



Università di PISA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOLOGIA APPLICATA ALLA BIOMEDICINA

*Vecchi e nuovi indici infiammatori nel
monitoraggio dei dispositivi di assistenza
ventricolare in pazienti con scompenso
cardiaco grave*

Candidato:

Rosetta Ragusa

Relatori:

Dott.ssa Daniela Giannessi

Dott.ssa Chiara Caselli

Anno Accademico 2012-2013

<i>RIASSUNTO</i>	1
<i>ABSTRACT</i>	4
<i>INTRODUZIONE</i>	7
1 Le malattie cardiovascolari.....	8
1.1 Epidemiologia.....	8
1.2 Fattori di rischio.....	9
1.3 Il sistema cardiovascolare.....	10
1.4 Classificazione delle malattie cardiovascolari.....	12
1.4.1 Aterosclerosi.....	12
1.4.2 Cardiopatia Ischemica.....	14
1.4.3 Ipertensione arteriosa.....	16
1.4.4 Valvulopatie.....	18
1.4.5 Le cardiomiopatie.....	18
1.5 Lo Scompenso Cardiaco.....	19
1.5.1 Eziologia dello Scompenso Cardiaco.....	21
1.5.2 Classificazione dello Scompenso Cardiaco.....	21
1.5.3 I modelli di Scompenso Cardiaco.....	23
1.5.4 Meccanismi molecolari e Scompenso Cardiaco.....	25
1.5.4.1 Biomarcatori e Scompenso Cardiaco.....	26
1.5.5 Fisiopatologia dello Scompenso Cardiaco.....	27
1.5.5.1 Il Rimodellamento del ventricolo.....	27
1.5.5.2 Sistema neuroormonale e Scompenso Cardiaco.....	29
<i>Sistema adrenergico</i>	29
<i>Sistema Renina Angiotensina Aldosterone</i>	33
<i>Endoteline</i>	37
<i>Peptidi natriuretici</i>	41
1.5.5.3 Rimodellamento cellulare.....	42
<i>Iperplasia e ipertrofia</i>	42
<i>Fibrosi</i>	46
1.5.5.4 Il rimodellamento tissutale.....	47
<i>Matrice extracellulare</i>	47
<i>Metalloproteinasi</i>	47
<i>Inibitori endogeni tissutali (TIMPs)</i>	48

<i>Catepsine</i>	51
1.5.5.5 I processi di morte cellulare	53
<i>Apoptosi</i>	53
<i>Necrosi</i>	58
<i>Autofagia</i>	59
<i>Hsp 70</i>	61
1.5.6 Il Metabolismo Cardiaco	63
1.6 Il ruolo dell'infiammazione nello Scompenso Cardiaco.....	66
1.6.1 Citochine infiammatorie.....	69
1.6.1.1 Le citochine infiammatorie primarie.....	69
<i>Tumor necrosis factor (TNF)</i>	70
<i>Interleuchina (IL)-1</i>	74
<i>Interleuchina (IL)-6</i>	77
1.6.1.2 Chemochine: Interleuchina(IL)-8	78
1.6.1.3 Nuovi indici di flogosi	79
<i>GDF-15</i>	80
<i>Adiponectina</i>	82
<i>Interleuchina (IL)-33 e ST2</i>	85
1.7 Dispositivo di assistenza ventricolare sinistra.....	87
1.7.1 Complicanze dei VAD	89
1.7.1.1 Tipi di dispositivo	90
1.7.1.2 Selezione dei pazienti candidabili al VAD.....	93
1.7.2 Il Rimodellamento Inverso	96
1.7.2.1 Ipertrofia.....	96
1.7.2.2 Apoptosi	98
1.7.2.3 Accoppiamento eccitazione-contrazione	98
1.7.2.4 Proteine del citoscheletro	99
1.7.2.5 Il sistema nervoso simpatico	100
1.7.2.6 La Matrice Extracellulare.....	100
1.7.2.7 L'infiammazione.....	103
<i>Citochine pro-infiammatorie</i>	104
<i>GDF-15</i>	106
SCOPO	108
MATERIALI E METODI.....	111

3	Pazienti e protocollo sperimentale	112
3.1	Campioni biologici	113
3.2	Estrazione dell'RNA totale	114
3.3	Determinazione dell'RNA totale.....	115
3.4	Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA.....	116
3.4.1	Real-time PCR	117
3.4.2	Selezione dei geni di riferimento.....	119
3.4.2.1	Normalizzazione dei dati ottenuti in Real-Time PCR.....	120
3.5	Determinazione dei livelli circolanti di ST2 e IL-33.....	121
3.6	Analisi statistica.....	122
	<i>RISULTATI</i>	123
4	Risultati metodologici.....	124
4.1	Estrazione di RNA totale	124
4.2	Analisi Real-Time PCR: valutazione delle condizioni ottimali di reazione.....	125
4.3	Selezione dei geni di riferimento.....	126
5	Risultati sperimentali	128
5.1	Caratteristiche cliniche dei pazienti.....	128
5.2	Valutazione della condizione infiammatoria.....	131
5.3	Misura dei livelli circolanti di IL-33 e sST2	135
5.4	Relazione con gli indici di prognosi.....	136
	<i>CONCLUSIONI</i>	138
	<i>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</i>	143
	<i>GLOSSARIO</i>	174

RIASSUNTO

Introduzione. Lo scompenso cardiaco (SC) è una sindrome clinica caratterizzata da una graduale perdita di funzione di pompa del cuore e da una serie di eventi progressivi noti complessivamente come rimodellamento cardiaco. Molti studi hanno dimostrato come l'infiammazione giochi un ruolo importante nello sviluppo e progressione dello SC e molte citochine risultano coinvolte nell'attivazione di processi, quali ipertrofia, fibrosi, apoptosi, che si associano ad un cuore scompensato. L'impianto di dispositivi di assistenza ventricolare sinistra (LVAD) in pazienti con SC in fase terminale in attesa di trapianto d'organo induce un miglioramento nel quadro emodinamico del paziente e sembra interferire positivamente con molti processi coinvolti nel rimodellamento cardiaco favorendo il processo di rimodellamento inverso.

Scopo. Scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare l'impatto dell'impianto di LVAD sul processo di flogosi misurando l'espressione sia di indici infiammatori classici sia di nuove vie di segnale. Gli obiettivi specifici sono volti a:

- 1) confrontare il profilo infiammatorio in pazienti con SC sottoposti a impianto di LVAD (gruppo pre-LVAD) con quello di pazienti con SC stabili sottoposti a trapianto di cuore (gruppo HT), considerati come gruppo di controllo;
- 2) valutare l'effetto dell'impianto di LVAD sull'infiammazione, confrontando il gruppo di pazienti pre-LVAD con pazienti studiati al momento della rimozione del dispositivo LVAD (gruppo post-LVAD);
- 3) valutare il possibile ruolo dei vari indici del processo infiammatorio nell'outcome precoce nel gruppo di pazienti pre-LVAD.

Materiali e Metodi. La raccolta dei campioni biologici è stata possibile grazie alla collaborazione con la sede di Milano dell'IFC-CNR e con l'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano. I pazienti arruolati nello studio sono soggetti con SC in fase terminale (classe NYHA III-IV; LVEF%=24±4) suddivisi in tre gruppi: gruppo pre-LVAD (n=22; età media 58 anni); gruppo HT (n=7; età media 55anni) e gruppo post-LVAD (n=6; età media 44 anni). Le biopsie cardiache sono state ottenute per il gruppo pre-LVAD al momento dell'impianto del dispositivo dalla porzione apicale del ventricolo sinistro. Per i gruppi post-LVAD e HT, cinque campioni di tessuto cardiaco sono stati prelevati al momento del trapianto da differenti aree sia del ventricolo sinistro che destro (apice, parete laterale e anteriore).

Oltre agli indici infiammatori classici, interleuchina(IL)-6, IL-8 e fattore di necrosi tumorale(TNF)- α , sono state valutate alcune citochine, fra cui IL-33 e il suo recettore ST2, l'adiponectina (ADN) e il *Growth Differentiation Factor*(GDF)-15, proteine con azione anti-infiammatoria e cardioprotettiva. RNA e proteine totali sono stati estratti simultaneamente dai

campioni tissutali con il metodo del fenolo/cloroformio/guanidina-tiocianato; l'espressione a livello di mRNA dei marcatori in oggetto è stata valutata tramite Real time-PCR dopo selezione dei geni di riferimento.

Per i pazienti del gruppo pre-LVAD sono stati raccolti campioni ematici, basalmente ed ad un mese dall'impianto del dispositivo, in cui sono stati misurati i livelli circolanti di IL-33 e sST2 con saggi immunometrici specifici.

Risultati. Per la selezione dei geni di riferimento per la normalizzazione dei risultati di Real-time PCR, sono stati analizzati nove possibili geni candidati; fra questi, PPIA, YWHAZ, RPL13a sono risultati i geni più stabili per il sistema in studio. A livello basale, IL-8 e TNF- α risultano più bassi nel gruppo pre-LVAD rispetto al gruppo HT, mentre IL-6 risulta significativamente più alta ($p=0.008$). I livelli di tutte le citochine aumentano dopo l'impianto del dispositivo. I livelli di espressione di IL-33 e ST2 sono significativamente più bassi nel gruppo pre-LVAD rispetto al gruppo HT (IL-33: pre-LVAD vs HT $p<0.0001$; ST2: pre-LVAD vs HT $p=0.0006$) e aumentano significativamente dopo impianto di LVAD. Anche i trascritti di GDF-15 e di ADN aumentano dopo LVAD. I livelli circolanti di IL-33 diminuiscono significativamente ad un mese dall'impianto del LVAD ($p=0.007$), mentre per sST2 non sono state registrate differenze significative ai due tempi di prelievo. Infine, l'espressione cardiaca di ST2 valutata al pre-impianto ha mostrato una correlazione positiva con alcuni indici di prognosi: giorni di degenza in terapia intensiva ($r=0.591$; $p=0.01$); giorni di ospedalizzazione ($r=0.673$; $p=0.004$) e tSOFA score ($r=0.436$; $p=0.05$). Anche i livelli di espressione di GDF-15 al pre-impianto correlano positivamente con la durata della degenza in terapia intensiva ($r=0.392$; $p=0.0110$).

Conclusioni. I dati ottenuti in questo studio indicano che i mediatori dell'infiammazione sono coinvolti sia nel declino della funzione cardiaca che nel processo di rimodellamento inverso indotto dal LVAD. La correlazione dell'espressione basale di ST2 con gli indici di prognosi suggerisce il coinvolgimento di questa via di segnale nel processo di rimodellamento cardiaco.

