosciuto un ruolo nella modulazione dell'attivazione del processo apoptotico intrinseco.

Nello specifico l'azione di Bcl-2 e di Bcl-X_L è volta ad ridurre l'attivazione del processo apoptotico attraverso l'inibizione del rilascio di citocromo-C dai mitocondri [119,120].

Al contrario, Bax e Bad sono stimolatorie del processo apoptotico ed agiscono attraverso la promozione del rilascio del citocromo-C dai mitocondri (Bax) o il legame e quindi l'inibizione di bcl-2 e Bcl-X_L (Bad).

Il dato *Western Blot* ottenuto dalla valutazione di queste proteine è concorde con la nostra ipotesi. Infatti, l'espressione delle due proteine pro-apoptotiche Bax e Bad è diminuita in maniera statisticamente significativa nel gruppo dei topi bGH-Mt rispetto a quanto osservato nel gruppo dei *wild type* ($P < 0.0001$, figura 3.11). Al contrario l'espressione di bcl-2 e bcl-XL è risultata essere significativamente maggiore nel gruppo dei topi acromegalici rispetto a quanto evidenziato nel gruppo di controllo ($P < 0.0001$).

Anche per quanto concerne l'espressione di queste proteine la somministrazione di pegvisomant si associa ad un quadro di espressione simile a quanto osservato nel gruppo di controllo suggerendo quindi un ruolo del GH nella loro espressione.

Il quadro che emerge è che l'azione del GH sembra esplicarsi attraverso le vie del p38MAPK e della p44/42MAPK a livello delle quali esercita una modulazione inibitoria. La diminuita attivazione di queste vie di trasduzione del segnale sembra agire attraverso una modificazione dell'espressione delle proteine modulatorie della famiglia di bcl-2 e attraverso un'inibizione

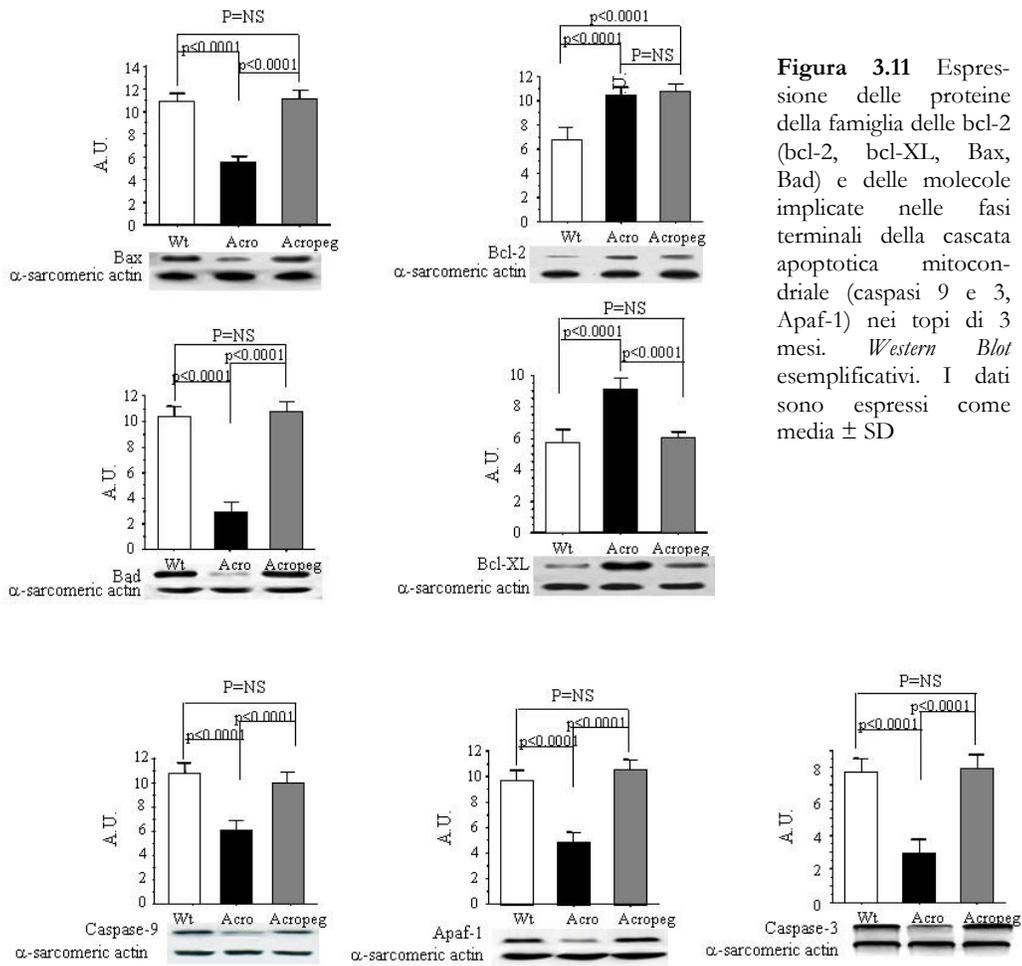


Figura 3.11 Espressione delle proteine della famiglia delle bcl-2 (bcl-2, bcl-XL, Bax, Bad) e delle molecole implicate nelle fasi terminali della cascata apoptotica mitocondriale (caspasi 9 e 3, Apaf-1) nei topi di 3 mesi. *Western Blot* esemplificativi. I dati sono espressi come media \pm SD

dell'espressione di p53. Il risultato ultimo di questo complicato processo è rappresentato dalla diminuzione del rilascio dell'enzima citocromo-C ossidasi dal mitocondrio.

Infine, abbiamo valutato se le variazioni nell'espressione citosolica di citocromo-C fossero correlati con l'espressione delle proteasi coinvolte nel processo di apoptosi, le caspasi. In particolare è stata valutata l'espressione di una caspasi iniziatrice, la caspasi 9, e di una caspasi effettrice, la caspasi 3 (figura 3.11.)

Anche i risultati dell'analisi dell'espressione di queste proteine sembra concordare con la nostra ipotesi. Infatti, nel topo bGH-MT è stata riconosciuta una ridotta espressione di entrambe le caspasi rispetto a quanto osservato nel topo *wild type* ($P<0.0001$). Come per le altre proteine oggetto dello studio, anche per queste la somministrazione dell'antagonista recettoriale del GH porta ad un pattern di espressione sovrapponibile a quello osservato nel gruppo dei controlli.

Infine è stata valutata anche l'espressione della terza proteina che prende parte alla costituzione dell'apoptosoma, l'Apaf-1 (figura 3.11). Anche per questa è stata osservata un'espressione inferiore nel gruppo Acro rispetto a quello di controllo ($P<0.0001$). La somministrazione del pegvisomant determina un aumento nell'espressione di questa molecola a valori similari a quelli del gruppo *wild type*. ($P<0.0001$ vs. Acro).

Meccanismi per l'aumento del tasso di apoptosi cardiomiocitaria nel topo bGH-MT anziano.

Nel gruppo dei topi anziani è stato riscontrato un aumento nell'espressione citosolica dell'enzima citocromo-C rispetto a quanto osservato nel gruppo di controllo ($P<0.0001$) accompagnata da una parallela riduzione dei livelli mitocondriali dell'enzima ($P<0.0001$). A differenza di quanto osservato nel gruppo dei topi di 3 mesi, la somministrazione dell'antagonista recettoriale del GH non sembra influenzare in maniera significativa questo pattern di espressione. Questo dato porta ad ipotizzare che nel topo bGH-MT l'aumentato tasso di apoptosi non sia dipendente dall'azione del GH (figura 3.12).

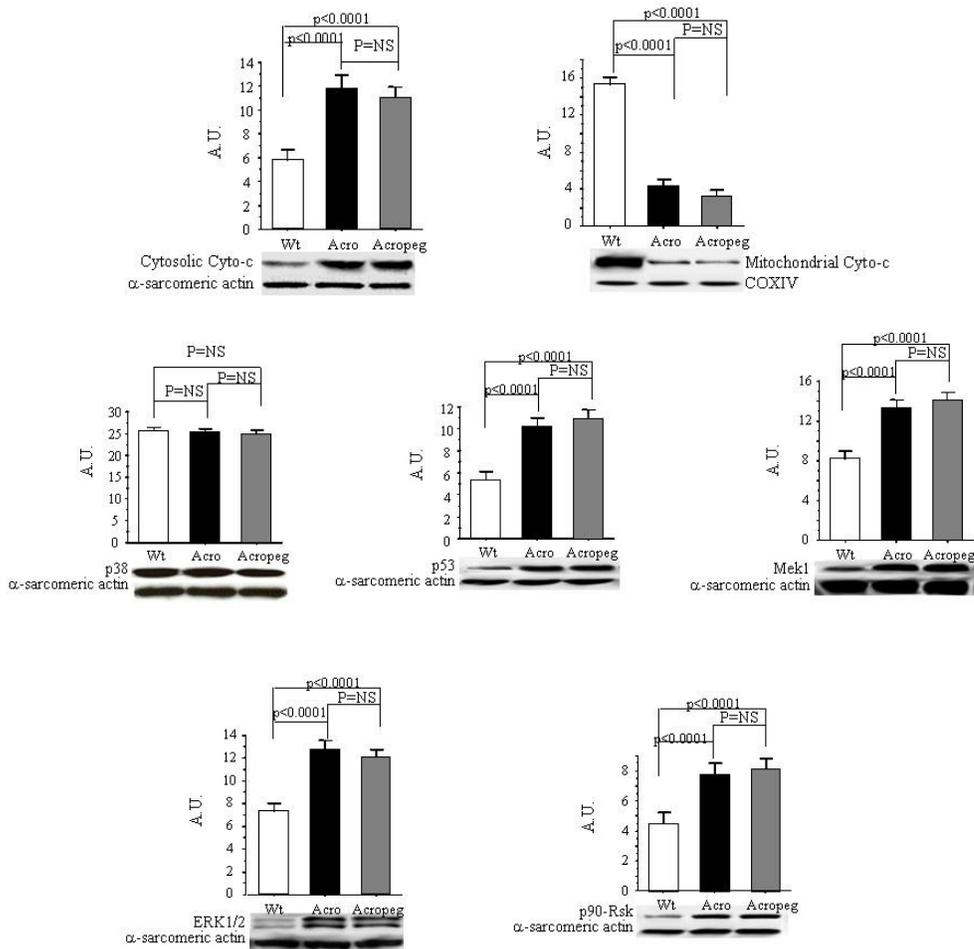


Figura 3.12 Espressione citosolica (sinistra) o mitocondriale (destra) del citocromo C e livelli di espressione di p38, p53, Mek1, ERK 1/2, p90RSK. I dati sono espressi come media \pm SD

La valutazione dell'espressione delle proteine implicate nelle tre vie di trasduzione del segnale in studio presenta anch'essa delle peculiarità rispetto a quanto osservabile nel topo giovane. Infatti, nel topo anziano l'espressione della p38 non presenta differenze statisticamente significative tra il gruppo di controllo ed il gruppo bGH-MT mentre l'espressione della p53, di ERK 1/2, MEK 1/2, p90RSK è risultata significativamente aumentata nel gruppo Acro rispetto a quanto osservato nel gruppo *wild type* ($P < 0.0001$) mentre l'espressione di Akt è risultata diminuita ($P < 0.0001$). Tuttavia, l'espressione di queste proteine non sembra esser influenzata dalla somministrazione del pegvisomant come indicato dalla valutazione della loro espressione nel gruppo AcroPeg che risulta esser paragonabile a quella del gruppo Acro (figura 3.12).