ABSTRACT

Introduction. Heart failure (HF) is a clinical syndrome characterized by a gradual loss of pump function of the heart and a progressive series of events collectively known as cardiac remodeling. Many studies have shown that inflammation plays an important role in the development and progression of HF and many cytokines are involved in the activation processes, such as hypertrophy, fibrosis, apoptosis, which are associated with a failing heart. Implantation of left ventricular assist devices (LVAD) in patients with end-stage HF awaiting organ transplantation induces an improvement in haemodynamic status of the patient and seems to positively interfere with many processes involved in cardiac remodeling by promoting the remodeling process reverse.

Aim. The aim of this thesis is to evaluate the impact of LVAD implant on the process of inflammation by measuring the expression of inflammatory markers both classic and new signaling pathways. The specific objectives are aimed at:

- 1) to compare the inflammatory profile in patients with HF undergoing to LVAD implantation (pre-LVAD group) with those of patients with stable HF undergoing to heart transplantation (HT group), considered as the control group;
- 2) to evaluate the effect of LVAD implant on inflammation, comparing the group of pre-LVAD patients with patients studied at the time of removal of the LVAD (post-LVAD group);
- 3) to evaluate the possible role of the various indices of the inflammatory process in early outcome in the group of pre-LVAD patients.

Materials and Methods. The collection of biological samples has been possible thanks to the collaboration with the Milan section of the IFC-CNR and the Niguarda Ca 'Granda of Milan. Patients enrolled in the study are end-stage HF subjects (NYHA class III-IV, LVEF $\% = 24 \pm 4$) divided into three groups: pre-LVAD group (n=22, mean age 58 years old) HT group (n=7, mean age 55 years old) and post-LVAD group (n=6, mean age 44 years old). Cardiac biopsies were obtained for pre-LVAD group at the time of implantation of the device from the apical portion of the left ventricle. For post-LVAD and HT groups, five samples of heart tissue were collected at the time of transplant from different areas of both left and right ventricle (apex, anterior and lateral wall). In addition to classic inflammatory markers, interleukin (IL) -6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF)- α , some cardiokine have been evaluated, including IL-33 and its receptor ST2, adiponectin (ADN) and Growth Differentiation Factor (GDF) -15, proteins with anti-inflammatory and cardioprotective role. Total RNA and proteins were extracted simultaneously from tissue samples with the method of phenol/chloroform/guanidine-thiocyanate; expression at mRNA level of the markers was evaluated by Real-time PCR after

selection of the reference genes. For patients in the pre-LVAD group blood samples were collected at baseline and at one month after the implantation of the device; the circulating levels of IL-33 and sST2 were measured with specific immunometric assays.

Results. For the selection of reference genes for normalization of real-time PCR results nine possible candidate genes were analyzed; among them, PPIA, YWHAZ, RPL13a genes were found to be more stable for the system under study. At baseline, IL-8 and TNF- α are lower in the pre-LVAD group compared to the HT group, whereas IL-6 is significantly higher ($p=0.008$). The levels of all cytokines increase after implantation of the device. The expression levels of IL-33 and ST2 are significantly lower in pre-LVAD group compared to the HT group (IL-33: pre-LVAD vs HT $p<0.0001$; ST2: pre-LVAD vs HT $p=0.0006$) and increase significantly after LVAD implantation. Also transcripts of GDF-15 and ADN increase after LVAD. Circulating levels of IL-33 decreased significantly one month after the implantation of LVAD ($p=0.007$), whereas not significant differences at the two sampling times were found for sST2. Finally, the cardiac expression of ST2 evaluated at pre-implantation showed a positive correlation with some indices of prognosis: days of ICU stay ($r=0.591$, $p=0.01$), days of hospitalization ($r=0.673$, $p=0.004$) and tSOFA score ($r=0.436$, $p=0.05$). The expression levels of GDF-15 in pre-implantation also correlate positively with the duration of ICU stay ($r=0.392$, $p=0.0110$).

Conclusions. The data obtained in this study indicate that inflammatory mediators are involved in both the decline of cardiac function and the process of reverse remodeling induced by the LVAD. The correlation of basal expression of ST2 with indices of prognosis suggests the involvement of this signaling pathway in the process of cardiac remodeling.

INTRODUZIONE

1 Le malattie cardiovascolari

Le "malattie cardiovascolari" (CVD) comprendono una serie di patologie che colpiscono il cuore e/o i vasi sanguigni. Nella famiglia delle patologie cardiovascolari rientrano anche tutti i difetti congeniti del cuore, le malattie reumatiche ad interessamento miocardico, le varie forme di aritmia, le patologie che interessano le valvole cardiache e l'insufficienza cardiaca.

1.1 Epidemiologia

Le CVD costituiscono ancora oggi uno dei più importanti problemi di salute pubblica nonostante i progressi terapeutici degli ultimi anni (Marchegiani F *et al.*, 2009). Esse rimangono tra le principali cause di morbidità, invalidità e mortalità nei Paesi industrializzati. Solo in Europa si stima che il 43% dei decessi negli uomini e il 54% dei decessi nelle donne siano ascrivibili a CVD (OMS, 2008), per un totale di 2 milioni di morti l'anno. I dati di mortalità più aggiornati, per il nostro Paese, forniti dall'Istat ed elaborati dall'Ufficio Centrale di Statistica dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) si riferiscono al 2008. Le malattie del sistema cardiovascolare causano 224.482 morti l'anno (97.952 uomini e 126.530 donne), pari al 38,8% del totale dei decessi; una percentuale così elevata è dovuta in parte al processo di invecchiamento della popolazione (Ministero della salute, 2013). Negli uomini la mortalità per CVD è trascurabile fino all'età dei 40 anni, emerge fra i 40 e i 50 anni e poi cresce in modo esponenziale con l'età. Nelle donne il fenomeno si manifesta a partire dai 50-60 anni e cresce rapidamente (Ministero della salute, 2013). Dati importanti sull'incidenza delle CVD nella popolazione sono stati ricavati dagli studi longitudinali condotti nell'ambito del Progetto CUORE (Osservatorio Epidemiologico cardiovascolare-ISS), che hanno coinvolto più di 21.000 soggetti tra uomini e donne di età compresa tra i 35 e i 74 anni a partire dalla metà degli anni Ottanta con follow-up medio di 13 anni. I dati indicano un'incidenza di eventi coronarici (negli uomini 6,1 per 1.000 per anno con la letalità a 28 giorni del 28%, nelle donne 1,6 per 1.000 per anno con letalità del 25%) maggiore rispetto a quelli cerebrovascolari (negli uomini 2,7 per 1.000 per anno, nelle donne 1,2 per 1.000 per anno) in entrambi i sessi, eccetto che per l'ultima decade di età nelle donne, in cui vi è una maggiore incidenza di incidenti cerebrovascolari. La letalità è alta sia negli uomini (32%) sia nelle donne (35%) e aumenta molto con l'avanzare dell'età (Ministero della Salute, 2013), come mostrato in tabella 1.

Età, anni	Eventi coronarici				Eventi cerebrovascolari			
	Uomini		Donne		Uomini		Donne	
	Tassi di incidenza per anno per 1.000	Letalità %	Tassi di incidenza per anno per 1.000	Letalità, %	Tassi di incidenza per anno per 1.000	Letalità,%	Tassi di incidenza per anno per 1.000	Letalità, %
35- 44	3.2	9.6	0.5	8.3	0.6	11.1	0.3	20.0
45- 54	4.5	15.3	1.2	11.4	1.7	29.1	0.6	23.7
55- 64	9.7	33.6	2.8	27.1	4.8	27.3	2.3	33.9
65- 74	10.1	54.2	4.5	54.5	7.8	53.6	5.3	49.0
35- 74	6.1	27.9	1.6	25,4	2.7	32.0	1.2	34.7

Tabella 1 Progetto CUORE-Studi Longitudinali: tassi di incidenza e letalità – Uomini e donne 35-74 anni; follow-up dicembre 2004. Modificato da Istituto Superiore di Sanità 2010

1.2 Fattori di rischio

Le CVD, sono malattie complesse con eziologia multifattoriale. Sono noti diversi fattori che aumentano il rischio di sviluppare la malattia (Ministero della salute, 2013). Tali fattori di rischio vengono tradizionalmente distinti in :

- non modificabili ;
- modificabili;
- parzialmente modificabili.

Fra questi i più importanti sono: l'età, il sesso, la pressione sanguigna, i livelli di colesterolo, il fumo, il diabete, l'obesità e lo stile di vita (Tabella 2).

Non modificabili	Modificabili	Parzialmente modificabili
Età	Mancanza di attività fisica	Diabete mellito
Sesso	Fumo	Iperensione arteriose
Storia personale di Malattie cardiovascolari	Alimentazione ricca di grassi	Obesità
Fattori genetici	Abuso di alcool	Ipercolesterolemia
		Basso colesterolo HDL

Tabella 2 Fattori di rischio cardiovascolari Modificato da Marchegiani F *et al.*, 2009

L'entità del rischio che ogni persona ha di sviluppare la malattia dipende dalla combinazione dei livelli dei diversi fattori di rischio.

È stato osservato che, grazie al solo cambiamento dello stile di vita (riduzione del numero di sigarette fumate e aumento dell'attività fisica) e al controllo di fattori quali la pressione arteriosa e i livelli di colesterolo, si è avuta una riduzione dei casi di malattie cardiovascolari nelle donne di oltre il 20% (Brown JR., et al 2010).

1.3 Il sistema cardiovascolare

Il sistema cardiovascolare è formato da organi "cavi": i vasi sanguigni, condotti che permettono il movimento del sangue nell'organismo e il cuore, muscolo cavo la cui funzione principale è quella di pompa. Il sangue circola all'interno di questi organi cavi seguendo dei percorsi prestabiliti che vengono distinti in piccola e grande circolazione.

I vasi sanguigni vengono generalmente classificati in relazione alla loro dimensione e composizione come mostrato in figura 1.

Generalmente quando si descrive la struttura dei vasi, si vanno a distinguere:

- *tonaca intima*: cioè la parte più interna dei vasi costituita da tessuto endoteliale che poggia su uno strato di tessuto connettivale subendoteliale;
- *tonaca media*: formata da fibrocellule muscolari lisce e tessuto connettivale elastico, in proporzioni diverse nell'arterie e nelle vene, e in rapporto anche al calibro del vaso;
- *tonaca avventizia*: tessuto connettivale che protegge il vaso e ne permette il contatto con le altre strutture.

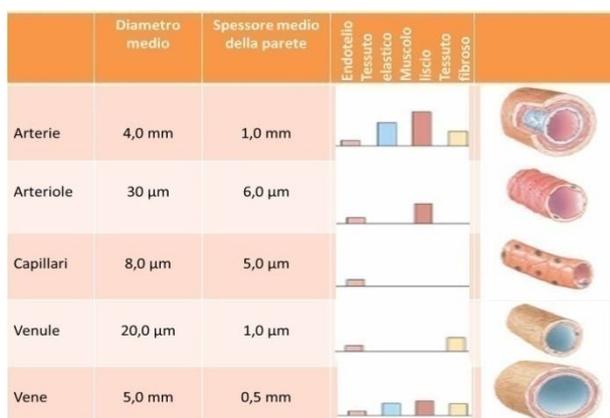


Figura 1: La parete dei vasi sanguigni variano in diametro e composizione. Modificato da Silverthorn 2005.

Come facilmente si può notare dalla Figura 1 le arterie presentano tutte e tre le tonache sono particolarmente arricchite di fibre elastiche e di fibrocellule muscolari lisce. La presenza di

tessuto muscolare ed elastico permette alle arterie di accumulare, dilatandosi, l'energia impressa alla massa sanguigna dalla contrazione del cuore; quando questo si rilascia tra una contrazione e l'altra, l'energia accumulata dalle arterie viene ceduta lentamente alla colonna ematica diretta in periferia; in questo modo le arterie contribuiscono a trasformare i flotti ematici intermittenti, provenienti dal cuore, in un flusso continuo (laminare) essenziale per consentire i normali scambi a livello capillare.

Al pari delle arterie, le vene sono costituite da tre strati, ma le loro pareti sono meno estensibili e spesse rispetto alle arterie di pari calibro; ciò permette il transito di grosse quantità di sangue senza opporre una grossa resistenza. Lungo alcune vene, in particolare in quelle di maggiori dimensioni localizzate a livello degli arti inferiori, sono dislocate speciali valvole - dette a mezzaluna o a nido di rondine - che assicurano l'unidirezionalità del flusso ematico in senso centripeto (dalla periferia al cuore).

Il cuore

Il cuore è una pompa volumetrica discontinua il cui ciclo funzionale è costituito da una fase di rilasciamento (diastole) , deputata al riempimento dei ventricoli, e una fase di contrazione (sistole), durante la quale il flusso viene espulso dai ventricoli. Il flusso generato dal cuore (in litri al minuto) viene detto *gittata cardiaca* ed può essere misurato come il prodotto del volume espulso in una sistole (V_{sist}) per il numero di sistoli nell'unità di tempo (frequenza cardiaca, cioè il numero di battiti in un minuto; FC); (D'Angelo, Peres; 2007)

$$Gittata\ Cardiacca = V_{sist} \times FC$$

Il cuore nei Mammiferi è un organo prevalentemente muscolare a quattro cavità, due *atri* posti superiormente e separati tra di loro da un setto interatriale, e due ventricoli posti inferiormente, separati tra di loro da un setto interventricolare. Fra gli atri e i ventricoli si interpone un setto di tessuto collagene a cui sono ancorate le valvole atrioventricolari, *tricuspide* nel cuore destro e *bicuspidale o mitrale* nel cuore sinistro. Agli atri giungono le *vene cave* a destra e le *vene polmonari* a sinistra. Dai due ventricoli prenderanno origine, con l'interposizione delle valvole semilunari, l'*arteria polmonare* a destra e l'*aorta* a sinistra. (Fig.2A)

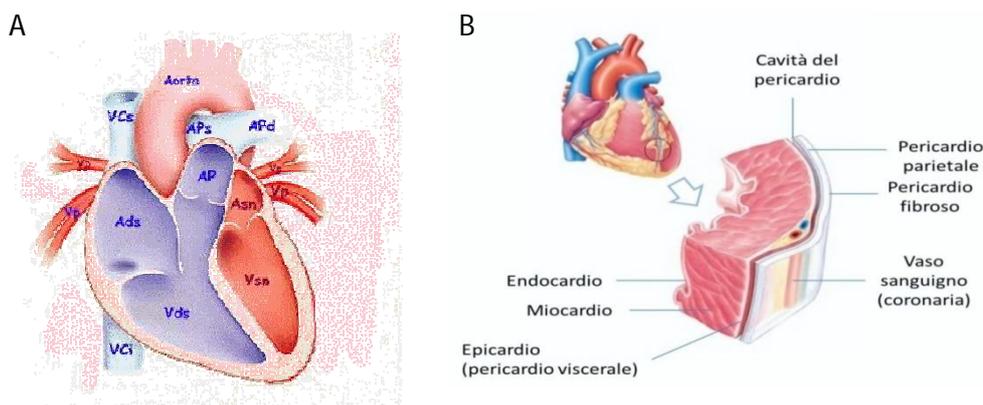


Figura 2: A Il cuore. Relazione tra atri, ventricoli e vasi principali. Ads, atrio destro; Vds, ventricolo destro; AP, arteria polmonare; APs-APd; arterie polmonari sinistra destra; Vp, vena polmonare; Asn, atrio sinistro, Vsn, ventricolo sinistro; Aorta; VCs, vena cava superiore. B. Endocardio, Miocardio ed Epicardio. Gli strati del cuore. Modificato dal web.

La parete delle camere cardiache è rivestita esternamente da una sottile membrana connettivale (epicardio) e internamente da endotelio (endocardio); fra questi è compreso il muscolo striato cardiaco (miocardio) (Fig.2B). Tutto il cuore è contenuto in un sacco sieroso, detto *pericardio*, costituito da un foglietto parietale, aderente alle formazioni mediastiniche, e un foglietto viscerale, fuso all'epicardio. (D'Angelo, Peres; 2007).

Diversamente da altri muscoli il cuore ha capacità di attività *autoritmica*, indipendente dal comando nervoso. Il controllo nervoso sul cuore può modulare la frequenza di contrazione aumentandola o diminuendola, ma questa è generata in maniera spontanea dal miocardio.

1.4 Classificazione delle malattie cardiovascolari

Con il termine di CVD si identificano numerose patologie a carico del cuore e dei vasi esse rappresentano la principale causa di morte nei Paesi Industrializzati. Lo Scoppio Cardiaco rappresenta spesso una complicanza o il destino comune di molte delle CVD.

1.4.1 Aterosclerosi

L'*aterosclerosi* è una malattia infiammatoria cronica delle arterie di grande e medio calibro. Il termine deriva dal greco e si riferisce all'ispessimento dell'intima delle arterie (*sclerosis*, indurimento) e all'accumulo di lipidi (*athere*) che caratterizzano le lesioni tipiche. Le sedi maggiormente colpite dalla malattia sono rappresentate dall'aorta e dai suoi rami principali, dai vasi del circolo cerebrale e degli arti inferiori, ma soprattutto dalle coronarie, dove l'affezione condiziona lo svilupparsi di cardiopatia ischemica, cioè di una sofferenza del miocardio conseguente all'ipossiemia determinata dal ridotto flusso sanguigno nei vasi aterosclerotici (Rugarli, Medicina interna sistematica 2010). Il fenomeno aterosclerotico ha origine in giovane età; prosegue poi nella vita adulta e le manifestazioni cliniche si

osservano prevalentemente tra i 40 e i 60 anni e sono dovute alla ischemia nel letto vasale dipendente dall'arteria lesa. La riduzione del flusso dipende sia dal restringimento del lume arterioso in corrispondenza delle lesioni aterosclerotiche sia dalla presenza di meccanismi di compenso insufficienti. Il principale meccanismo di compenso è rappresentato dall'instaurarsi di circoli collaterali, che consentono al sangue di raggiungere i territori ipoirrorati attraverso i vasi adiacenti. Le donne sono in generale protette da aterosclerosi fino alla menopausa, dopo però ne sono soggette quanto gli uomini e spesso la patologia ha effetti più gravi su di esse perché si manifesta in maniera più rapida e non c'è tempo sufficiente per sviluppare un circolo collaterale in grado di supplire i difetti di perfusione (Pontieri, 2010). L'aterosclerosi si manifesta con tre lesioni elementari che rappresentano le fasi evolutive della malattia: le *strie lipidiche o fatty streak*, sono lesioni reversibili che possono comparire anche in età molto giovane, che si presentano come allungate 1-2mm. La *placca fibrosa* consiste di un ispessimento circoscritto, sporgente sul piano dell'intima, ricoperto da un rivestimento fibroso ma con parte centrale molle. Le placche fibrose possono poi andare incontro ad ulteriori complicazioni, determinando così il terzo stadio dell'aterosclerosi, le *lesioni complicate*.

La rottura della placca è un evento rapido, imprevedibile ed anche il più pericoloso dell'aterosclerosi perché porta alla formazione di coaguli e di trombi con occlusione dei vasi. Ischemia e necrosi degli organi perfusi, dai vasi danneggiati, saranno le conseguenze immediate di questo evento. Gli ateromi che hanno una più alta probabilità ad andare incontro a rottura, le così dette placche instabili o vulnerabili, presentano un voluminoso *core lipidico*, con almeno il 40% di contenuto in lipidi (Davies MJ., et al. 1993, Davies MJ., et al 1994) e una capsula fibrosa di rivestimento sottile. La rottura della capsula fibrosa si associa abitualmente ad una marcata infiltrazione locale di macrofagi, linfociti T e plasmacellule. I macrofagi possono rilasciare alcune metalloproteasi, in grado di degradare la matrice intracellulare ed indebolire la struttura connettivale. Ed è proprio l'assottigliamento della capsula fibrosa, indotto dalle metalloproteasi rilasciate dai macrofagi, l'elemento che favorisce la rottura della placca aterosclerotica (Pavone, 2008). Gli eventi che seguono la rottura della placca vedono: attivazione della via estrinseca della cascata coagulativa, attivazione delle piastrine da cui segue formazione del trombo piastrinico e vasospasmi, come conseguenza del rilascio del contenuto dei loro granuli. Dunque l'ostruzione del vaso che compromette l'apporto di ossigeno e nutrienti all'organo o tessuto a valle dell'occlusione, pregiudicandone la funzione, fenomeno conosciuto come ischemia.