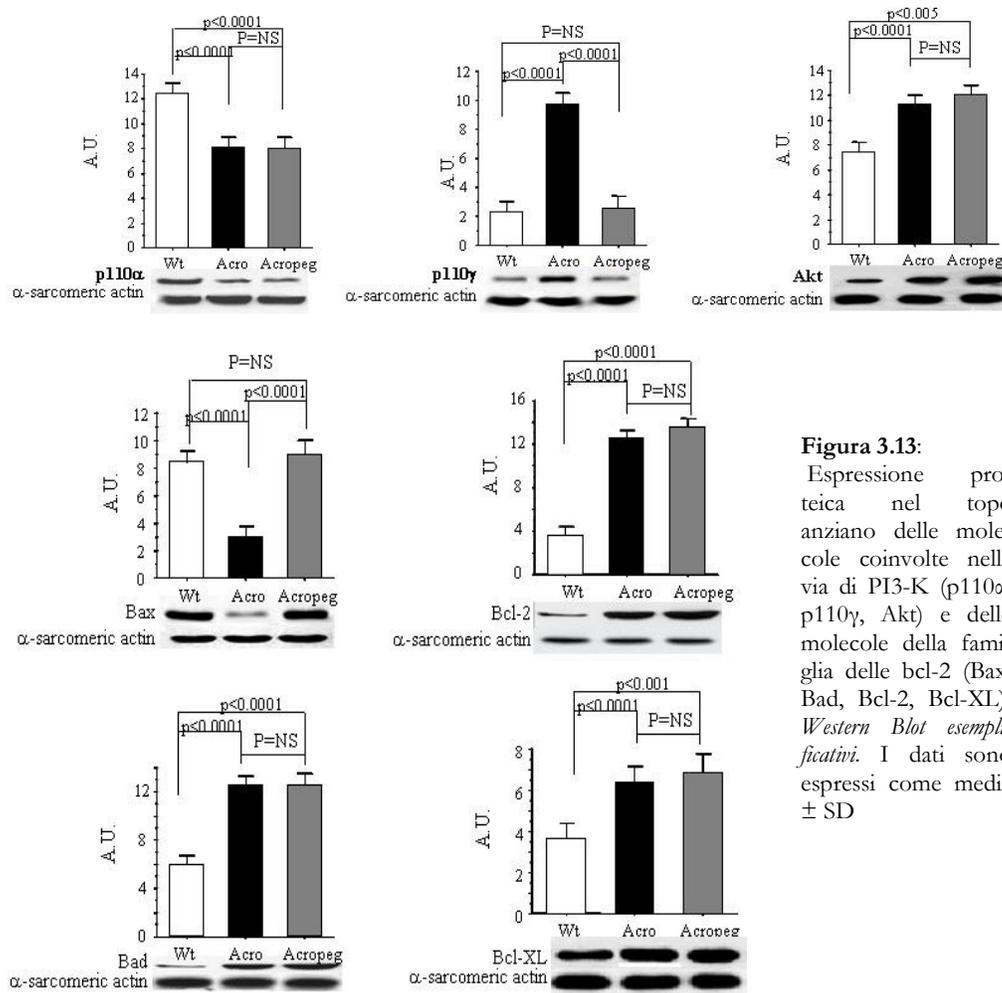


Figura 3.13:

Espressione proteica nel topo anziano delle molecole coinvolte nella via di PI3-K (p110α, p110γ, Akt) e delle molecole della famiglia delle bcl-2 (Bax, Bad, Bcl-2, Bcl-XL). *Western Blot esemplificativi*. I dati sono espressi come media ± SD

Quest'ultimo dato è, a nostro avviso, di estremo interesse in quanto indica che nel topo anziano l'attivazione di queste vie di trasduzione del segnale non sia o non sia unicamente alle dipendenze del GH.

La valutazione *Western Blot* dell'espressione proteica delle proteine della via di PI3-K ha rivelato un quadro di non facile interpretazione. Infatti, l'espressione della sub unità α della p110 è risultata esser minore nel topo bGH-MT rispetto a quanto osservato nel gruppo di controllo pur tuttavia non mostrando alterazioni significative dopo la somministrazione del pegvisomant. Al contrario, l'espressione della sub unità γ di questa proteina è risultata maggiore nel gruppo dei topi acromegalici e questo aumento è risultato esser abolito dalla somministrazione dell'antagonista recettoriale del GH ($P < 0.0001$).

Questi dati suggeriscano che nel topo anziano la via delle PI3-K possa svolgere un ruolo, sebbene questo non sia chiaro, nella risposta cellulare al GH.

La valutazione dell'espressione delle proteine della famiglia delle bcl-2 non permette di riconoscere nel gruppo dei topi anziani un pattern univoco con il riscontro della diminuzione di una proteina proapoptotica (Bax) e con un'umentata espressione di Bad e delle due molecole ad azione

antiapoptotica (bcl-2 e bcl-XL) ($P < 0.0001$ vs. *wild type*). L'espressione di queste molecole non sembra esser influenzata in maniera significativa dalla somministrazione dell'antagonista recettoriale del GH, ad eccezione della diminuzione di Bax che sembra esser abolita in questo gruppo.

Questo dato è significativo in quanto suggerisce che il GH continui ad esplicare un'azione antiapoptotica nel topo anziano sebbene questa sia soverchiata dalla sovrapposizione di altri stimoli che portano all'attivazione del processo di morte cellulare.

Per stabilire se le alterazioni nell'espressione delle proteine modulatorie e nella localizzazione del citocromo-C influenzassero l'espressione delle proteine della via finale dell'apoptosi abbiamo valutato l'espressione della caspasi 9, della caspasi 3 e di Apaf-1. Come era ipotizzabile, nel topo bGH-MT è stata osservata un'aumentata espressione di queste proteine rispetto a quanto osservato nel gruppo di controllo ($P < 0.0001$). Inoltre l'espressione di queste proteine non è risultata esser influenzata dalla somministrazione del pegvisomant.

Effetto protettivo dell'eccesso di GH nella cardiotoxicità indotta dall'adriamicina.

Allo scopo di valutare se la riduzione nel tasso di apoptosi osservata nel topo Acro potesse avere un significato funzionale abbiamo esposto due gruppi di topi dell'età di 3 mesi, un gruppo bGH-MT e uno di topi *wild type* a dosi crescenti di adriamicina (doxorubicina cloridrato: 0.05, 0.5, 2 mg/kg) un agente citossico di cui è nota la capacità di attivare il processo apoptotico a carico dei cardiomiociti [134,135]. Come si può osservare della figura 3.14, nel gruppo dei topi con eccessiva espressione di bGH è stato possibile riconoscere una diminuzione nel tasso di morte cellulare programmata rispetto a quanto osservato nel gruppo dei topi *wild Type* rispettivamente del 50% e del 35% dopo somministrazione di 0.05 mg/kg e di 0.5 mg/kg del farmaco ($P < 0.005$). Tuttavia, quando è stata somministrata la dose maggiore dell'antraciclina non è stato possibile osservare alcuna differenza tra i due gruppi per quanto concerne il tasso di apoptosi ($8.5 \pm 0.711\%$ nel gruppo Acro e $9.1 \pm 0.721\%$ nel gruppo dei *wild Type*; $P = ns$)

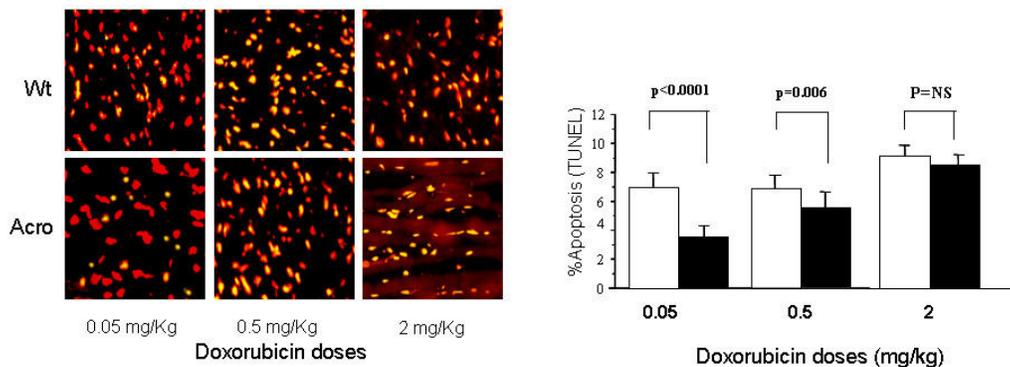


Figura 3.14 Valutazione del tasso di apoptosi cardiomiocitaria in topi *wild Type* e bGH-MT esposti a dose crescenti di adriamicina (doxorubicina cloridrato)

Tabella 3.2 Risultati della determinazione Western Blot

Dati dall'animale dell'età di 3 mesi			
	Acro	Wild Type	AcroPeg
Mitochondrial-cyt-c	10.86 ± 0.791%	6.92 ± 0.767%	7.06 ± 0.708%
Cytosolic cyt-c	2.35 ± 0.749%	4.30 ± 0.738%	3.97 ± 0.825%
Caspase 9	6.05 ± 0.80%	10.07 ± 0.86%	9.50 ± 0.79%
Caspase 3	2.96 ± 0.78%	7.72 ± 0.82%	7.96 ± 0.80%
Apaf-1	4.86 ± 0.75%	9.66 ± 0.85%	11.53 ± 0.80%
p38	3.76 ± 0.73%	9.96 ± 0.76%	9.72 ± 0.74%
p53	4.53 ± 0.80%	9.54 ± 0.80%	9.8 ± 0.90%
ERK 1/2	9.2 ± 0.72%	14.80 ± 0.90%	13.4 ± 0.76%
MEK1	9.5 ± 0.94%	9.0 ± 0.89%	9.2 ± 0.77%
p90RSK	4.70 ± 0.86%	8.54 ± 0.75%	8.96 ± 0.98%
p110α	7.9 ± 0.95%	8.3 ± 0.74%	-
p110γ	8.9 ± 0.98%	9.2 ± 0.72%	-
Akt	-	-	-
Bad	2.94 ± 0.77%	10.40 ± 0.76%	10.80 ± 0.79%
Bax	5.36 ± 0.72%	10.8 ± 0.79%	10.98 ± 0.90%
Bcl-2	10.36 ± 0.75%	6.68 ± 1.04%	10.63 ± 0.72%
Bcl-XL	9.28 ± 0.73%	5.7 ± 0.86%	9.28 ± 0.73%

Dati ottenuti dall'animale dell'età di 9 mesi			
	Acro	Wild Type	AcroPeg
Mitochondrial-cyt-c	4.30 ± 0.74 %	15.3 ± 0.74 %	3.18 ± 0.71 %
Cytosolic cyt-c	11.12 ± 0.86 %	5.75 ± 0.79 %	10.92 ± 0.87 %
Caspase 9	12.10 ± 0.71 %	8.90 ± 0.98 %	12.60 ± 0.78 %
Caspase 3	14.50 ± 0.71 %	8.50 ± 0.75 %	14.20 ± 0.71 %
Apaf-1	12.70 ± 0.86 %	8.90 ± 0.98 %	12.10 ± 0.71 %
P38	25.35 ± 0.72 %	25.59 ± 0.82 %	24.9 ± 0.95 %
P53	10.2 ± 0.72 %	5.3 ± 0.73 %	10.90 ± 0.80 %
ERK 1/2	12.70 ± 0.86 %	7.26 ± 0.73 %	11.97 ± 0.82 %
MEK1	13.40 ± 0.72 %	8.20 ± 0.72 %	14.00 ± 0.86 %
P90RSK	7.75 ± 0.73 %	4.43 ± 0.77 %	8.10 ± 0.71 %
p110α	8.00 ± 0.79 %	12.40 ± 0.76 %	7.90 ± 0.95 %
P110γ	9.70 ± 0.72 %	2.20 ± 0.72 %	2.50 ± 0.79 %
Akt	5.9 ± 0.79 %	8.16 ± 0.71 %	8.64 ± 0.83 %
Bad	11.5 ± 0.73 %	5.82 ± 0.82 %	12.5 ± 0.79 %
Bax	2.9 ± 0.78 %	8.44 ± 0.77 %	8.9 ± 0.98 %
Bcl-2	12.5 ± 0.72 %	3.6 ± 0.65 %	13.2 ± 0.52 %
Bcl-XL	6,4 3.6 ± 0.81 %	3.73 ± 0.85 %	7.9 3.6 ± 0.94 %

Capitolo quarto

Discussione

DATI DALL'IMAGING UMANO

Il nostro studio è il primo ad aver utilizzato la risonanza magnetica cardiaca nella valutazione delle alterazioni morfo-funzionali del paziente acromegalico. L'adeguatezza dell'impiego di questa metodica deriva dalla sua alta sensibilità nell'identificazione dell'ipertrofia cardiaca e, previa somministrazione di gadolinio, delle aree di fibrosi nello spessore delle pareti miocardiche.