1.4.2 **Cardiopatía Ischemica**

Il termine cardiopatía ischemica (CI) raggruppa una serie di quadri clinici che hanno in comune lo sviluppo di "ischemia miocardica", ossia di una sofferenza o un danno delle cellule miocardiche conseguente a un insufficiente apporto di ossigeno rispetto alle loro richieste metaboliche (Rugarli, 2010). La causa piú frequente di cardiopatía ischemica (95% dei casi) è rappresentata dalla aterosclerosi coronarica. La malattia aterosclerotica può portare a restringimenti del lume delle arterie epicardiche (vasi di conduttanza) ed anche a una riduzione delle capacità di tutto l'albero coronarico. Una lesione aterosclerotica di un ramo epicardico determina a valle della stenosi una caduta di pressione proporzionale alla riduzione del calibro vasale. Il gradiente pressorio che si crea stimola la dilatazione dei vasi di resistenza (pre-arteriole e arteriole), allo scopo di mantenere un flusso adeguato in condizioni basali. Il flusso coronarico a riposo non è alterato fino a stenosi del 70-85%, in quanto la resistenza data dalla stenosi è praticamente trascurabile in confronto alle alte resistenze distali, che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del flusso coronarico a riposo (GOULD KL 1991). Se la stenosi riduce la sezione del ramo epicardico di oltre l'85%, nel momento in cui si creeranno le condizioni che portano ad un aumento delle richieste metaboliche del miocardio, il circolo coronarico non sarà piú in grado di soddisfare tale domanda, da qui comparsa di *ischemia*. A livello clinico la manifestazione della cardiopatía ischemica si avrà come *Angina* oppure come *Infarto del miocardio*.

Angina pectoris

L'Angina è una manifestazione molto comune di ischemia del miocardio. La classificazione clinico-prognostica dell'angina è principalmente di due tipi: angina pectoris stabile o da sforzo e angina pectoris instabile.

L'angina stabile o da sforzo è quella che meglio evidenzia la differenza tra l'aumento delle richieste metaboliche del miocardio e l'incapacità del letto coronarico di incrementare parallelamente il flusso. Una forma particolare di angina stabile è *la sindrome X cardiaca*.

Tra la forma stabile dell'angina e quella instabile si colloca *l'angina di Prinzmetal* chiamata anche *angina variante* essa descrive una sindrome con dolorosa manifestazione fulminante, nata senza alcuna precedente correlazione a stress o sforzo della persona, portando a volte anche alla morte improvvisa del soggetto coinvolto.

Infine, l'angina instabile che è da ricondurre alla *instabilità* di una placca aterosclerotica, per rottura del cappuccio fibroso protettivo caratteristico delle placche stabili, da cui fissurazione o rottura della placca, con conseguente formazione di aggregati piastrinici stabili o instabili, o di trombi parzialmente occludenti. Per la frequente e rapida evoluzione verso un infarto del

miocardio o verso una morte improvvisa, questa forma di malattia anginosa viene spesso indicata, per quanto impropriamente, come *pre-infartuale* (Pontieri, 2010).

Infarto del miocardio

Per infarto del miocardio (IMA) si intende la sindrome coronarica acuta dovuta all'ostruzione di una arteria coronaria a seguito della fissurazione del cappuccio fibroso di una placca ateromatosa con formazione di un trombo occludente e conseguente necrosi circoscritta del tessuto miocardico, incapace di sopportare condizioni di ipossia anche per brevi tempi (Fig. 3)

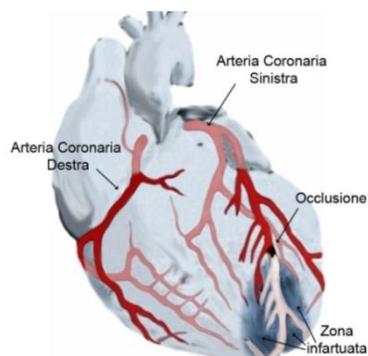


Figura 3: Cuore infartuato. Modificato dal web.

L'infarto del miocardio ha come causa la formazione di un trombo coronarico, un evento reso possibile dal contributo di tre ordini di fattori (triade di Virchow): una lesione endoteliale, un aumento della funzione emostatica e un rallentamento distrettuale del circolo.

Possiamo distinguere tre principali tipi di danno tissutale e cellulare:

- *Danno ischemico.* A causa del mancato arrivo di O_2 e metaboliti al muscolo cardiaco, si verificherà una graduale deplezione di ATP, a questo segue rapidamente l'alterazione funzionale della membrana, l'accumulo dello ione Ca^{2+} a livello citosolico, attivazione del metabolismo perossidativo con produzione di radicali liberi, attivazione in maniera progressiva e non controllata dei sarcomeri e produzione di contrazione abnorme e disorganizzata; attivazione di vari sistemi proteasici che degradano strutture e molecole proteiche del citoplasma, si inibisce la sintesi di ATP.
- *Danno post-ischemico o da riperfusion:* se nelle fasi precoci dell'ischemia viene ripristinato il flusso si induce un danno più importante al tessuto già leso. Tutto ciò risulta legato al fatto che durante l'evento ischemico, si assiste all'aumento della concentrazione dello ione Ca^{2+} nel citosol, questo porta all'attivazione di diverse proteasi calcio dipendenti che agiscono su substrati diversi, uno dei quali è la xantina-deidrogenasi (XDH). L'attivazione

incontrollata di proteasi calcio dipendenti porta alla conversione della XDH a xantina ossidasi (XO), la quale in caso di riperfusione del tessuto, in presenza di ossigeno aumenta la produzione di radicali liberi.

L'aumento delle specie radicaliche induce effetti disastrosi su un tessuto già compromesso dall'ischemia, si assisterà nel danno da riperfusione ad un aumento dell'area necrotica.

- *Danno legato alla cicatrizzazione e al rimodellamento del miocardio.* L'evoluzione anatomica dell'area di infarto, nei casi di sopravvivenza, è di regola verso la fibrosi cicatriziale. La presenza di cicatrice e la mancata *restitutio ad integrum* del miocardio comporta un rimodellamento per rispondere alla nuova (deficitaria) situazione emodinamica. Il rimodellamento riguarda sia il miocardio che lo stroma. I singoli miocardiociti spesso vanno incontro ad ipertrofia compensatoria per sopperire alle deficienze locali di contrattilità (Pontieri, 2010).

La diagnosi di infarto, oltre alle osservazioni della sintomatologia, richiede generalmente l'esecuzione dell'elettrocardiogramma che rileverà alterazioni del tratto ST e delle onde T e Q. Altri esami che rivestono una notevole importanza sono quelli relativi alla misura dei *marcatori sierici* di necrosi cardiaca. In ordine di tempo e in parallelo con l'estensione dell'aria di infarto aumenta per prima la *troponina T* (parte del complesso di regolazione dell'interazione actina-miosina), poi (entro le 12-24 ore) aumenta l'isozima cardiaco della creatin-chinasi (MB-CK), segue l'aumento dell'aspartato aminotrasferasi (entro le 24-48 ore) e degli isoenzimi della lattico-deidrogenasi (LDH-1,LDH-2). Questi ultimi, rappresentano, unitamente al dosaggio della troponina T e della mioglobina un utile sussidio diagnostico a partire delle fasi precoci e fino ad una settimana circa dall'esordio. Più tardivamente sarà possibile osservare eventi infiammatori. Si attiva la risposta infiammatoria, questa compare entro le prime 24-72 ore dall'inizio della sintomatologia, si assiste al rilascio di citochine pro infiammatorie (IL-1, TNF α ,IL-6), aumento delle proteine di fase acuta, febbre, iperglicemia, leucocitosi e aumento della VES (Pontieri, 2010).

1.4.3 Ipertensione arteriosa

Con il termine di *pressione arteriosa* si indica la forza esercitata dal sangue contro la parete delle arterie ed è riassunta da due misure *sistolica* e *diastolica*.

L'*ipertensione arteriosa* è una malattia cronica in cui la pressione del sangue nelle arterie della circolazione sistemica risulta elevata. Ciò comporta un aumento di lavoro per il cuore.

Secondo la classificazione di ipertensione arteriosa stilata nel 2007 dall'European Society of Hypertension (ESH) e dall'European Society of Cardiology (ESC), si considera *ottimale* una pressione sistolica <120 mmHg e una pressione diastolica <80 mmHg, mentre valori di massima

tra 130/139mmHg e valori di minima tra 85/89 mmHg delineano la classe normale-alta (o di pre-ipertensione). I dati ottenuti da studi longitudinali (come il Framingham Heart Study) hanno dimostrato che tali valori della pressione arteriosa sono associati a un più alto rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, rispetto ai soggetti con livelli di pressione inferiore a 120/80 mmHg (Vasan RS., et al 2001).

Pertanto la classe "Pre-ipertesi", (come descritto nella classifica della Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure), indica una classe di individui che non presentano un quadro clinico patologico. Piuttosto si tratta di una designazione scelta per identificare le persone, alto rischio di sviluppare ipertensione, in modo che i pazienti siano informati preventivamente dai medici e incoraggiati a prevenire o ritardare lo sviluppo della malattia (Aram V., et al 2003).

Si può parlare inoltre di ipertensione *primaria* e di ipertensione *secondaria*.

L'ipertensione primaria, conosciuta anche come essenziale, è la forma più comune di ipertensione, rappresentando il 90-95% di tutti i casi. L'ipertensione primaria ha un'eziologia ignota; infatti, è altamente improbabile che le diverse alterazioni emodinamiche e fisiopatologiche che la caratterizzano derivino da una singola causa, ma si pensa che possano dipendere da interazioni tra componente genetica e componente ambientale.

Numerose varianti genetiche comuni che comportano piccoli effetti sulla pressione sanguigna, sono stati identificati così come alcune varianti genetiche rare che portano a grandi effetti sulla pressione arteriosa, particolare attenzione è stata data ai polimorfismi dei geni i cui prodotti di espressione sono implicati nel Sistema Renina-Angiotensina e proteine che influenzano il riassorbimento del sodio. Tuttavia la base genetica dell'ipertensione è ancora poco conosciuta. Qualunque siano i meccanismi patogenetici che sono alla base di questa patologia devono necessariamente provocare un aumento delle resistenze vascolari periferiche totali mediante vasocostrizione, incremento della gittata cardiaca, o entrambi, in quanto la pressione arteriosa è uguale alla gittata cardiaca moltiplicata per le resistenze (Giusti G. 2009).

L'ipertensione secondaria è dovuta a cause identificabili. La malattia renale ne è la causa più comune, seguita da condizioni endocrine come: ipertiroidismo, ipotiroidismo, sindrome di Conn, iperparatiroidismo. Poi ancora: obesità, apnea notturna, gravidanza, consumo eccessivo di farmaci diversi, possono contribuire nell'insorgenza dell'ipertensione secondaria.