Queste lesioni sono difatti le più caratteristiche all'esame autoptico del paziente acromegalico con una prevalenza rispettivamente del 91% per l'ipertrofia e del 50% per la fibrosi [37-40].

Ciononostante la valutazione cardiologica del paziente acromegalico è attualmente demandata unicamente all'esame ecocardiografico tradizionale che, sebbene fornisca numerose ed importanti informazioni, non è in grado di valutare la presenza di aree di fibrosi o di un generico aumento della componente collagenica del miocardio.

Anche per quanto riguarda il riconoscimento dell'ipertrofia ventricolare la valutazione ultrasonora non presenta un grado di sensibilità molto elevato, riconoscendo l'ipertrofia ventricolare mediamente nel 50% dei pazienti [24-27, 29-36].

La discordanza tra la prevalenza autoptica e quella ecografica dell'ipertrofia ventricolare non è priva di significato data l'importanza del rapido riconoscimento della cardiomiopatia acromegalica.

Tale importanza si verifica sia nella possibilità di utilizzare l'ipertrofia cardiaca come indice di attività dell'acromegalia sia nella dimostrazione della reversibilità del quadro morfo-funzionale qualora questo venga riconosciuto nelle sue fasi iniziali e si raggiunga un efficace controllo clinico-biochimico della secrezione del GH [49-64].

I dati ecografici ottenuti nel nostro studio confermano la limitata sensibilità dell'ecocardiografia nel riconoscere l'ipertrofia ventricolare sinistra evidenziando, nella popolazione in esame, valori patologici di LVMi unicamente nel 36% dei pazienti (5 soggetti). Questo dato è inferiore rispetto a quello riportato mediamente dalla letteratura probabilmente in virtù delle limitate dimensioni del campione studiato.

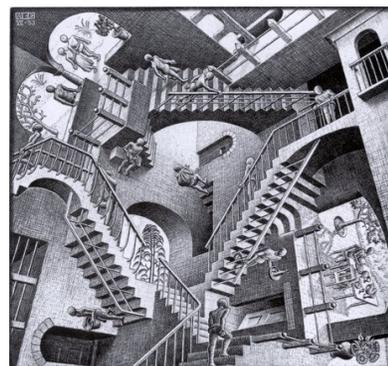


Figura 4.1 Relatività Maurits
Cornelis Escher. Litografia (1953)

Al contrario, il numero dei soggetti che nel nostro studio presentano alterazioni nella funzione diastolica (29%) concorda con il dato della letteratura.

La valutazione morfologica conferma l'alta sensibilità della risonanza magnetica cardiaca, evidenziando valori di LVMi nel range ipertrofico in 10 dei 14 soggetti valutati (72%) un valore paragonabile a quello ottenuto dalle serie autoptiche.

Inoltre, se si confrontano le valutazioni eco e CMR nel singolo paziente, si ricava che la risonanza magnetica è stata in grado di riconoscere un quadro patologico in tutti i pazienti precedentemente identificati dall'ecocardiografia.

Un ulteriore elemento di interesse è rappresentato dalla possibilità di valutare con la risonanza magnetica le sezioni destre del cuore. Queste infatti, a causa delle difficoltà nella loro valutazione ecografica, sono state esaminate solo in un numero molto limitato di studi con risultati divergenti circa il loro interessamento nella cardiomiopatia acromegalica [18].

Nei soggetti arruolati nel nostro studio la determinazione dell'indice di massa ventricolare destra non ha evidenziato in nessun paziente quadri compatibili con un'ipertrofia ventricolare destra. Tuttavia questo dato non può essere considerato conclusivo, data la difficoltà a valutare tale parametro anche con una metodica sensibile quale la CMR.

Inoltre sia utilizzando i valori di LVMi ecografici che della CMR è stato provato a valutare se vi fossero delle differenze correlabili alla presenza o assenza di ipertensione arteriosa o legate alla durata di malattia (breve o lunga) senza riuscire a riconoscere differenze statisticamente significative probabilmente in virtù delle limitate dimensioni del campione.

Parimenti è stato valutato se vi fossero delle correlazioni tra i valori ecografici e CMR del LVMi del singolo paziente e i valori sierici di IGF-I o agli anni di esposizione all'eccesso di GH. Anche in questo caso non è stata raggiunta la significatività statistica.

Le motivazioni alla base della minor sensibilità dell'ecocardiografia nel riconoscere l'ipertrofia ventricolare sono numerose.

Certamente un ruolo importante è svolto dall'abilità e dall'esperienza dell'ecografista, così come dalla bontà della finestra acustica dell'esame ecocardiografico.

Inoltre va ricordato come l'esame ecocardiografico presenti delle limitazioni "intrinseche" legate, ad esempio, alla difficoltà nella valutazione della parete anterolaterale e dell'apice cardiaco.

Un terzo ed importante elemento è rappresentato, a mio avviso, dalla profonda diversità concettuale nelle approssimazioni matematiche utilizzate per la determinazione eco e CMR della massa ventricolare.

Difatti, ecograficamente la massa ventricolare sinistra viene calcolata paragonando il ventricolo ad un modello geometrico attraverso specifiche formule come quella di Devereux

e la convenzione del cubo di Penn (utilizzata nel nostro studio), trattando come variabili gli spessori delle pareti misurati durante la valutazione monodimensionale. Al contrario, la risonanza magnetica cardiaca si avvale della regola di Cavalieri-Simpson che permette di valutare il volume di un oggetto complesso come l'integrale delle aree delle varie sezioni tomografiche [140].

Sebbene il nostro studio dimostri l'alta sensibilità della risonanza magnetica cardiaca nella valutazione del quadro morfologico della cardiomiopatia acromegalica il dato sicuramente più interessante è, a mio avviso, ricavato dalla valutazione del *delayed contrast enhancement* dopo somministrazione di gadolinio.

Difatti questa metodica rappresenta il *gold standard* per il riconoscimento delle aree di tessuto fibrotico nello spessore delle pareti miocardiche [141-143].

I meccanismi che determinano i fenomeni di *delayed iperenhancement* non sono ancora compresi in maniera esaustiva. L'ipotesi accettata dalla maggior parte degli autori è che questi siano dovuti all'alterazione della capacità del mezzo di contrasto di penetrare nelle aree con elevato contenuto di tessuto collagene. Quest'alterazione nella cinetica della diffusione sarebbe quindi responsabile del ritardo sia nell'accumulo sia nel *wash-out* del mezzo di contrasto.

Nei soggetti esaminati nel nostro studio sia la valutazione qualitativa operatore-dipendente sia quella automatizzata semiquantitativa del *delayed enhancement* non hanno evidenziato quadri compatibili con la presenza di aree di fibrosi evidente, sebbene in un singolo caso possa esser ipotizzato un modesto aumento del contenuto di collagene a causa dell'osservazione di fenomeni di *mild contrast enhancement* alla valutazione automatizzata.

La spiegazione del mancato riscontro di tessuto fibroso nei nostri pazienti potrebbe ipoteticamente derivare anche dalla selezione di individui in cui la breve esposizione agli eccessivi livelli di GH non abbia determinato ancora una lesione evidenziabile alla CMR con mdc. Tuttavia, se si valuta la distribuzione della durata stimata della malattia nella nostra popolazione, questa ipotesi cade in virtù dell'ampia variabilità di questo parametro nei pazienti arruolati nello studio (range compreso tra i 2 e i 20 anni, valore medio di circa 7 anni).

Pertanto il nostro dato conferma l'ipotesi che il GH non abbia un ruolo promuovente la deposizione di tessuto collagene nell'ambito dell'interstizio miocardico e che quindi la fibrosi cardiaca non sia un determinante caratteristico delle alterazioni nel riempimento diastolico osservate nel paziente acromegalico.

Inoltre il nostro dato è concorde sia con quello emerso dalla revisione critica dei primi studi autoptici sia con l'evidenza clinica della reversibilità della cardiomiopatia acromegalica a seguito del raggiungimento del controllo di malattia.

Vorrei tuttavia sottolineare come la mancata visualizzazione di aree di fibrosi miocardica alla risonanza magnetica osservata nei nostri pazienti non indica con certezza che non vi sia un aumento, anche limitato e bilanciato, nel contenuto collagenico.

Un simile quadro è stato osservato, ad esempio, nel cuore dell'atleta dove varie metodiche ecografiche quali la video densitometria e il *backscatter* hanno evidenziato una crescita bilanciata sia della componente cardiomiocitaria sia di quella collagenica [144].

Questo dato è interessante a mio avviso in quanto si ritiene che in questi soggetti, similmente a quanto avviene nel paziente acromegalico a causa del GH, l'esercizio estremo porti a delle alterazioni morfo-funzionali legate all'eccessiva attivazione di una via fisiologica che conduce all'ipertrofia cardiomiocitaria.

Un secondo elemento che suggerisce, seppur con le dovute precauzioni, un parallelismo tra le due condizioni è rappresentato dalla reversibilità delle alterazioni morfo-funzionali del cuore acromegalico a seguito dell'interruzione dell'esercizio estremo.

A conferma della mia ipotesi di un aumento bilanciato della componente cardiomiocitaria e collagenica vi sono anche alcune evidenze sperimentali.

Ad esempio, nel topo la somministrazione cronica di GH si è dimostrata esser in grado di portare ad un aumento complessivo del contenuto miocardico di collagene senza tuttavia evidenziare una maggior concentrazione di queste sostanze od una variazione nelle percentuali delle diverse isoforme di collagene [145].

Inoltre questa mia ipotesi potrebbe contribuire a spiegare la discordanza tra le due metodiche di valutazione qualitativa della composizione tissutale utilizzate nel nostro protocollo (*delayed contrast enhancement* con la risonanza magnetica e *backscatter* ecografico). Infatti, nella nostra popolazione l'analisi *backscatter* ha rilevato un quadro di aumentata riflettività in 6 soggetti suggerendo quindi un aumento nel contenuto collagenico.

Va tuttavia ricordato che l'aumento di tessuto collagene non è l'unica anomalia ultrastrutturale in grado di giustificare un alterato segnale ecocardiografico in retrodiffusione. Infatti, un'alterazione nell'IBS può derivare anche da un aumento nel numero delle miofibrille, da un aumento della matrice extracellulare non collagenica [146] o da una condizione di edema tissutale [100,101].

Nel paziente acromegalico questi determinanti, solitamente secondari, possono essere importanti in quanto vi sono evidenze sperimentali, presentate nel primo capitolo, che ne suggeriscono un ruolo nella fisiopatologia della cardiomiopatia acromegalica.

Inoltre, l'importanza di queste è confermata anche da un precedente studio eseguito dal nostro Dipartimento, nel quale è stata valutata la variazione nel parametro IBSpwi nel paziente acromegalico prima e dopo 6 mesi di terapia con analoghi della somatostatina [147]. Nei pazienti in cui si raggiungeva il controllo biochimico della malattia si assisteva, infatti, ad una parallela riduzione nel valore dell'IBSpwi di circa 10% (53.7 +/- 5.3% vs. 43.7 +/- 4.2%, $P < 0.002$ vs. baseline).

Pertanto i risultati di questo studio suggeriscono che, almeno in parte le alterazioni osservate nel paziente acromegaliche possano esser dovute ad alterazioni reversibili quali sono le ultime tre proposte.

DATI DAL MODELLO MURINO

L'ipotesi che il GH possa esercitare un'azione promuovente l'apoptosi cardiomiocitaria è stata inizialmente avanzata da Frustaci *et al.* sulla base di uno studio compiuto su campioni endobiopici prelevati da pazienti acromegalici con insufficienza cardiaca [41].

Nonostante il grande clamore che ha seguito tale studio, negli ultimi anni si sono accumulate sempre più evidenze che ne pongono fortemente in dubbio la correttezza.

In particolare, è possibile trovare in letteratura consistenti osservazioni che indicano che sia il GH che l'IGF-I possono esercitare un'azione di modulazione negativa dei fenomeni di morte cellulare programmata [108-114].

I dati preliminari del nostro studio su colture cellulari di cardiomioblasti (H9c2) sono coerenti con la teoria emersa in letteratura di un'azione antiapoptotica del GH.

Difatti nelle colture cellulari esposte al GH (5 nM) è stato possibile osservare una riduzione del numero di cellule apoptotiche rispetto sia alle colture H9c2 di controllo che alle colture esposte contemporaneamente al GH e al suo antagonista recettoriale.