L'ipertensione costituisce in primo luogo un fattore di rischio per l'insorgenza di aterosclerosi, che colpisce eminentemente le arterie di grande e di medio calibro. In secondo luogo, rilevanti aumenti pressori sono in grado di provocare una sofferenza anche a livello delle arteriole. Come noto, quando la pressione arteriosa sale, l'autoregolazione vasale interviene a determinare una costrizione, al fine di impedire che le arteriole stesse siano sottoposte ad un

insulto meccanico eccessivo da parte dell'onda sfigmoica (Rugalli, 2010). Tale autoregolazione può funzionare però fino a certi limiti oltre i quali oltre il meccanismo di autoregolazione viene meno e si va in contro ad aterosclerosi. Diversi studi hanno dimostrato che nelle fasi iniziali si osserva un aumento della gittata cardiaca, mentre in un numero minore di casi si assiste ad un incremento delle resistenze periferiche. Quando l'ipertensione arteriosa si è stabilizzata nella sua forma conclamata e manifesta, la maggior parte dei pazienti presenta una gittata cardiaca normale in presenza di resistenze periferiche aumentate (Rugarli, Medicina interna sistematica 2010)

1.4.4 Valvulopatie

Le valvulopatie sono malattie a carico delle valvole: mitralica e aortica per la parte sinistra del cuore; tricuspide e polmonare per la parte destra. Le patologie valvolari sono essenzialmente di due tipi:

- *Stenosi*, con incompleta apertura della valvola. Viene ostacolato il flusso anterogrado del sangue.
- *Insufficienza*, con incompleta chiusura della valvola. Parte del sangue pompato torna indietro, attraverso la valvola che dovrebbe essere chiusa.

Molto spesso però stenosi e insufficienza coesistono nella stessa valvola, realizzando la cosiddetta *stenoinsufficienza*.

Viene inoltre fatta una distinzione tra *valvulopatie congenite* (alterazioni delle strutture cardiache che si registrano durante lo sviluppo embrionale, associate spesso ad altre anomalie congenite che portano a sindromi assai più complesse) e *valvulopatie acquisite* (possono essere dovute a infezioni, infiammazioni, degenerazione del tessuto valvolare, traumi, ischemia miocardica o patologie del muscolo cardiaco).

Qualunque sia l'origine dell'alterazione morfofunzionale delle valvole cardiache, nei pazienti che manifestano queste modificazioni si verifica un aumento del lavoro del cuore con conseguente ipertrofia e/o dilatazione ventricolare, che a sua volta può essere associata ad insufficienza ventricolare con congestione polmonare o degli altri organi.

1.4.5 Le cardiomiopatie

Le cardiomiopatie costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie del miocardio a eziologia frequentemente genetica, che attraverso lo sviluppo di disfunzioni elettriche e/o meccaniche a carico del muscolo cardiaco determinano spesso l'instaurarsi di fenomeni di ipertrofia o dilatazione delle camere ventricolari (Maron BJ et al, 2006). All'interno del vasto insieme delle cardiomiopatie è possibile distinguere due grandi sottocategorie: le *cardiomiopatie primitive* sono malattie prevalentemente limitate al solo miocardio; mentre nelle

cardiomiopatie secondarie la malattia del miocardio non è che una delle espressioni di una più vasta patologia multiorgano

I quattro tipi principali di cardiomiopatie sono:

- *Cardiomiopatia dilatativa*: è una sindrome caratterizzata da dilatazione e riduzione della contrattilità globale del ventricolo sinistro o di entrambi i ventricoli con conseguente riduzione della gittata sistolica e un aumento del volume telesistolico.
- *Cardiomiopatia ipertrofica*: malattia genetica, a trasmissione familiare, determinata da mutazioni su geni che codificano per le proteine del sarcomero. È caratterizzata da un'importante ipertrofia miocardica del ventricolo sinistro che determina una riduzione relativa della cavità ventricolare sinistra e un alterato riempimento ventricolare (disfunzione diastolica) dovuto all'ipertrofia e a un'aumentata rigidità del ventricolo sinistro.
- *Cardiomiopatia restrittiva*: è una condizione caratterizzata da normale dimensione cavitaria sinistra e normale funzione sistolica ma con una rigidità miocardica aumentata (Siegel RJ 1984). Questo aumento di rigidità ventricolare può essere conseguenza di fibrosi estesa, da cui si ottiene una riduzione della sua capacità di distensione, aumento della pressione atriale con dilatazione degli stessi atri e possibili aritmie, oltre al fatto che il sangue ristagna negli atri con conseguente congestione venosa polmonare e/o sistemica.
- *Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro*. È una cardiopatia primitiva del muscolo cardiaco, geneticamente determinata, e caratterizzata da un punto di vista anatomopatologico da atrofia miocardica con successiva sostituzione fibro-adiposa.

1.5 Lo Scopenso Cardiaco

Lo scopenso cardiaco (SC) è una sindrome clinica complessa nella quale un'anomalia della struttura o della funzione cardiaca rende il cuore incapace di riempirsi o di pompare il sangue in quantità sufficiente per soddisfare le esigenze metaboliche dei tessuti, o può farlo solo a prezzo di elevate pressioni di riempimento (Braunwald E. , et al 2005).

Nei Paesi industrializzati circa 1-2% della popolazione presenta SC (McMurray JJV 2010), ma la prevalenza sale al 10% o più per gli ultra settantenni. L'età costituisce quindi uno dei principali fattori di rischio per lo SC. I progressi economici e sociali, associati a importanti avanzamenti in campo medico/terapeutico, hanno portato ad un graduale incremento delle aspettative di vita nella popolazione. Nel 1901 risiedevano in Italia 32,5 milioni di abitanti, tra questi circa il 6,1% avevano compiuto 65 anni. Nell'ultimo censimento del 2011, risultano residenti in Italia 59,4 milioni persone e gli ultra sessantacinquenni oggi sono pari al 20,3% del totale; si stima che per

il 2043 questa percentuale oltrepasserà il 32% (ISTITUTO NAZIONALE STATISTICA-ISTAT). Il progressivo invecchiamento della popolazione e l'aumentata sopravvivenza dopo un infarto miocardico acuto hanno portato e porteranno ad una crescita del numero dei pazienti affetti da SC e conseguentemente del numero di ospedalizzazioni per tale patologia. Nei Paesi industrializzati, dunque, lo SC rappresenta una delle principali patologie che maggiormente incidono sul costo del sistema sanitario.

Esistono numerose definizioni di scompenso cardiaco che tuttavia tendono ad evidenziare aspetti specifici di questa sindrome senza riuscire a descriverla pienamente nella sua complessità.

Si può parlare infatti di:

- *Scompenso cardiaco acuto* : se causato da un improvviso cedimento della funzione di pompa ventricolare con importante riduzione della gittata cardiaca e sovraccarico emodinamico della sezione sinistra con rapido incremento della pressione intra-cavitaria e polmonari fino all'edema polmonare.
- *Scompenso cardiaco cronico*: è la forma più comune di SC che si presenta come "complicazione" di molte malattie del sistema cardiovascolare. Generalmente si definisce lo SC come una malattia cronica ad evoluzione progressiva, la cui *storia naturale* è caratterizzata da un lento declino.
- *Scompenso cardiaco destro o sinistro*: si intendono quelle sindromi caratterizzate prevalentemente da congestione venosa sistemica o polmonare, che inducono segni di ritenzione idrica contraddistinti rispettivamente da edemi declivi o edema polmonare (Dickstein K., et al 2009) .
- *Scompenso cardiaco sistolico o diastolico*: nel caso della disfunzione sistolica si ha un difetto nella fase di svuotamento del ventricolo, in caso di scompenso cardiaco diastolico si nota invece un difetto nel riempimento ventricolare (tipico caso di soggetti con cardiomiopatia restrittiva o ipertrofica). Il principale marker della disfunzione sistolica è la ridotta frazione di eiezione (FE), di solito inferiore a 40%, mentre nei pazienti con alterata funzione diastolica sono compromessi gli indici ecocardiografici di riempimento ventricolare. In gran parte dei pazienti con SC si riscontra disfunzione sia sistolica che diastolica a riposo o sotto sforzo, ma le due forme di SC diastolico e sistolico non devono essere considerate come due entità distinte (Brutsaert DL., et al 2006).
- *Scompenso cardiaco da bassa o alta portata*: anche se generalmente in caso di SC si registra una riduzione della portata cardiaca (SC da bassa portata), ci sono alcuni casi di scompenso definiti ad alta portata associati a patologie diverse quali: ipertiroidismo,

morbo di Paget, anemia, shunt intracardiaco; in questi casi l'aumento cronico della portata cardiaca costituisce un meccanismo fisiopatologico essenziale.

- *Scompenso cardiaco da cause "miocardiche" o "non miocardiche"*: nel primo caso vengono considerate tutte le forme di scompenso legate a malattie primitive del muscolo cardiaco, diversamente nel secondo caso vengono tenute in considerazione tutte le cause di scompenso dovute ad anomalie che non interessano direttamente la funzione dei cardiomiociti, ma limitano l'attività del cuore, come alterazioni del ritmo o della conduzione del segnale, ipertrofia, ipertensione arteriosa o polmonare, tumore.

1.5.1 Eziologia dello Scompenso Cardiaco

La sindrome dello SC viene spesso definita come *punto d'arrivo* di molteplici anomalie che colpiscono il sistema cardiocircolatorio, a tal proposito sono stati descritti, nel capitolo precedente, alcuni dei principali fattori di rischio dello scompenso: ipertensione, aterosclerosi, cardiopatia ischemica, infarto del miocardio, valvulopatie, cardiomiopatie. A queste vanno sommati altri fattori di tipo: endocrini, esocrini, ereditari, malattie metaboliche, malattie infiammatorie ed eventi infettivi.

Come riportato dai primi studi epidemiologici condotti nel tentativo di determinare le cause più frequenti di SC (Framingham heart study), per i Paesi industrializzati venne evidenziata l'ipertensione come principale fattore causale di SC (Dawber TR., et al 1951). Oggi, grazie allo sviluppo delle terapie anti-ipertensive (principalmente gli ACE inibitori ed i β -bloccanti), l'ipertensione cede il posto all'infarto del miocardio come alterazione primaria che porta a SC. A questi fattori di rischio, si va ad aggiungere la cardiomiopatia dilatativa idiopatica che provoca circa il 15-20% dei casi di SC con funzione sistolica ridotta, questi soggetti presentano comunque altre complicazioni cardiovascolari e difetti ereditari (Charron P., et al 2002). Nei Paesi in via di sviluppo le valvulopatie reumatiche, ipertensione e cardiomiopatie sembrano prevalere come fattori di rischio per l'insorgenza di SC.

Lo SC provoca un quadro clinico complesso non solo per l'inadeguata portata cardiaca, che non soddisfa le esigenze dell'organismo, ma anche per la reazione neurormonale conseguente, per le modificazioni della funzionalità polmonare e per le alterazioni delle prestazioni cerebrali che si possono attribuire all'ipossia.

1.5.2 Classificazione dello Scompenso Cardiaco

I sintomi e segni di SC sono diversi. È proprio la sintomatologia uno dei criteri usati dalla *New York Heart Association* (NYHA) per la classificazione dello SC, tra cui si tiene conto di: dispnea,

astenia a riposo e/o durante sforzo, edemi declivi presenza di ortopnea, dispnea parossistica notturna, disturbi del tratto gastroenterico come anoressia e nausea, reflusso epato-giugulare, turgore giugulare, epatomegalia, tachicardia, terzo e quarto tono, rantoli polmonari.

I pazienti possono essere inquadrati in una delle seguenti 4 classi funzionali come mostrato in Tabella 3 :

Classe NYHA	Segni clinici caratteristici
Classe I	Assenza di dispnea, affaticamento e palpitazioni sia a riposo che dopo sforzo
Classe II	Dispnea, affaticamento e palpitazioni solo dopo attività fisica ordinaria.
Classe III	Dispnea, affaticamento e palpitazioni anche dopo sforzi lievi.
Classe IV	Dispnea, affaticamento e palpitazioni anche in condizioni di riposo.

Tabella 3: Classificazione NYHA

Oltre alla classifica NYHA, che rimane la classificazione più conosciuta e usata in ambito clinico, di recente l'*American College of Cardiology (ACC)* insieme all'*American Heart Association (AHA)* ha proposto una nuova classificazione dello SC, che si basa non solo sui sintomi ma anche sulla presenza di danno alle strutture cardiache. Anche in questa nuova classificazione i pazienti vengono suddivisi in 4 categorie o stadi (Fig. 4):

- *Stadio A:* i pazienti sono asintomatici e non presentano danno cardiaco, ma sono ad alto rischio di SC.
- *Stadio B:* i pazienti sono asintomatici ma presentano segni di cardiopatia strutturale.
- *Stadio C:* i pazienti presentano sintomi di SC associati con cardiopatia sottostante.
- *Stadio D:* i pazienti con cardiopatia avanzata, marcati sintomi di SC a riposo nonostante la terapia medica ottimale.

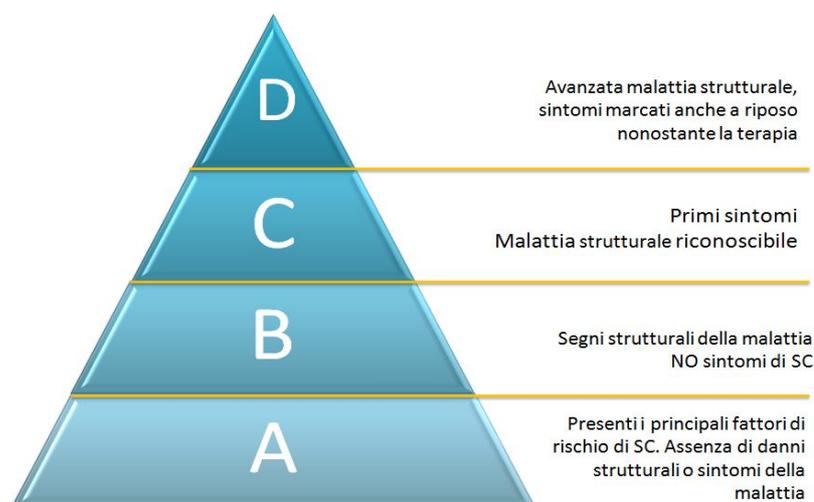


Figura 4. Classificazione ACC/AHA. I 4 stadi dello scompenso cardiaco.

1.5.3 I modelli di Scompenso Cardiaco

Lo SC è un disordine *progressivo* che inizia dopo un evento di vario tipo, che danneggia il cuore con conseguente perdita della capacità contrattile dei cardiomiociti e quindi perdita della funzione di pompa dell'organo.

Negli anni sono stati proposti modelli diversi nel tentativo di spiegare, in maniera globale, i meccanismi degenerativi per il cuore ma nessuno di questi riesce a decodificare correttamente la complessa rete di eventi che accompagna lo SC.

Uno dei primi modelli proposti fu quello "*cardio-renale*", nel quale i medici interpretavano lo SC come un problema di eccessiva ritenzione idrosalina, causata a sua volta da una riduzione della perfusione renale (Packer M. 1992). In seguito è stato possibile vedere che soggetti scompensati presentavano una ridotta gittata cardiaca e un'aumentata vasocostrizione periferica, queste osservazioni portarono allo sviluppo di un nuovo modello per spiegare lo SC e cioè il modello "*emodinamico*".

Tuttavia, anche se entrambi i modelli hanno fatto chiarezza su alcuni aspetti dello scompenso favorendo lo sviluppo di strategie terapeutiche, in particolare il modello cardiorenale ha fornito la base razionale per l'utilizzo dei diuretici come terapia da proporre a soggetti scompensati, e il modello emodinamico ha portato all'uso di inotropi e vasodilatatori come trattamento farmacologico volto all'aumento della gittata cardiaca, non sono riusciti comunque a spiegare ed impedire la *progressione* inesorabile della malattia (Massie BM. 1998, Packer M. 1992).

Lo SC può infatti essere visto come una malattia progressiva che si avvia dopo un "evento iniziali" che danneggia il cuore, con conseguente perdita/riduzione di funzione dei

cardiomiociti e di conseguenza riduzione della funzione di pompa del cuore. Questo “evento iniziale” può essere di tipo acuto, come nel caso dell’infarto al miocardio, o può essere un di tipo cronico, come nel caso dell’ipertensione, o può essere conseguenza di un difetto genetico, come nel caso delle cardiomiopatie ereditarie (Mann DL., et al 2005). I primi sintomi del declino funzionale della capacità di pompa del cuore, nella maggior parte dei pazienti, risultano visibili solo dopo che la disfunzione è presente da qualche tempo. Tutto questo può essere spiegato come la diretta conseguenza dell’attivazione di meccanismi di compenso, che sono in grado di sostenere, entro un certo limite, l’attività del ventricolo scompensato.

Diversi sono i meccanismi di compenso che sono stati descritti e tra questi la precoce attivazione del sistema adrenergico e la ritenzione idrica al fine di preservare la gittata cardiaca (Eisenhofer G., et al 1996; Eichhorn EJ., et al 1997; Hasking GJ., et al 1986). Queste risposte permettono inizialmente di mantenere intatta l’attività cardiovascolare mediante un aumento del pre-carico ventricolare e del tono vascolare sistemico, con il tempo però questi stessi meccanismi contribuiscono alla progressione della malattia.

Il passaggio dello SC da stadio asintomatico a stadio clinicamente rilevante è accompagnato dall’attivazione di sistemi “neurormonali” e da una serie di meccanismi di adattamento del miocardio, indicati in generale come *rimodellamento del ventricolo sinistro* (Mann DL., et al 2005).

La progressione dello SC è da ricercare, per il modello *neurormonale*, nella sovra espressione di molecole biologicamente attive (tra cui noradrenalina, angiotensina II, aldosterone, endotelina e TNF α) che sono in grado di esercitare sul cuore e sulla circolazione degli effetti deleteri.

In origine si pensava che questi neurormoni fossero solo delle molecole segnale endocrine che agivano anche a livello cardiaco. Tuttavia, è diventato evidente che un gran numero di questi stessi neurormoni sia prodotto direttamente all’interno del cuore agendo in maniera paracrina e autocrina. È ampiamente riconosciuto che le cellule del cuore: miociti, fibroblasti, cellule vascolari e cellule progenitrici, secernono differenti sottoinsiemi di proteine regolatrici come risposta a variazioni nell’ambiente cardiaco (Ginecchi M., et al 2008; Kakkar R., et al 2010; Tirziu D., et al 2010; Rohr S. 2012; Tian Y., et al 2012).

L’importante concetto che viene fuori dal modello neurormonale è che la sovra espressione di queste molecole, può contribuire alla progressione della malattia indipendentemente dallo stato emodinamico del paziente (Douglas L., et al 2005). Tutto questo è supportato da una serie di evidenze sperimentali; in alcuni studi condotti su modelli animali è stato dimostrato che a concentrazioni fisiopatologicamente rilevanti di neurormoni (Mann DL., et al 1992; Bozkurt B., et al 1998) o alla sovraespressione dei singoli componenti delle loro cascate di trasduzione del segnale (Bisognano JD, et al 2000; Engelhardt S., et al 1999) è possibile

riscontrare, nel modello, alcuni aspetti tipici di un soggetto scompensato. Di conseguenza, una spiegazione logica per la progressione dello SC, è che l'attivazione a lungo termine di una varietà di meccanismi neuroormonali produca danni diretti sul cuore e sulla circolazione.

Finora, una varietà di proteine che comprendono: noradrenalina, angiotensina II, endotelina, TNF α e aldosterone, sono state considerate come alcune delle molecole biologicamente attive capaci di contribuire alla progressione dello SC. La progressione della malattia può però essere egualmente sostenuta dalla "perdita" di funzione dei vasodilatatori endogeni come: monossido d'azoto (NO), peptidi natriuretici (BNP, CNP, ANP), prostaglandine (PGE₂ e PGEI₂) e chinine, con evidente incapacità nel contrastare la vasocostrizione periferica risultato delle disfunzione delle cellule endoteliali della proprietà vasocostrittrice dell'angiotensina II e della noradrenalina.

Il sistema neuroormonale ha permesso di capire molti degli aspetti che caratterizzano lo SC e sviluppare farmaci per rallentare il decorso della patologia, ma anch'esso è risultato insufficiente nello spiegare la progressione della malattia.

Le terapie mediche attuali permettono di attenuare alcuni aspetti dello scompenso, senza arrestarne la progressione, inoltre alcuni pazienti saranno refrattari o intolleranti alla terapia.

Sono diverse le possibili spiegazioni che giustificano una mancanza di efficacia della terapia:

- una prima spiegazione è che non sia possibile raggiungere una completa inibizione dei fattori appartenenti ad esempio al sistema RAAS o del sistema adrenergico, nel soggetto con SC come conseguenza del fatto che sia gli ACE-inibitori che i β -bloccanti possono essere somministrati solo a dosi limitate, dati i possibili effetti avversi
- è possibile che i neuroormoni abbiano vie di segnalazione differenti che non siano antagonizzate dalle consuete terapie farmacologiche
- è possibile che l'insieme degli antagonisti dei neuroormoni, oggi disponibili, non sia sufficiente a contrastare tutte le alterazioni biologiche che si registrano in caso di SC
- è infine possibile che lo SC ad un certo punto proceda indipendentemente dallo stato neuroormonale del paziente.