Inoltre, i saggi *in vitro* finalizzati al riconoscimento delle vie di trasduzione del segnale attivate dal GH, hanno evidenziato che la contemporanea somministrazione di GH e degli inibitori specifici della via di p38MAPK (SB) e di p44/42MAPK (PD) determina un aumento del tasso di apoptosi rispetto a quanto osservabile nelle colture esposte unicamente al GH.

Al contrario, nelle colture preincubate con l'inibitore specifico della via di PI3-K (Ly) non è stato possibile osservare una variazione significativa rispetto alle colture cellulari esposte unicamente al GH.

Questi dati suggeriscono quindi che, almeno per quanto riguarda la modulazione dell'apoptosi, le azioni del GH siano mediate dall'attivazione delle vie di trasduzione di p38MAPK e di p44/42 MAPK.

La misurazione del tasso di apoptosi sul modello murino bGH-MT è stato effettuata con metodiche istochimiche (TUNEL e Annessina V) come descritto in precedenza.

Sono stati valutati tre gruppi di topi: (i) topi *Wild Type*; (ii) topi bGH-MT (Acro); topi bGH-MT trattati per 15 giorni con pegvisomant (AcroPeg). Ciascun gruppo è stato valutato all'età di 3 e 9 mesi.

Nel sottogruppo dei topi *wild Type* non è stato possibile evidenziare una differenza statisticamente significativa tra il tasso di apoptosi osservato nei topi dei due gruppi di età.

La stessa determinazione, effettuata nei gruppi di topi bGH-MT, ha evidenziato un andamento bifasico. Infatti, nel gruppo di topi di 3 mesi il tasso di apoptosi è risultato esser statisticamente diminuito rispetto a quanto osservato nel topo *Wild Type* mentre nel topo anziano è stato osservato un aumento significativo nel tasso di apoptosi rispetto al gruppo di controllo di pari età.

La specificità delle azioni del GH è stata indagata attraverso la somministrazione dell'antagonista recettoriale del GH. Le osservazioni effettuate nel gruppo di topi AcroPeg suggeriscono che il tasso di apoptosi cardiomiocitaria sia influenzato dal GH unicamente nel topo giovane, come testimoniato dalla reversibilità dell'effetto protettivo GH-mediato.

Al contrario, l'aumentato tasso di apoptosi osservato nel topo anziano bGH-MT non appare esser influenzato in maniera significativa dalla somministrazione del pegvisomant suggerendo quindi una GH "indipendenza" dei fenomeni di morte cardiomiocitaria programmata in questo gruppo di animali.

L'analisi dell'espressione proteica attraverso il *Western Blot* conferma in linea generale quanto osservato dalla valutazione istochimica.

Infatti, nel topo bGH-MT di 3 mesi è stata evidenziata una riduzione nell'espressione di tutte le proteine coinvolte nell'attivazione della via mitocondriale dell'apoptosi rispetto a quanto osservato nel gruppo di controllo.

In particolare nel nostro studio è stata evidenziata una riduzione nell'espressione delle caspasi 9 e 3, di Apaf-1, di p53, dell'espressione citosolica del citocromo-C e delle due proteine della famiglia delle bcl-2 (Bax e Bad) che stimolano l'attivazione del rilascio mitocondriale di citocromo-C. Inoltre in questo gruppo è stato possibile evidenziare un aumento delle proteine ad azione antiapoptotica bcl-2 e bcl-XL e nell'espressione mitocondriale del Citocromo-C.

La determinazione dell'espressione delle molecole coinvolte nelle tre vie di trasduzione del segnale conferma il mancato coinvolgimento della via della PI3K nella modulazione del tasso di apoptosi come testimoniato dall'assenza di differenze statisticamente significative tra il

gruppo *wt* e quello dei topi Acro per quanto riguarda l'espressione di Akt e delle due sub unità di p110 esaminate nel nostro studio.

Inoltre lo studio *Western Blot* delle vie di p38MAPK (p38) e p44/42MAPK (ERK1/2, MEK1/2, p90RSK) rivela il coinvolgimento di queste vie nella riduzione del tasso di apoptosi osservato nel topo bGH-MT.

Tuttavia, a differenza di quanto osservato negli studi preliminari *in vitro*, nel modello murino queste vie esercitano un'azione di stimolo dei processi apoptotici come suggerito dalla riduzione di p38, ERK1/1 e p90RSK nel gruppo dei topi bGH-MT rispetto a quanto osservato nel gruppo di controllo.

La valutazione degli effetti della somministrazione del pegvisomant sull'espressione proteica nel gruppo dei topi di 3 mesi conferma quanto osservato alla valutazione istochimica con il riscontro di valori sovrapponibili tra il gruppo AcroPeg e quello dei topi *wt*. Inoltre l'azione dell'antagonista recettoriale del GH si è dimostrata evidenziare un'alterazione a carico sia delle proteine coinvolte nella cascata apoptotica sia di quelle implicate nella trasduzione del segnale.

Il quadro discordante tra i dati *in vitro* e quelli ottenuti dalla determinazione dell'espressione proteica di p38 e p44/42 trova conferma in letteratura in quanto per entrambe le vie sono state riportate azioni sia favorevoli che inibenti i processi di apoptosi a livello cardiomiocitario [120].

Un maggior grado di comprensione non è di facile conseguimento data la pluralità di afferenze che convergono su queste vie di trasduzione.

Un primo elemento che dovrebbe essere valutato più accuratamente è rappresentato dal coinvolgimento delle diverse sub unità di queste macromolecole. Infatti è noto, ad esempio, che la proteina p38 presenta almeno diverse sub unità la cui espressione è regolata geneticamente e che sono in grado di agire su substrati differenti e con differente affinità [148].

Un secondo elemento che dovrebbe essere, a mio avviso, valutato è rappresentato dalla determinazione del grado di fosforilazione di queste proteine dal momento che, come è noto, l'attivazione di questa classe di molecole avviene attraverso meccanismi di fosforilazione.

Tale determinazione potrebbe essere effettuata attraverso metodica *Western Blot* utilizzando, dopo aver selezionato la banda specifica per la proteina in studio, specifici anticorpi rivolti contro il gruppo fosfato [149].

La valutazione del dato *Western Blot* nel topo bGH-MT anziano è più complessa indicando pertanto la possibilità di una pluralità di segnali pro ed antiapoptotici in questo sottogruppo di animali.

In particolare nel topo Acro si osserva un aumento nella espressione di Apaf-1, delle caspasi 9 e 3 e del rilascio citoplasmatico del citocromo-C confermando pertanto l'attivazione della cascata finale comune dell'apoptosi.

Il quadro che emerge dall'esame delle proteine della famiglia delle Bcl-2 non evidenzia invece una chiara modulazione positiva dell'apoptosi con aumento dell'espressione di Bad, Bcl-2, Bcl-XL e con una riduzione dell'espressione di Bax. L'espressione di Bad, Bcl-XL e Bcl-2 non sembra esser influenzata in maniera statisticamente significativa dalla somministrazione del pegvisomant mentre l'espressione di Bax sembra esser influenzata dal GH.

La valutazione *Western Blot* delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale nel topo bGH-MT sembra evidenziare una perdita della sensibilità al GH della via della p38MAPK e della p44/42MAPK; la via di trasduzione del segnale della PI3K si è dimostrata essere, almeno in parte, regolata dal GH come testimoniato dalla marcata riduzione della espressione della subunità gamma della p110.

Questo quadro di espressione è suggestivo pertanto della contemporanea presenza di stimoli pro e antiapoptotici a carico dei cardiomiociti del topo esposto per lungo periodo a concentrazioni elevate di GH.

Inoltre il mantenimento della GH sensibilità di alcune proteine modulatrici (Bax) potrebbe suggerire che, anche durante questa fase della vita del topo, il GH eserciti un'azione antiapoptotica ma che contestualmente vi siano degli stimoli di diversa natura in grado di portare all'emergere di un fenotipo proapoptotico che supera l'azione del GH.

Una simile ipotesi trova conferma in letteratura dalla dimostrazione che la somministrazione di GH non sia in grado di condurre ad una riduzione del tasso di apoptosi nei modelli sperimentali di cardiomiopatia dilatativa [151].

Per verificare ulteriormente l'efficacia dell'azione antiapoptotica del GH abbiamo esposto un gruppo di topi bGH-MT e uno di topi Wt dell'età di 3 mesi a dosi progressivamente crescenti di adriamicina. La valutazione del tasso di apoptosi in questi gruppi ha confermato la capacità del GH nel ridurre i fenomeni di apoptosi nei topi bGH-MT sottoposti a basse (riduzione del 50%) o moderate (riduzione del 35%) concentrazioni di adriamicina. Tuttavia, se sottoposti ad alte dosi dell'agente cardiotossico, l'azione protettiva del GH sembra venir meno come testimoniato dall'assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi sottoposti all'antraciclina.

Il dato ottenuto sull'efficacia del GH nell'inibire l'apoptosi causata dall'adriamicina è, a mio avviso, significativo anche in virtù del fatto che la via che più spesso è ritenuta esser responsabile della tossicità cardiaca delle antracicline è rappresentata dalla via di p38MAPK [120, 134,135].

Questo dato è infatti concorde con quanto ottenuto dalla determinazione *Western Blot* nel topo bGH-MT giovane nel quale l'azione antiapoptotica del GH sembra esplicarsi attraverso una ridotta espressione di p38.

Riassumendo si può quindi affermare che i dati emersi da questo studio suggeriscono che il GH possa esercitare, almeno nel modello murino, un'azione antiapoptotica sui cardiomiociti. Tale azione si esplica attraverso un aumento delle concentrazioni cellulari di proteine coinvolte nella modulazione negativa dell'apoptosi ed una parallela riduzione di quelle ad azione proapoptotica come suggerito: (i) dagli studi preliminari sulle colture cellulari, (ii) dall'analisi del miocardio del topo giovane e (iii) dalla riduzione della cardiotossicità da adriamicina nei topi esposti ad elevate concentrazioni di GH.

Più controverso è il dato emerso nel topo anziano dove l'aumento del tasso di apoptosi non appare direttamente correlato ad un'azione del GH. Questa affermazione è suffragata sia dalla valutazione all'istochimica sia da quella *Western Blot*. Inoltre, il quadro non univoco emerso dalla valutazione delle proteine ad azione modulatore può rappresentare un indizio della contemporanea presenza di stimoli pro o antiapoptotici a carico dei cardiomiociti del topo esposto per un lungo periodo ad elevate concentrazioni di GH.

La natura degli stimoli in grado di attivare il processo apoptotico a livello cardiaco è varia e l'emergere di uno o più di questi processi (alcuni dei quali, come la deformazione meccanica ed il sovraccarico emodinamico possono esser osservati nel cuore acromegalico) potrebbe rendere conto dell'aumento nel tasso di apoptosi osservato nel topo anziano bGH-MT. E' da sottolineare tuttavia come anche una reazione adattativa e fisiologica, quale è la risposta iniziale miocardica al GH, possa condurre, qualora lo stimolo permanga per un intervallo di tempo non fisiologico, all'insorgenza di quadri di rimodellamento miocardico mal adattativo e quindi ad una progressiva perdita di cardiomiociti non più direttamente correlata allo stimolo iniziale e, pertanto, non più sensibile alla correzione dello squilibrio iniziale [150].

In conclusione vorrei ricordare che sebbene vi siano forti evidenze sperimentali di un ruolo diretto del GH nella modulazione negativa del processo apoptotico il nostro studio sul modello murino non permette di escludere il possibile coinvolgimento di IGF-I nel controllo dei fenomeni di morte cellulare programmata.

Conclusioni

La cardiomiopatia acromegalica rappresenta un'importante complicanza della malattia acromegalica che contribuisce in maniera significativa all'aumento della morbilità e della mortalità legata a tale disfunzione morfo-funzionale.

Caratteristica fondamentale di questa patologia è l'ipertrofia ventricolare concentrica (91% dei casi all'esame autoptico) che può accompagnarsi a delle alterazioni nel riempimento diastolico giungendo, qualora la malattia non venga riconosciuta, a quadri di insufficienza cardiaca sisto-diastolica conclamata.

L'introduzione di terapie efficaci nel controllare l'abnorme secrezione di GH che caratterizza l'acromegalia ha portato ad una profonda modificazione della storia naturale della malattia dimostrando che, almeno nelle prime fasi e nel paziente più giovane, sia possibile giungere ad una *restitutio ad integrum* delle alterazioni morfo-funzionali della cardiomiopatia acromegalica.

Tale concetto sottolinea quindi chiaramente il motivo per cui è auspicabile porre diagnosi di malattia acromegalica durante le sue prime fasi e, *ceterum sensu*, suggerisce l'importanza di un'accurata valutazione cardiaca clinico-strumentale nell'inquadramento clinico-patologico del soggetto acromegalico.

Difatti, il riconoscimento di una compromissione morfo-funzionale a carico del tessuto miocardico può esser oramai considerato, a mio avviso, un indice periferico di attività di malattia e pertanto può contribuire nell'indirizzare il medico verso la scelta del più corretto *iter* terapeutico.

L'attuale valutazione cardiaca del paziente acromegalico si basa sull'esame ecocardiografico che permette di riconoscere quadri di ipertrofia ventricolare in circa il 50% dei soggetti.

Al momento attuale la metodica di *imaging* cardiaco dotata della maggior sensibilità nel riconoscimento dell'ipertrofia cardiaca è rappresentata dalla risonanza magnetica cardiaca.

Il nostro studio conferma l'alta sensibilità di quest'ultimo esame. Infatti, la risonanza magnetica cardiaca ha riconosciuto quadri di ipertrofia ventricolare in una percentuale sensibilmente maggiore (72%) di acromegalici di nuova diagnosi rispetto a quanto emerso dal tradizionale studio ecocardiografico (36%).

Inoltre la risonanza magnetica cardiaca permette, attraverso la metodica del *delayed contrast enhancement* dopo somministrazione di mezzo di contrasto, una valutazione quali-quantitativa della composizione strutturale miocardica e rappresenta attualmente il *gold standard* per il riconoscimento delle aree di evoluzione fibrotica nello spessore del miocardio.

Studi autoptici hanno infatti suggerito l'importanza della deposizione di fibre collagene e dei processi di fibrosi interstiziale nella genesi delle alterazioni funzionali della cardiomiopatia acromegalica. Tuttavia vari indizi clinici e sperimentali hanno portato a mettere in discussione questa ipotesi.

I risultati della nostra valutazione contribuisce sicuramente a ridimensionare tale teoria. Infatti, nei pazienti da noi esaminati non è stato possibile riconoscere aree di *delayed hyperenhancement* ed è stato osservato in un solo caso la presenza di un moderato *enhancement*.

Sebbene questi dati suggeriscano che la risonanza magnetica cardiaca sia in grado di fornire più informazioni rispetto al tradizionale esame ecocardiografico, la scarsa disponibilità dei macchinari e l'alto costo economico della CMR la rendono, al momento attuale, una metodica di seconda istanza utilizzabile solo in pazienti con quadri conclamati o per scopi di ricerca.

Al riguardo vorrei sottolineare come contestualmente all'esecuzione della nostra determinazione è stata programmata anche una seconda valutazione in CMR di questi soggetti a distanza di un anno dall'inizio della terapia dell'acromegalia. Questa, qualora evidenziasse la reversibilità delle alterazioni morfologiche osservate inizialmente potrebbe rappresentare un importante indizio a favore sia dell'efficacia e della importanza della terapia, sia della scarsa importanza dei fenomeni di fibrosi cardiaca.

Un altro dato interessante che è emerso dalla valutazione *imaging* di questi soggetti deriva la valutazione ecografica in retrodiffusione (*backscatter*). Infatti questa metodica si è dimostrata, seppur non in maniera statisticamente significativa, in grado di riconoscere quadri alterati nel nostro gruppo di soggetti acromegalici. Per questo motivo, dato anche il limitato costo, tale metodica potrebbe esser inserita nel normale protocollo di valutazione iniziale della cardiomiopatia acromegalica.

Anche gli studi effettuati in vitro e sul modello sperimentale supportano il concetto dell'importanza di un precoce riconoscimento e di un'efficace terapia della cardiomiopatia acromegalica. Infatti, sebbene i risultati della nostra indagine escludano un diretto ruolo del GH nella promozione dell'apoptosi cardiomiocitaria, il dato che emerge dai gruppi Acro e AcroPeg anziani indica comunque che la stimolazione prolungata da parte del GH si può accompagnare all'insorgenza di fenomeni di sofferenza tissutale e di rimodellamento mal adattativo secondari attivati da meccanismi secondari ma non direttamente correlabili con l'azione del GH a livello miocardico.

I dati emersi dallo studio delle vie di trasduzione del segnale non possono esser considerati conclusivi. In particolar modo deve esser chiarito il reale ruolo delle vie di p38MAPK e di p44/42MAPK nella modulazione GH dipendente dell'apoptosi. Tuttavia, i dati ottenuti dal

nostro studio forniscono uno schema molecolare, seppur generico, delle vie cellulari di trasduzione del segnale attivate dal GH a livello miocardio.

Ulteriori studi sono necessari prima di porre un'ipotesi definitiva circa le vie attivate dal GH nella sua azione di modulazione negativa dell'apoptosi. Questi comprendono a mio avviso, un ampliamento delle proteine studiate al *Western Blot*, lo studio delle diverse sub unità sia di p38 che di p44/42, la valutazione del grado di fosforilazione di tutte queste proteine nonché studi di cinetica enzimatica. Inoltre sarebbe sicuramente interessante la via di trasduzione del segnale di JUN-K [119-120] che è stata spesso associata alle azioni di p38.

Infine, la dimostrazione del coinvolgimento delle vie di p38MAPK, p44/42MAPK e PI3K nella trasduzione del segnale del GH a livello cardiaco apre interessanti prospettive di ricerca sul ruolo del GH e di queste vie nel controllo della proliferazione cellulare e dell'ipertrofia cardiomiocitaria.

Bibliografia

- [1]. Ben-Shlomo A, Melmed S **Acromegaly** *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2008;37: 101-122.
- [2]. Melmed S **Medical progress: Acromegaly** *The New England Journal of Medicine* 2006; 355: 2558-2573.
- [3]. Shlomo Melmed **Acromegaly** *The New England Journal of Medicine* 1990; 322(14): 966-977.
- [4]. Annamaria Colao, Bartolomeo Merola, Diego Ferrone, Gaetano Lombardi **Acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 82: 2777-2781.
- [5]. Sacca L, Cittadini A, Fazio S **Growth hormone and the heart** *Endocrine Reviews* 1994; 15: 555-573.
- [6]. Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G **Growth hormone and the heart** *Clinical Endocrinology* 2001; 54: 137-154.
- [7]. Clayton RN **Cardiovascular Function in Acromegaly** *Endocrine Reviews* 2003; 24: 272-277.
- [8]. Matta MP, Caron P **Acromegalic Cardiomyopathy: A Review of the Literature** *Pituitary* 2003; 6: 203-207.
- [9]. Colao A, Vitale G, Pivonello R, Ciccarelli A, Di Somma C, Lombardi G **The heart: an end-organ of GH action** *European Journal of Endocrinology* 2004; 151 Suppl 1: S93-S101.
- [10]. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Lombardi G **Systemic Complications of Acromegaly: Epidemiology, Pathogenesis, and Management** *Endocrine Reviews* 2004; 25: 102-152.
- [11]. Lombardi G, Galdiero M, Auriemma RS, Pivonello R, Colao A **Acromegaly and the cardiovascular system** *Neuroendocrinology* 2006 ;83: 211-217.
- [12]. Ayuk J, Sheppard MC **Does acromegaly enhance mortality?** *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorder* 2008; 9:L 33-39.
- [13]. Bates AS, Van't Hoff W, Jones JM, Clayton RN **An audit of outcome of treatment in acromegaly** *The Quarterly Journal of Medicine* 1993; 86: 293-299.
- [14]. Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, Romijn JA, Vandenbroucke JP **Mortality in acromegaly: a metaanalysis** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; 93: 61-67.
- [15]. Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD **Factors influencing mortality in acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 667-674.
- [16]. Ayuk J, Clayton RN, Holder G, Sheppard MC, Stewart PM, Bates AS **Growth hormone and pituitary radiotherapy, but not serum insulin-like growth factor-I concentrations, predict excess mortality in patients with acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004;89: 1613-1617.
- [17]. Huchard H. **Anatomie pathologique, lesions et trouble cardiovasculaires de l'acromegalie** *Journal of Practiciens* 1895; 9: 249-250.
- [18]. Fazio S, Cittadini A, Sabatini D, Merola B, Colao AM, Bodi B, Lombardi G, Sacca L **Evidence for biventricular involvement in acromegaly: a Doppler echocardiographic study** *European Heart Journal* 1993; 14: 26-33.
- [19]. Mathews LS, Enberg B, Norstedt G **Regulation of rat growth hormone receptor gene expression** *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 9905-9910.
- [20]. Guse AH, Kiess W, Funk B, Kessler U, Berg I, Gercken G **Identification and characterization of insulin-like growth factor receptors on adult rat cardiac myocytes: linkage to inositol 1,4,5-trisphosphate formation** *Endocrinology* 1992; 130: 145-151.

- [21]. Cittadini A, Strömer H, Katz SE, Clark R, Moses AC, Morgan JP, Douglas PS **Differential cardiac effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the rat. A combined in vivo and in vitro evaluation** *Circulation* 1996; 93: 800-809.
- [22]. Ren J, Samson WK, Sowers JR **Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; 31: 2049-2061.
- [23]. Fu ML, Tornell J, Schultze W, Hoebeke J, Isaksson OG, Sandstedt J, Hjalmarson A **Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone (bGH) gene** *Journal of Internal Medicine* 2000; 247: 546-552.
- [24]. [López-Velasco R, Escobar-Morreale HF, Vega B, Villa E, Sancho JM, Moya-Mur JL, García-Robles R **Cardiac involvement in acromegaly: specific myocardiopathy or consequence of systemic hypertension?** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 1047-1053.
- [25]. Minniti G, jaffrain-Rea ML, Moroni C, Baldelli R, Ferretti E, Cassone R, Gulino A, tamburano G **Echocardiographic evidence for a direct effect of GH/IGF-I hypersecretion on cardiac mass and function in young acromegalics** *Clinical Endocrinology* 1998; 49: 101-106.
- [26]. Colao A, Baldelli R, Marzullo P, Ferretti E, Ferone D, Gargiulo P, Petretta M, Tamburrano G, Lombardi G, Liuzzi A **Systemic hypertension and impaired glucose tolerance are independently correlated to the severity of the acromegalic cardiomyopathy** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 193-199.
- [27]. Fazio S, Cittadini A, Cuocolo A, Merola B, Sabatini D, Colao A, Biondi B, Lombardi G, Saccà L **Impaired cardiac performance is a distinct feature of uncomplicated acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 79: 441-446.
- [28]. Kahaly G, Olshausen KV, Mohr-Kahaly S, Erbel R, Boor S, Beyer J, Meyer J **Arrhythmia profile in acromegaly** *European Heart Journal* 1992; 13: 51-56.
- [29]. Martins JB, Kerber RE, Sherman BM, Marcus ML, Ehrhardt JC **Cardiac function in acromegaly** *Circulation* 1977; 56: 863-869.
- [30]. Mather HM, Boyd MJ, Jenkins JS **Heart size and function in acromegaly** *British Heart Journal* 1979; 41: 697-701.
- [31]. Smallridge RC, Rajfer S, Davia J, Schaaf M **Acromegaly and the heart. An echocardiographic study** *The American Journal of Medicine* 1979; 66: 22-27.
- [32]. Csanády M, Gaspar L, Hgye M, Gruber N **The heart in acromegaly: an echographic study** *International Journal of Cardiology* 1983; 2: 349-357.
- [33]. Morvan D, Komajda M, Grimaldi A, Turpin G, Grosoguet Y **Cardiac hypertrophy and function in asymptomatic acromegaly** *European Heart Journal* 1993; 12:666-672.
- [34]. Savage DD, Henry WL, Eastman RC, Borer JF, Gorden P **Echocardiographic assessment of cardiac anatomy and function in acromegalic patients** *American Journal of Medicine* 1973; 57: 823-829.
- [35]. Hradec J, Marek J, Kral J, Janota T, Poloniecki J, Malik M **Long-term echocardiographic follow-up of acromegalic heart disease** *American Journal of Cardiology* 1993; 72: 205-210.
- [36]. Colao A, Spinelli L, Cuocolo A, Spiezia S, Pivonello R, di Somma C, Bonaduce D, Salvatore M, Lombardi G **Cardiovascular consequences of early-onset growth hormone excess** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87: 3097-3104.
- [37]. Lie JT, Grossman SJ **Pathology of the heart in acromegaly: anatomic findings in 27 autopsied patients** *American Heart Journal* 1980; 100: 41-52.