1.5.4 Meccanismi molecolari e Scompenso Cardiaco

Lo SC è una delle patologie che causa più vittime nei Paesi Industrializzati, incidendo pesantemente sui costi del sistema sanitario. È comprensibile lo straordinario interesse che è rivolto verso questa malattia, l'enorme attenzione posta nel tentativo di individuare possibili *biomarcatori* che permettano una tempestiva diagnosi ed una più accurata prognosi. Diversi sono i processi biochimici che sono coinvolti nella progressione dello SC, tra cui si ricordano: il

sistema simpatico, il sistema renina angiotensina aldosterone, il rimodellamento tissutale, l'infiammazione, la crescita e la morte cellulare. Di conseguenza molti sono i possibili effettori di ogni via che potrebbero essere usati come biomarcatori.

1.5.4.1 *Biomarcatori e Scopenso Cardiaco*

Molte delle sostanze, con attività biologica, coinvolte nello SC si sono rivelati buoni indici della severità della malattia e dunque sono stati proposti come biomarcatori. Alcuni dei numerosi biomarcatori riportati in letteratura, proposti in tabella 4, sono indicatori di processi biochimici attivati durante lo SC.

Con il termine di "biomarcatori dello SC" si indica un numero sempre più crescente di proteine, enzimi, ormoni e altri *marker* di stress cardiaco che vengono impiegati dal clinico per fare la diagnosi e/o prognosi della malattia. Un biomarcatore è considerato clinicamente efficace se risulta accurato, ovvero altamente sensibile e specifico nell'identificare la situazione fisiopatologica per cui viene richiesto e nel definire la prognosi, (indipendentemente da altri parametri disponibili); se è determinabile con metodi standardizzati e riproducibili; se i suoi risultati sono facilmente interpretabili; infine se è in grado con il suo apporto di contribuire significativamente alla valutazione clinica e quindi di migliorare la prognosi del paziente (Vasan RS. 2006). La complessità della rete biochimica alla base dello SC suggerisce chiaramente che un singolo *marker* non può riflettere tutte le caratteristiche di questa malattia, mentre l'uso combinato di diversi indici potrebbe meglio caratterizzare i pazienti con SC e creare trattamenti più opportuni per ogni caso specifico, aiutando a identificare quali pazienti seguire più da vicino (Giannessi D. 2011).

I principali biomarcatori sono indici di stress cardiomiocitario, attivazione neuroormonale, danno cardiomiocitario, attivazione flogistica, rimodellamento ventricolare (Braunwald E., Biomarkers in heart failure 2008).

Biomarcatori	Categoria
<ul style="list-style-type: none"> • Peptidi natriuretici • Marcatori di attività del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone • Catecolammine • Endotelina • Vasopressina • Adiponectina 	Neurormoni
<ul style="list-style-type: none"> • Troponina cardiaca • Proteina legante gli acidi grassi cardiaci (H-FABP) • Fas (APO-1) 	Marcatori di danno cardiaco
<ul style="list-style-type: none"> • Metalloproteinasi della matrice e inibitori tissutali delle metalloproteinasi • Propeptidi del collagene • Citochine e recettori correlati 	Marcatori di rimodellamento della matrice, disfunzione endoteliale ed infiammazione
<ul style="list-style-type: none"> • Gamma-glutamilttransferasi • Acido urico sierico • Mieloperossidasi 	Marcatori di stress ossidativo
<ul style="list-style-type: none"> • Triiodotironina • GH e IGF-1 • Colesterolo 	Marcatori ormonali e altri marcatori di cachessia

Tabella 4: Alcuni dei Biomarcatori coinvolti nello Scompenso Cardiaco.

È difficile poter catalogare un biomarcatore solo come marcatore di un danno specifico o alterazione di una specifica via biochimica perché spesso le stesse molecole sono implicate contemporaneamente in più processi.

1.5.5 Fisiopatologia dello Scompenso Cardiaco

1.5.5.1 Il Rimodellamento del ventricolo

Il termine di rimodellamento indica una serie di eventi anatomici, cellulari e molecolari che concorrono alla trasformazione del ventricolo (Lotrionte M., et al 2006). Il processo di rimodellamento agisce sulla biologia dei cardiomiociti, sul volume dei miociti e non-miociti del miocardio e sulla geometria e architettura della camera del ventricolo sinistro (Mann DL., et al 2005).

Come risultato delle variazioni di forma e dimensioni del LV, variazioni che mostrano il passaggio del cuore dalla sua fisiologica forma ellittica a una più sferica (Linzbach AJ., 1960), si avranno nuovi oneri per il cuore scompensato che viene così sottoposto ad un ulteriore stress meccanico, con sovraccarioco telediastolico. Una conseguenza di questa sfericità del cuore è che i muscoli papillari sono distanziati e quindi si avrà *insufficienza valvolare o rigurgito mitralico* (Kono T., et al 1992). Per insufficienza valvolare o rigurgito mitralico, si intende il manifestarsi del reflusso di sangue dal ventricolo sinistro all'atrio sinistro, dovuto ad un'anomalia che determina un'imperfetta coaptazione dei lembi mitralici durante la sistole ventricolare.

La camera ventricolare sinistra genera forze di trazione e forze di contrazione, che sono responsabili, allorché in equilibrio dinamico, rispettivamente del normale e simmetrico allineamento (apposizione) e della successiva coaptazione dei lembi e commissure lungo il piano dell'anello. Il rimodellamento del LV condiziona un aumento delle forze di trazione che, se non adeguatamente bilanciato da un incremento delle forze di contrazione, comporta una dislocazione del tessuto mitralico al di sotto del piano dell'anello (malapposizione) ed una conseguente incompleta coaptazione dei lembi o delle commissure (malcoaptazione) con *incontinenza* della valvola mitralica.

Inizialmente questo "rigurgito" fu ipotizzato essere insignificante da un punto di vista clinico, ma l'avvento delle tecniche di *imaging* non invasive hanno dimostrato il contrario. Lo stress provocato da questo cronico sovraccarico emodinamico, spesso definito sovraccarico a bassa pressione, influenza i meccanismi che favoriscono l'ipertrofia delle cellule del miocardio in particolare si ottiene *ipertrofia eccentrica* (nella quale il rapporto tra spessore/diametro della camera ventricolare non cambia).

Infatti, tale sovraccarico in diastole porta il cuore ad applicare una forza maggiore in sistole, per pompare quest'ulteriore volume e di conseguenza si assiste ad un ulteriore aumento della dilatazione della camera ventricolare e ad un aumento di richiesta energetica da parte dell'organo. Questi ulteriori oneri meccanici che sono dovuti a rimodellamento ventricolare sinistro, portano dunque ad una riduzione della gittata cardiaca, ad un ulteriore aumento della dilatazione della camera ventricolare e ad un ulteriore sovraccarico emodinamico, condizioni che risultano sufficienti a contribuire all'avanzamento dello SC indipendentemente dalla condizione neuroormonale del paziente (Mann DL., et al 2005) (Fig. 5).

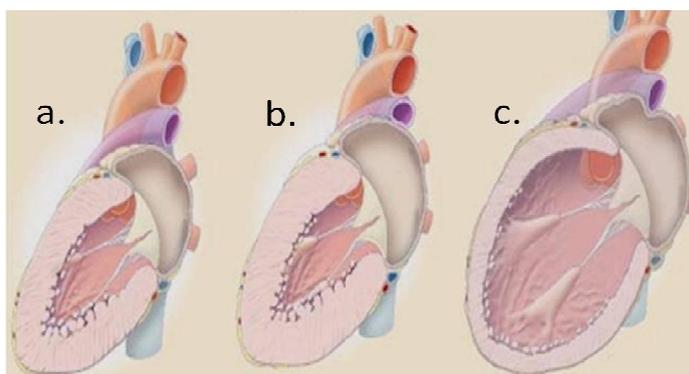


Figura 5: Rimodellamento: progressione del ventricolo sinistro verso lo SC; a. cuore normale; b. cuore ipertrofico; c. cuore dilatato (soggetto con SC).

In corso di rimodellamento ventricolare oltre alle modificazioni "geometriche" del ventricolo è possibile osservare anche tutti gli altri eventi che determinano il rimodellamento e

contribuiscono alla progressione dello SC. Ai fenomeni di ipertrofia/iperplasia si sommano: necrosi e apoptosi, ma anche modificazioni nella composizione della matrice extracellulare, con metalloproteinasi e il suo inibitore tissutale interessati, e per finire perdita della funzione contrattile dei cardiomiociti. Numerosi sono gli studi che suggeriscono come i cardiomiociti, in un cuore scompensato, siano sottoposti a continui insulti da cui dipenderebbe la loro progressiva perdita di funzione contrattile come conseguenza: di una diminuita espressione del gene che codifica per le catene pesanti di α -miosina e un'augmentata espressione del gene che codifica per le catene pesanti di β -miosina (Lowes BD., et al 1997; Nakao K., et al 1997), progressiva perdita di miofilamenti, alterazioni delle proteine del citoscheletro, alterazioni dell'accoppiamento eccitazione contrazione e desensibilizzazione della segnalazione β -adrenergica, alterazione del metabolismo del Ca^{2+} (Lehnart SE., et al 2009).

1.5.5.2 *Sistema neurormonale e Scompenso Cardiaco*

Il passaggio dello scompenso dalla fase asintomatica a quella clinicamente manifesta è accompagnato dall'attivazione del sistema *neurormonale* e dei meccanismi di *rimodellamento ventricolare* (Mann DL., et al 2005). I principali sistemi coinvolti in questo modello sono: il sistema adrenergico, il sistema renina-angiotensina-aldosterone, i peptidi natriuretici e l'endotelina.

Sistema adrenergico

L'iperattivazione del sistema adrenergico rappresenta uno dei meccanismi più importanti e precoci di risposta ad una diminuita funzione cardiaca (Aspromonte N., et al 2010).

Il sistema adrenergico può agire a diversi livelli portando ad aumento della funzione contrattile del cuore, aumento della frequenza cardiaca, ipertrofia dei cardiomiociti, aumento del volume telediastolico (Eichorn EJ., et al 1997).