- [38]. Courville C, Mason VR **The heart in acromegaly** *Archives in Internal Medicine* 1938; 61:704-713.
- [39]. Goldberg MB, Lissner H **Acromegaly: a consideration of its course and treatment. Report of four cases with autopsies** *Journal of Clinical Endocrinology* 1942; 2: 477-50.
- [40]. Hejtmancik MR, Bradfield JY, Herrmann GR **Acromegaly and the heart: a clinical and pathological study** *Annals of Internal Medicine* 1951:34-1445-1446.
- [41]. Frustaci A, Chimenti C, Setoguchi M, Guerra S, Corsello S, Crea S, Leri A, Kajstura J, Anversa P, Maseri A **Cell Death in Acromegalic Cardiomyopathy** *Circulation*. 1999; 99:1426-1434.
- [42]. Colao A, Cuocolo A, Marzullo P, Nicolai E, Ferone D, Della Morte AM, Petretta M, Salvatore M, Lombardi G **Impact of patient's age and disease duration on cardiac performance in acromegaly: a radionuclide angiography study** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 1518-1523.
- [43]. Herrmann BL, Bruch C, Saller B, Bartel T, Ferdin S, Erbel R, Mann K **Acromegaly: evidence for a direct relation between disease activity and cardiac dysfunction in patients without ventricular hypertrophy** *Clinical Endocrinology* 2002; 56: 595-602.
- [44]. Hayward RP, Emanuel RW, Nabarro JD **Acromegalic heart disease: influence of treatment of the acromegaly on the heart** *The Quarterly Journal of Medicine*. 1987; 62: 41-58.
- [45]. Damjanovic SS, Neskovic AN, Petakov MS, Popovic V, Vujisic B, Petrovic M, Nikolic-Djurovic M, Simic M, Pekic S, Marinkovic J **High output heart failure in patients with newly diagnosed acromegaly** *American Journal of Medicine* 2002; 112: 610-616.
- [46]. McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood MC, Brown J, Riggi L, Kang PM, Izumo S **The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway** *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 4782-4793.
- [47]. Ikkos D, Luft R, Sjogren B **Body water and sodium in patients with acromegaly** *The Journal of Clinical Investigation* 1954; 33: 989-994.
- [48]. Dimke H, Flyvbjerg A, Frische S **Acute and chronic effects of growth hormone on renal regulation of electrolyte and water homeostasis** *Growth Hormone & IGF Research* 2007; 17: 353-368.
- [49]. Thuesen L, Christensen SE, Weeke J, Orskov H, Henningsen P **The cardiovascular effects of octreotide treatment in acromegaly: an echocardiographic study** *Clinical Endocrinology* 1989; 30: 619-625.
- [50]. Chanson P, Timsit J, Masquet C, Warnet A, Guillausseau PJ, Birman P, Harris AG, Lubetzki J **Cardiovascular effects of the somatostatin analog octreotide in acromegaly** *Annals of Internal Medicine* 1990; 113: 921-925.
- [51]. Pereira JL, Rodriguez-Puras MJ, Leal-Cerro A, Martinez A, Garcia-Luna PP, Gavilan I, Pumar A, Astorga R **Acromegalic cardiopathy improves after treatment with increasing doses of octreotide** *Journal of Endocrinological Investigation*. 1991; 14: 17-23.
- [52]. Merola B, Cittadini A, Colao A, Ferone D, Fazio S, Sabatini D, Biondi B, Saccà L, Lombardi G **Chronic treatment with the somatostatin analog octreotide improves cardiac abnormalities in acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993; 77: 790-793.
- [53]. Colao A, Cuocolo A, Marzullo P, Nicolai E, Ferone D, Florimonte L, Salvatore M, Lombardi G **Effects of 1-year treatment with octreotide on cardiac performance in patients with acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 17-23.
- [54]. Colao A, Marzullo P, Ferone D, Spinelli L, Cuocolo A, Bonaduce D, Salvatore M, Boerlin V, Lancranjan I, Lombardi G **Cardiovascular effects of depot long-acting somatostatin analog**

- Sandostatin LAR in acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 86: 3132-3140.
- [55]. Hradec J, Kral J, Janota T, Krsek M, Hana V, Marek J, Malik M **Regression of acromegalic left ventricular hypertrophy after lanreotide (a slow-release somatostatin analog)** *American Journal of Cardiology* 1999; 83: 1506-1509.
- [56]. Colao A, Cuocolo A, Marzullo P, Nicolai E, Ferone D, Della Morte AM, Pivonello R, Salvatore M, Lombardi G **In the acromegalic cardiomyopathy reversible? Effect of 5 year normalization of growth hormone and insulin-like growth factor-I levels on cardiac performance** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 1551-1557.
- [57]. Baldwin A, Cundy T, Butler J, Timmis AD **Progression of cardiovascular disease in acromegalic patients treated by external pituitary irradiation** *Acta Endocrinologica* 1985; 108: 26-30.
- [58]. Lim MJ, Barkan AL, Buda AJ **Rapid reduction of left ventricular hypertrophy in acromegaly after suppression of growth hormone hypersecretion** *Annales of Internal Medicine* 1992; 117: 719-726.
- [59]. Tokgözoğlu SL, Erbaş T, Aytemir K, Akalin S, Kes S, Oram E **Effects of octreotide on left ventricular mass in acromegaly** *American Journal of Cardiology* 1994; 74: 1072-1074.
- [60]. Baldelli R, Ferretti E, Jaffrain-Rea ML, Iacobellis G, Minniti G, Caracciolo B, Moroni C, Cassone R, Gulino A, Tamburrano G **Cardiac effects of slow-release lanreotide, a slow-release somatostatin analog, in acromegalic patients** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 527-532.
- [61]. Manelli F, Desenzani P, Boni E, Bugari G, Negrini F, Romanelli G, Grassi V, Giustina A **Cardiovascular effects of a single slow release lanreotide injection in patients with acromegaly and left ventricular hypertrophy** *Pituitary*. 1999; 2: 205-210.
- [62]. Giustina A, Boni E, Romanelli G, Grassi V, Giustina G **Cardiopulmonary performance during exercise in acromegaly, and the effects of acute suppression of growth hormone hypersecretion with octreotide** *American Journal of Cardiology* 1995; 75: 1042-1047.
- [63]. Colao A, Marzullo P, Cuocolo A, Spinelli L, Pivonello R, Bonaduce D, Salvatore M, Lombardi G **Reversal of acromegalic cardiomyopathy in young but not in middle-aged patients after 12 months of treatment with the depot long-acting somatostatin analogue octreotide** *Clinical Endocrinology* 2003; 58: 169-176.
- [64]. Maison P, Tropeano AI, Macquin-Mavier I, Giustina A, Chanson P **Impact of somatostatin analogs on the heart in acromegaly: a metaanalysis.** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 1743-1747.
- [65]. Smith WH, Nair RU, Adamson D, Kearney MT, Ball SG, Balmforth AJ **Somatostatin receptor subtype expression in the human heart: differential expression by myocytes and fibroblasts** *The Journal of Endocrinology* 2005; 187: 379-386.
- [66]. Pivonello R, Galderisi M, Auriemma RS, De Martino MC, Galdiero M, Ciccarelli A, D'Errico A, Kourides I, Burman P, Lombardi G, Colao A **Treatment with growth hormone receptor antagonist in acromegaly: effect on cardiac structure and performance** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 476-482.
- [67]. Hayward RP, Emanuel RW, Nabarro JD **Acromegalic heart disease: influence of treatment of the acromegaly on the heart** *Quarterly Journal of Medicine* 1987; 62: 41-58.

- [68]. Rodrigues EA, Caruana MP, Lahiri A, Nabarro JD, Jacobs HS, Raftery EB **Subclinical cardiac dysfunction in acromegaly: evidence for a specific disease of heart muscle** *British Heart Journal* 1989; 62: 185-194.
- [69]. Lombardi G, Colao A, Marzullo P, Biondi B, Palmieri E, Fazio S; Multicenter Italian Study Group on Lanreotide **Improvement of left ventricular hypertrophy and arrhythmias after lanreotide-induced GH and IGF-I decrease in acromegaly. A prospective multi-center study** *Journal of Endocrinological Investigation* 2002; 25: 971-976.
- [70]. Fatti LM, Scacchi M, Lavezzi E, Pecori Giraldi F, De Martin M, Toja P, Michailidis G, Stramba-Badiale M, Cavagnini F **Effects of treatment with somatostatin analogues on QT interval duration in acromegalic patients** *Clinical Endocrinology* 2006; 65: 626-630.
- [71]. Landmesser U, Drexler H **The clinical significance of endothelial dysfunction** *Current Opinion in Cardiology* 2005; 20: 547-551.
- [72]. Camici PG, Crea F **Coronary microvascular dysfunction** *The New England Journal of Medicine* 2007; 356: 830-840.
- [73]. Thum T, Fleissner F, Klink I, Tsikas D, Jakob M, Bauersachs J, Stichtenoth DO **Growth hormone treatment improves markers of systemic nitric oxide bioavailability via insulin-like growth factor-I** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 4172-4179.
- [74]. Wickman A, Jonsdottir IH, Bergstrom G, Hedin L **GH and IGF-I regulate the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cardiovascular tissues of hypophysectomized female rats** *European Journal of Endocrinology* 2002; 147: 523-33.
- [75]. Li G, Del Rincon JP, Jahn LA, Wu Y, Gaylinn B, Thorner MO, Liu Z **Growth Hormone Exerts Acute Vascular Effects Independent of Systemic or Muscle Insulin-Like Growth Factor I** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; [Epub ahead of print].
- [76]. Chanson P, Megnien JL, del Pino M, Coirault C, Merli I, Houdouin L, Harris AG, Levenson J, Lecarpentier Y, Simon A, Chemla D **Decreased regional blood flow in patients with acromegaly** *Clinical Endocrinology* 1998; 49: 725-731.
- [77]. Maison P, Démolis P, Young J, Schaison G, Giudicelli JF, Chanson P **Vascular reactivity in acromegalic patients: preliminary evidence for regional endothelial dysfunction and increased sympathetic vasoconstriction** *Clinical Endocrinology* 2000; 53: 445-451.
- [78]. Colao A, Spiezia S, Cerbone G, Pivonello R, Marzullo P, Ferone D, Di Somma C, Assanti AP, Lombardi G **Increased arterial intima-media thickness by B-M mode echodoppler ultrasonography in acromegaly** *Clinical Endocrinology* 2001; 54: 515-524.
- [79]. Colao A, Marzullo P, Lombardi G **Effect of a six-month treatment with lanreotide on cardiovascular risk factors and arterial intima-media thickness in patients with acromegaly** *European Journal of Endocrinology* 2002; 146: 303-309.
- [80]. Otsuki M, Kasayama S, Yamamoto H, Saito H, Sumitani S, Kouhara H, Saitoh Y, Ohnishi T, Arita N **Characterization of premature atherosclerosis of carotid arteries in acromegalic patients** *Clinical Endocrinology* 2001; 54: 791-796.
- [81]. Brevetti G, Marzullo P, Silvestro A, Pivonello R, Oliva G, di Somma C, Lombardi G, Colao A **Early vascular alterations in acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 3174-3179.
- [82]. Cannavo S, Almoto B, Cavalli G, Squadrito S, Romanello G, Vigo MT, Fiumara F, Benvenega S, Trimarchi F **Acromegaly and coronary disease: an integrated evaluation of conventional coronary risk factors and coronary calcifications detected by computed tomography** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91: 3766-3772.

- [83]. Bogazzi F, Battolla L, Spinelli C, Rossi G, Gavioli S, Di Bello V, Cosci C, Sardella C, Volterrani D, Talini E, Pepe P, Falaschi F, Mariani G, Martino E **Risk factors for development of coronary heart disease in patients with acromegaly: a five-year prospective study** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 4271-4277.
- [84]. Mulatero P, Veglio F, Maffei P, Bondanelli M, Bovio S, Daffara F, Leotta G, Angeli A, Calvo C, Martini C, degli Uberti EC, Terzolo M **CYP11B2 -344T/C gene polymorphism and blood pressure in patients with acromegaly** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91: 5008-5012.
- [85]. Vitale G, Pivonello R, Auriemma RS, Guerra E, Milone F, Savastano S, Lombardi G, Colao A **Hypertension in acromegaly and in the normal population: prevalence and determinants** *Clinical Endocrinology* 2005;63: 470-476.
- [86]. Bondanelli M, Ambrosio MR, degli Uberti EC **Pathogenesis and prevalence of hypertension in acromegaly** *Pituitary*. 2001; 4: 239-249.
- [87]. Minniti G, Moroni C, Jaffrain-Rea ML, Bondanini F, Gulino A, Cassone R, Tamburrano G **Prevalence of hypertension in acromegalic patients: clinical measurement versus 24-hour ambulatory blood pressure monitoring** *Clinical Endocrinology* 1998; 48: 149-152.
- [88]. Terzolo M, Matrella C, Boccuzzi A, Luceri S, Borriero M, Reimondo G, Pia A, Rovero E, Paccotti P, Angeli A **Twenty-four hour profile of blood pressure in patients with acromegaly. Correlation with demographic, clinical and hormonal features** *Journal of Endocrinological Investigation* 1999; 22: 48-54.
- [89]. Brüel A, Oxlund H **Biosynthetic growth hormone increases the collagen deposition rate in rat aorta and heart** *European Journal of Endocrinology* 1995; 132: 195-199.
- [90]. Khorsandi MJ, Fagin JA, Giannella-Neto D, Forrester JS, Cercek B **Regulation of insulin-like growth factor-I and its receptor in rat aorta after balloon denudation. Evidence for local bioactivity** *Journal of Clinical Investigation* 1992; 90: 1926-1931.
- [91]. Bihan H, Espinosa C, Valdes-Socin H, Salenave S, Young J, Levasseur S, Assayag P, Beckers A, Chanson P **Long-term outcome of patients with acromegaly and congestive heart failure** *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 ; 89: 5308-5313.
- [92]. Gilbert PL, Siegel RJ, Melmed S, Sherman CT, Fishbein MC **Cardiac morphology in rats with growth hormone-producing tumours** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1985; 17: 805-811.
- [93]. Cittadini A, Strömer H, Katz SE, Clark R, Moses AC, Morgan JP, Douglas PS **Differential Cardiac Effects of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor1 in the Rat. A Combined In Vivo and In Vitro Evaluation** *Circulation* 1996; 93: 800-809.
- [94]. Imanishi R, Ashizawa N, Ohtsuru A, Seto S, Akiyama-Uchida Y, Kawano H, Kuroda H, Nakashima M, Saenko VA, Yamashita S, Yano K **GH suppresses TGF- β -mediated fibrosis and retains cardiac diastolic function** *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 218: 137-146.
- [95]. Grimm D, Cameron D, Griese DP, Riegger GA, Kromer EP **Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction** *Cardiovascular Research* 1998; 40: 297-306.
- [96]. Marcu CB, Nijveldt R, Beek AM, Van Rossum AC **Delayed contrast enhancement magnetic resonance imaging for the assessment of cardiac disease** *Heart, Lung & Circulation* 2007; 16: 70-78.
- [97]. Pennell DJ, Sechtem UP, Higgins CB, Manning WJ, Pohost GM, Rademakers FE, van Rossum AC, Shaw LJ, Yucel EK; European Society of cardiology; Society for Cardiovascular Magnetic

- Resonance **Clinical indications for cardiovascular magnetic resonance (CMR): Consensus Panel report** *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2004; 6:727-65.
- [98]. Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M, Casey SA, Panse P, Panse N, Weil J, Zenovich AG, Maron BJ **Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy** *Circulation*. 2005; 112: 855-861.
- [99]. Shan K, Constantine G, Sivananthan M, Flamm SD **Role of cardiac magnetic resonance imaging in the assessment of myocardial viability** *Circulation* 2004; 109: 1328-1334.
- [100]. Yamada S, Komuro K **Integrated backscatter for the assessment of myocardial viability** *Current Opinion in Cardiology* 2006; 21: 433-437.
- [101]. Di Bello V, Giorgi D, Talini E, Dell' Omo G, Palagi C, Romano MF, Pedrinelli R, Mariani M **Incremental value of ultrasonic tissue characterization (backscatter) in the evaluation of left ventricular myocardial structure and mechanics in essential arterial hypertension** *Circulation* 2003; 107: 74-80.
- [102]. Colao A, Martino E, Cappabianca P, Cozzi R, Scanarini M, Ghigo E & participants of the ALICE Study Group **First-line therapy of acromegaly: a statement of the ALICE (Acromegaly primary medical treatment Learning and Improvement with Continuous Medical Education) Study Group** *Journal of Endocrinological Investigation* 2006; 29: 1017-1020.
- [103]. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ; National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart **Association Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines** *Circulation* 2004; 110: 227-239.
- [104]. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography **Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology** *Journal of the American Society of Echocardiography* 2005; 18: 1440-1463.
- [105]. Lombardi M, Bartolozzi C eds **MRI of the Heart and Vessels** *Springer* 2005, New York.
- [106]. Alfakih K, Plein S, Thiele H, Jones T, Ridgway JP, Sivananthan MU **Normal human left and right ventricular dimensions for MRI as assessed by turbo gradient echo and steady-state free precession imaging sequences** *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2003;17: 323-329.
- [107]. Bondarenko O, Beek AM, Hofman MB, Kühl HP, Twisk JW, van Dockum WG, Visser CA, van Rossum AC **Standardizing the definition of hyperenhancement in the quantitative assessment of infarct size and myocardial viability using delayed contrast-enhanced CMR** *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 2005; 7: 481-485.
- [108]. Bogazzi F, Ultimieri F, Raggi F, Russo D, Vanacore R, Guida C, Brogioni S, Cosci C, Gasperi M, Bartalena L, Martino E **Growth hormone inhibits apoptosis in human colonic cancer cell lines: antagonistic effects of peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands** *Endocrinology* 2004; 145: 3353-3362.
- [109]. Gu Y, Zou Y, Aikawa R, Hayashi D, Kudoh S, Yamauchi T, Uozumi H, Zhu W, Kadowaki T, Yazaki Y, Komuro I **Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2001; 223: 35-46.

- [110]. Weigent DA, Arnold RE **Expression of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-1 receptors in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone** *Cell Immunology*.2005;234: 54-66.
- [111]. Segard HB, Moulin S, Boumard S, Augier de Crémiers C, Kelly PA, Finidori J **Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts** *Cell Signaling* 2003; 15: 615-623.
- [112]. Baixeras E, Jeay S, Kelly PA, Postel-Vinay MC **The proliferative and antiapoptotic actions of growth hormone and insulin-like growth factor-1 are mediated through distinct signaling pathways in the Pro-B Ba/F3 cell line** *Endocrinology* 2001; 142: 2968-2977.
- [113]. Jeay S, Sonenshein GE, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Baixeras E **Growth hormone exerts antiapoptotic and proliferative effects through two different pathways involving nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase** *Endocrinology* 2001; 142: 147-156.
- [114]. Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Seàris R, Devesa J, Arce VM **Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of Akt in this pathway** *Endocrinology* 1999; 140: 5937-5943.
- [115]. Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, Chowen JA **Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection** *Endocrinology* 2002; 143: 4113-4122.
- [116]. Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, Kim J, Bae SR, Chang YP **Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain** *Neuroscience Letters* 2004; 354: 64-68.
- [117]. Kusano K, Tsutsumi Y, Dean J, Gavin M, Ma H, Silver M, Thorne T, Zhu Y, Losordo DW, Aikawa R **Long-term stable expression of human growth hormone by rAAV promotes myocardial protection post-myocardial infarction** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2007; 42: 390-399.
- [118]. Condorelli G, Morisco C, Stassi G, Notte A, Farina F, Sgaramella G, de Rienzo A, Roncarati R, Trimarco B, Lembo G **Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat** *Circulation* 1999; 99: 3071-3078.
- [119]. Kang PM, Izumo S **Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases** *Trends in Molecular Medicine* 2003; 9: 177-182.
- [120]. Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA **Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte** *Current Opinion in Pharmacology* 2001; 1: 141-150.
- [121]. Fu ML, Törnell J, Schulze W, Hoebeke J, Isaksson OG, Sandstedt J, Hjalmarson A **Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone (bGH) gene** *Journal of Internal Medicine* 2000; 247: 546-552.
- [122]. Bollano E, Omerovic E, Bohlooly-y M, Kujacic V, Madhu B, Törnell J, Isaksson O, Soussi B, Schulze W, Fu ML, Matejka G, Waagstein F, Isgaard J **Impairment of cardiac function and bioenergetics in adult transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene** *Endocrinology*. 2000; 141: 2229-2235.
- [123]. Bogazzi F, Raggi F, Ultimieri F, Russo D, Manariti A, D'Alessio A, Viacava P, Fanelli G, Gasperi M, Bartalena L, Martino E **Cardiac expression of adenine nucleotide translocase-1 in transgenic mice overexpressing bovine GH** *Journal of Endocrinology* 2007; 194: 521-527.

- [124]. Newton R, Cambridge L, Hart LA, Stevens DA, Lindsay MA, Barnes PJ **The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1beta-dependent PGE(2) release via mechanistically distinct processes** *British Journal of Pharmacology* 2000; 130: 1353-1361
- [125]. Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Ghigliotti G, Barisione C, Manca V, Fabbi P, Ballestrero A, Brunelli C, Barsotti A **Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase** *Cardiovascular Research* 2006; 69: 736-745
- [126]. Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A **Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase** *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 16415-16420.
- [127]. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF **A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)** *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 5241-5248.
- [128]. Simpkin JC, Yellon DM, Davison SM, Lim SY, Wynne AM, Smith CC **Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury** *Basic Research in Cardiology* 2007; 102: 518-528.
- [129]. Ren X, Li Y, Ma X, Zheng L, Xu Y, Wang J **Activation of p38/MEF2C pathway by all-trans retinoic acid in cardiac myoblast** *Life Sciences* 2007; 81: 89-96.
- [130]. Kaufmann SH, Mesner PW Jr, Samejima K, Toné S, Earnshaw WC **Detection of DNA cleavage in apoptotic cells** *Methods in Enzymology* 2000 ;322: 3-15.
- [131]. Palmiter RD, Norstedt G, Gelinas RE, Hammer RE, Brinster RL **Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice** *Science* 1983; 222: 809-814.
- [132]. Gordon JW **Production of transgenic mice** *Methods in Enzymology* 1993 ;225:747-771.
- [133]. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of laboratory animal resources commission on life science. National Academy Press 1996.
- [134]. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L **Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity** *Pharmacological Reviews* 2004; 56: 185-229.
- [135]. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N **Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2000; 207: 77-86.
- [136]. Lund DD, Tomanek RJ, **Myocardial morphology in spontaneously hypersensitive and aortic-constricted rats** *American Journal of Anatomy* 1878; 152: 141-151.
- [137]. Bossy-Wetzel E, Green DR **Detection of apoptosis by annexin V labelling** *Methods in Enzymology* 2000; 322: 15-18.
- [138]. Yan X, Habbersett RC, Yoshida TM, Nolan JP, Jett JH, Marrone BL **Probing the kinetics of SYTOX Orange stain binding to double-stranded DNA with implications for DNA analysis** *Analytical Chemistry* 2005; 77: 3554.
- [139]. Renart J, Sandoval IV **Western blots** *Methods in Enzymology* 1984; 104: 455-460.
- [140]. Germain P, Roul G, Kastler B, Mossard JM, Bareiss P, Sacrez A **Inter-study variability in left ventricular mass measurement. Comparison between M-mode echography and MRI** *European Heart Journal* 1992; 13: 1011-1019.
- [141]. Vohringer M, Mahrholdt H, Yilmaz A, Sechtem U **Significance of late gadolinium enhancement in cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR)** *Herz* 2007; 232: 129-137.

- [142]. Soler R, Rodriguez E, Monserrat L, Mendez C, Martinez C **Magnetic resonance imaging of delayed enhancement in hypertrophic cardiomyopathy: relationship with left perfusion and contractile function** *Journal of Computer Assisted Tomography* 2006; 30: 412–420.
- [143]. Marcu CB, Beek AM, Van Rossum AC **Clinical applications of cardiovascular magnetic resonance imaging** *Canadian Medical Association Journal* 2006; 175: 911–917.
- [144]. Di Bello V, Giorgi D, Talini E, Dell' Omo G, Palagi C, Romano MF, Pedrinelli R, Mariani M **Incremental value of ultrasonic tissue characterization (backscatter) in the evaluation of left ventricular myocardial structure and mechanics in essential arterial hypertension** *Circulation* 2003; 107: 74-80.
- [145]. Brüel A, Oxlund H **The effect of growth hormone on rat myocardial collagen** *Growth Hormone & IGF-I Research* 1999; 9: 123-130.
- [146]. Hall CS, Scott MJ, Lanza GM, Miller JG, Wickline SA **The extracellular matrix is an important source of ultrasound backscatter from myocardium** *The Journal of Acoustical Society of America* 2000; 107: 612-619.
- [147]. Bogazzi F, Di Bello V, Palagi C, Donne MG, Di Cori A, Gavioli S, Talini E, Cosci C, Sardella C, Brogioni S, Mariani M, Martino E **Improvement of intrinsic myocardial contractility and cardiac fibrosis degree in acromegalic patients treated with somatostatin analogues: a prospective study** *Clinical Endocrinology* 2005; 62: 590-596
- [148]. Raman M, Chen W, Cobb MH **Differential regulation and properties of MAPKs** *Oncogene* 2007; 26: 3100-3112.
- [149]. Shaul Y, Seger R **The detection of MAPK signaling** *Current Protocol in Molecular Biology* 2006; Chapter 18: Unit 18.12.
- [150]. Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G **Adaptative and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence** *Cardiovascular Research* 2004; 63: 373-380.
- [151]. Ibe W, Saraste A, Lindemann S, Bruder S, Buerke M, Darius H, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM **Cardiomyocyte apoptosis is related to left ventricular dysfunction and remodelling in dilated cardiomyopathy, but is not affected by growth hormone treatment** *European Journal of Heart Failure* 2007; 9: 160-167.

Ringraziamenti

Anzitutto il mio più profondo ringraziamento va al chiarissimo Professor Enio Martino perché attraverso il quotidiano esempio mi è di sprono nella virtù della pratica medica.

Vorrei porgere quindi un sentito ringraziamento al Professor Fausto Bogazzi per l'amabile cortesia con cui ha assistito alle convulse fasi della stesura di questo scritto e per l'attenzione che dedica alle mie bizzarre ipotesi.

Un ringraziamento anche ai biologi del Nostro Dipartimento, Dania, Federica e Francesco che con pazienza e comprensione mi hanno avvicinato alle metodiche di ricerca.

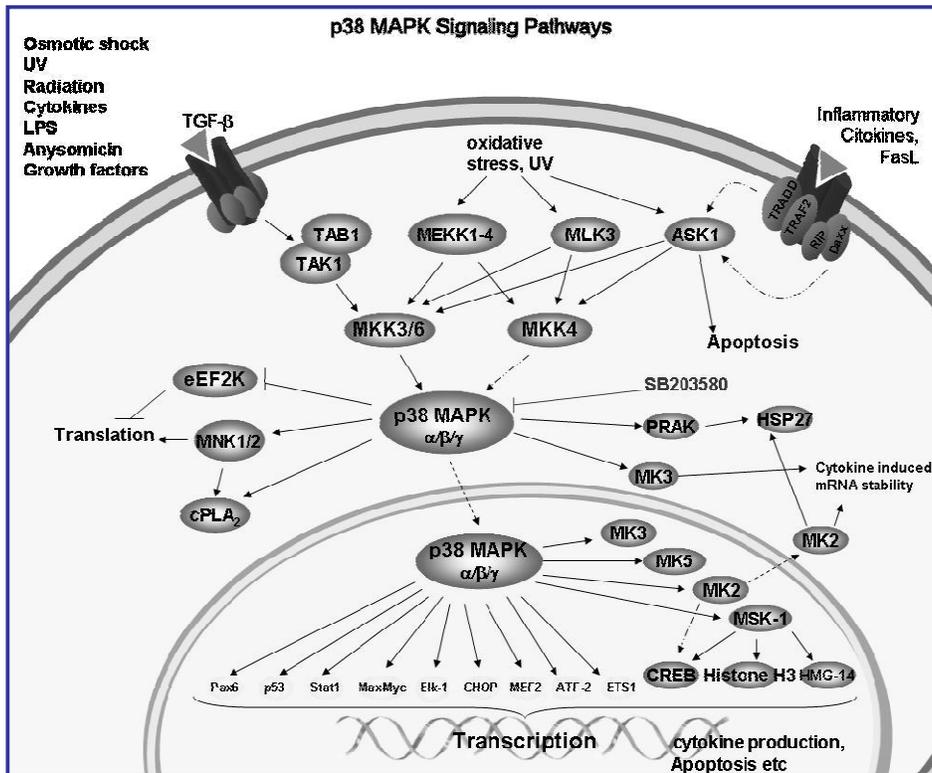
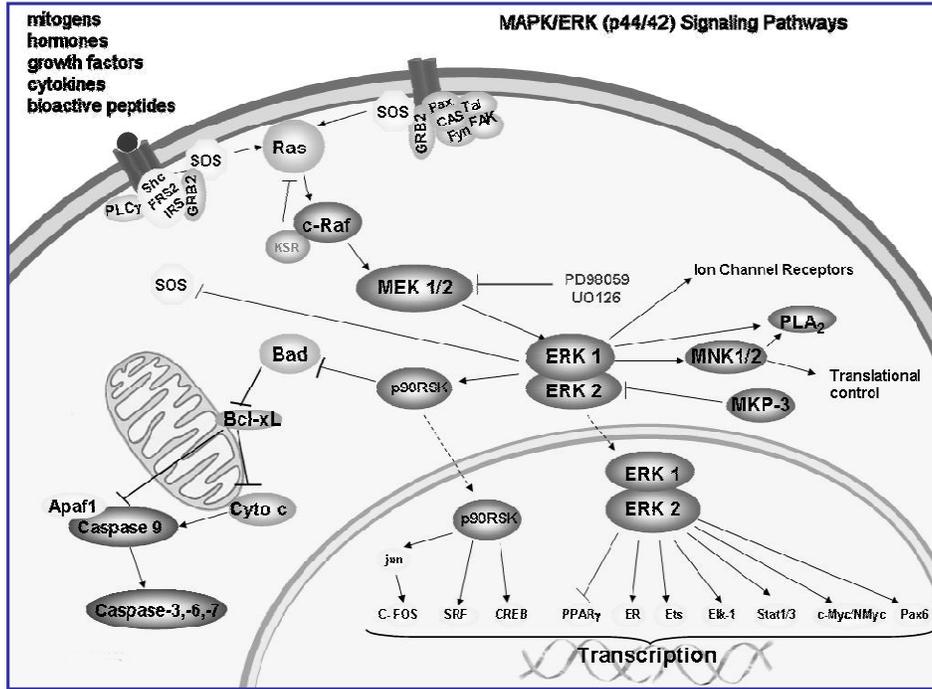
Ringrazio tutti i tutti i medici ed il personale del Dipartimento integrato di Endocrinologia e Metabolismo dell'Università di Pisa per il prezioso aiuto e la pazienza accordatami nel mio processo di avvicinamento alla pratica clinica.

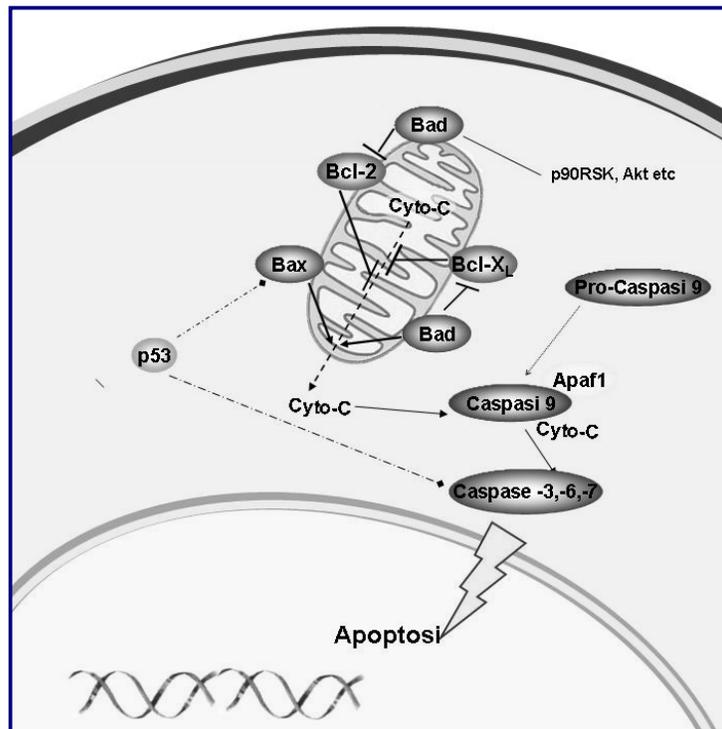
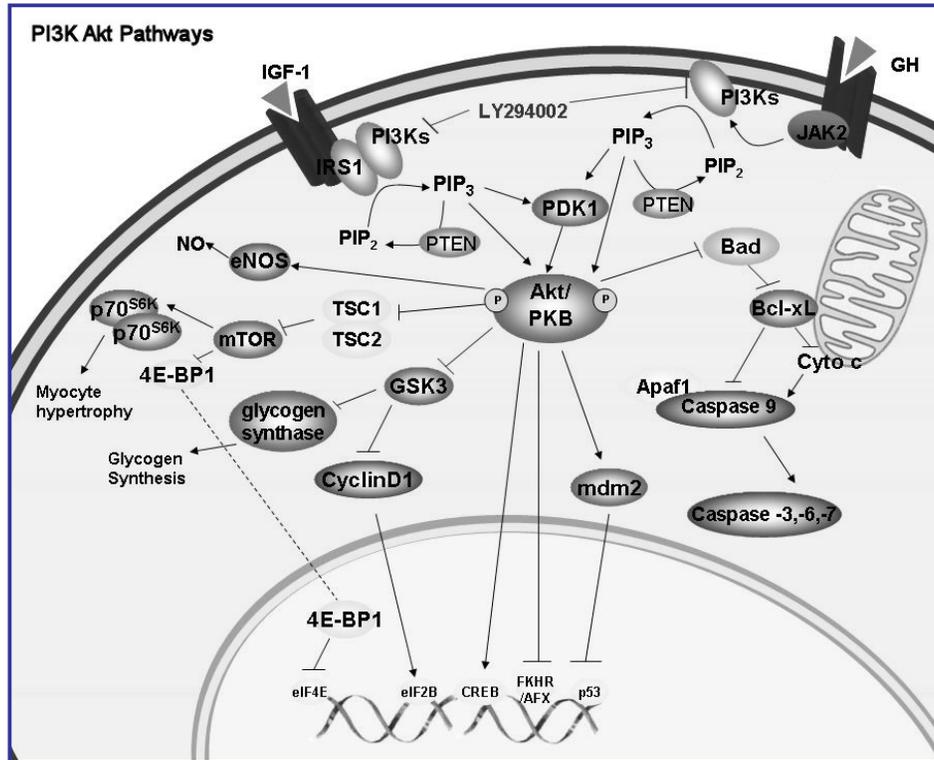
Vorrei infine ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine durante questi miei anni di permanenza alla Scuola. Il vero accrescimento spirituale ed intellettuale non viene dalle Istituzioni quanto dalle persone che le costituiscono e le vivono. Un grazie sincero a tutti voi.

Claudio

Appendice I: Vie di Trasduzione del Segnale

Immagini originali dell'autore







Odilon Redon *Le Cyclope* Museo Kroller-Muller