Negli ultimi anni, un numero crescente di evidenze sperimentali ha attribuito alla deregolazione degli archi riflessi (deattivazione barocettoriale e attivazione dei chemocettori e degli ergocettori), indotta dalla disfunzione cardiaca originaria, un ruolo di primo piano nella genesi di una risposta inizialmente compensatoria, l'ipertono simpatico, invariabilmente associato a deattivazione parasimpatica (Grassi C. et al 1995; Piepoli M., et al 1996). Quando protratto, lo squilibrio autonomo, nel quadro complesso di una predominanza dell'attivazione di sistemi (adrenergico, sistema renina-angiotensina-aldosterone, endotelinico, vasopressinico) con azione vasocostrittiva, sodioritensiva, profibrotica e pro ipertrofica e proaritmica sul sistema controregolatore costituito dalla funzione endocrina cardiaca (Clerico

A., et al 2006), diviene nel tempo motore di evoluzione del rimodellamento cardiaco, di evoluzione clinica e prognosi sfavorevoli.

In condizioni fisiologiche la branca simpatica del sistema nervoso autonomo (SNS) agisce sul cuore attraverso la noradrenalina rilasciata nel vallo sinaptico dalla terminazione del neurone postganglionare e l'adrenalina secreta in circolo dalle cellule cromaffini surrenaliche. A livello del cardiomiocita le catecolamine interagiscono con i recettori adrenergici, membri della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (Emdin M., et al 2010). In particolare la noradrenalina si lega ai recettori α_1 e β_1 mentre l'adrenalina è un ligando dei recettori β_1 e β_2 . Il cuore sano esprime i recettori β_1 e β_2 in rapporto di 70:30; l'effetto cronotropo positivo dei β_1 è mediato da una proteina G stimolatrice dell'adenilato ciclasi, mentre i recettori β_2 sono accoppiati sia a proteine G stimolatrici che inibitrici dello stesso enzima (Brum PC., et al 2006). L'accurata descrizione biochimica dei meccanismi che vengono attivati in seguito al rilascio di catecolamine ha permesso di comprendere meglio i complessi eventi che si registrano in un cuore scompensato. È stato osservato, in seguito a iperattività del sistema adrenergico, un aumentato rilascio di noradrenalina e una refrattarietà nella risposta alla stessa catecolamina, risultato di un riassetto dei recettori β -adrenergici sulla membrana delle cellule bersaglio, come difatti dimostrato negli studi condotti da Bristow e collaboratori (Bristow MR. et al 1982) già nei primi anni '80.

I recettori β -adrenergici (β AR) appartengono ad un'ampia classe di recettori transmembrana caratterizzati da una struttura con sette regioni idrofobiche che attraversano la membrana plasmatica. Come gli altri recettori appartenenti a questa superfamiglia, i recettori β AR sono accoppiati alle proteine G, proteine eterotrimeriche costituite da tre subunità: α , β e γ . Le subunità $\beta\gamma$ hanno il compito di ancorare la proteina G alla membrana plasmatica, mentre la subunità α ha capacità GTPasica, idrolizza il nucleotide guanosina trifosfato (GTP) in guanosina difosfato (GDP) e monofosfato libero. In seguito all'attivazione della proteina G, la subunità α lega GTP, si stacca dalle subunità $\beta\gamma$ e va ad agire su altre molecole bersaglio che fanno parte della cascate di trasduzione del segnale attivata dal legame della catecolamina al suo recettore.

La subunità α stimola ($G_{\alpha s}$) o inibisce ($G_{\alpha i}$) molecole effettrici quali l'adenilato ciclasi (AC) la cui attivazione comporta l'accumulo all'interno della cellula di cAMP (Fig. 6), importante secondo messaggero che agisce a sua volta determinando l'attivazione della protein chinasi A (PKA), la quale esplica i molteplici effetti intracellulari della stimolazione β -adrenergica fosforilando numerosi substrati. In particolare, i canali del Ca^{++} tipo L, i recettori della rianodina, il fosfolambano, la troponina I, la proteina C che lega la miosina cardiaca sono alcuni

dei substrati della PKA responsabili degli effetti inotropo, cronotropo e dromotropo positivi clinicamente evidenti nella stimolazione con farmaci β -agonisti (Schiattarella GG., et al 2010).

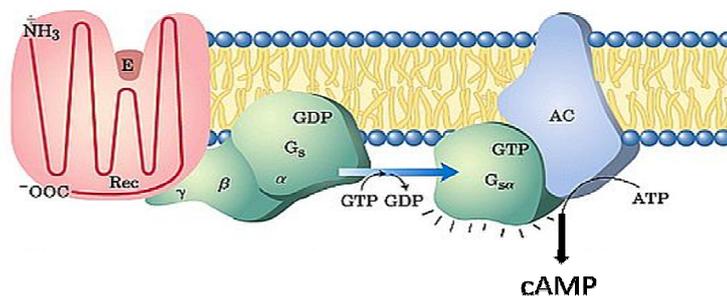


Figura 6: Recettore beta-adrenergico, attivazione dell'adenilato ciclasi. Modificato da Lehninger.

Diversi sono i meccanismi di regolazione che intervengono nel modulare l'attività generata da questi recettori. Si può distinguere una regolazione a breve termine da una a lungo termine.

La regolazione a breve termine è anche conosciuta come *desensibilizzazione*, consiste in una serie di eventi che porteranno la cellula ad essere meno responsiva all'azione del segnale, perché presenterà meno recettori sulla sua superficie cellulare. Questi processi iniziano con la fosforilazione di β AR mediato dalle *G-protein coupled receptors kinases* (GRK), una famiglia di protein chinasi. La GRK2 anche conosciuta come β ARK1 è la GRK più abbondantemente espressa nel cuore (Iaccarino G., et al 1998). La β ARK1 arriva alla membrana cellulare contattando la subunità $\beta\gamma$ della proteina G, si posiziona così in maniera ottimale per agire sul suo substrato, il recettore legato al suo ligando. La β ARK1 fosforilando il recettore lo rende riconoscibile alla β -arrestina, la quale legandosi ad esso ne impedisce l'interazione con la proteina G e ne favorisce l'internalizzazione per endocitosi (Lefkowitz RJ. 2007).

È chiaro che tutto ciò è solo uno degli eventi che può essere attivato in seguito alla stimolazione del recettore β -adrenergico; è stato visto che la fosforilazione del recettore mediata dalla GRK facilita il reclutamento della β -arrestina insieme a molte altre molecole potendo attivare così differenti vie di trasduzione. La regolazione a lungo termine è legata ad una *down-regolazione* dell'espressione dei geni che codificano per i recettori β AR.

L'aumentata attività del SNS in soggetti scompensati, con l'incremento di produzione di noradrenalina, determina una riduzione del numero di recettori β -adrenergici sulla membrana (Bristow MR., et al 1982), e favorisce il decorso in negativo della malattia.

Come dimostrato da lavori pionieristici dei primi anni '80, l'aumentata produzione di noradrenalina può essere considerato, ancora oggi, come l'unico valore predittivo indipendente di mortalità in soggetti con scompenso (Cohn JN., et al 1984).

L'azione deleteria che si associa agli aumentati livelli di noradrenalina, vede l'attivazione di meccanismi differenti. In primo luogo la noradrenalina promuove, al pari dell'angiotensina II, il

rimodellamento ventricolare (Emdin M., et al 2010). Essa, infatti, attraverso l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione, stimola la sintesi di nuove proteine contrattili e collagene, che portano a ipertrofia e fibrosi fino allo scompenso conclamato (Francs GS 1993). Inoltre, esistono evidenze che la noradrenalina abbia un effetto tossico diretto – tempo e concentrazione dipendente – sui cardiomiociti, mediato dall'aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio. La diminuita funzione e, infine, la morte dei cardiomiociti esposti a concentrazioni soprafisiologiche di catecolamine concorre al declino della funzione contrattile del ventricolo nello scompenso (Mann DL., et al 1992). Infine l'iperattivazione simpatica predispone all'insorgenza di aritmie ventricolari potenzialmente fatali (la causa più frequente di morte improvvisa nel paziente scompensato), oltre ad indurre modificazioni sfavorevoli nel sistema immunitario (Olsson G., et al 1984; Maisel AS. 1994).

Strategie terapeutiche per modulare l'iperattivazione del SNS: i β -bloccanti.

Dato l'importante ruolo dell'iperattivazione del SNS nell'evoluzione dello SC, sono state sviluppate diverse strategie terapeutiche per cercare di annullare gli effetti avversi dell'aumentato rilascio di noradrenalina. La terapia ad oggi più utilizzata prevede l'uso di β -bloccanti, che favoriscono una riduzione della gittata cardiaca e riducono il rilascio di renina. Il SNS stimola direttamente il rilascio di renina da parte delle cellule della iuxtaglomerulari, mentre l'angiotensina II e l'aldosterone stimolano a loro volta il rilascio di noradrenalina a livello sinaptico e ne impediscono la ricaptazione (Hilgers KF 1993).

I β -bloccanti generalmente vengono distinti in non selettivi (i quali agiscono sia sui recettori β_1 che β_2) e selettivi sui recettori β_1 (la selettività β_2 non è ricercata in quanto porterebbe eccessiva broncocostrizione). In caso di SC i β bloccanti più usati sono il Cevedilolo e i Metoprololo.

Uno dei più evidenti effetti dei β bloccanti sta nella loro capacità di ritardare, se non addirittura invertire, il progressivo peggioramento della funzionalità ventricolare sinistra che si verifica nell'insufficienza cardiaca. Vari studi, controllati con placebo, hanno evidenziato che il trattamento β bloccanti, della durata di almeno 3 mesi, migliora la funzionalità ventricolare sinistra.

L'incremento della frazione d'eiezione osservato in seguito a trattamento con questi farmaci è superiore rispetto a quello osservato con qualsiasi altro trattamento dell'insufficienza cardiaca (5-10% rispetto al 2% circa ottenuto con gli ACE-inibitori). Quando il follow up è stato proseguito per almeno 6 mesi, sono stati osservati anche una riduzione del volume telediastolico ventricolare sinistro e della massa miocardica, un cambiamento nella

conformazione del ventricolo sinistro che da sferica tende a diventare più ellittica e una concomitante riduzione della gravità dell'insufficienza mitralica. Vengono quindi modulati positivamente tutti i processi caratteristici del rimodellamento ventricolare.

Il trattamento con Cervedilolo e Metoprololo porta, dunque, ad un aumento della frazione d'iezione del ventricolo sinistro (LVEF) e al rimodellamento inverso; tutto ciò sembra in parte associato all'aumento dell'espressione dell'mRNA della catena pesante α della miosina e dell'isoforma 2 della Ca^{2+} ATPasi reticolo endoplasmatico/sarcoplasmatico (SERCA 2a) oltre al decremento dell'espressione dell'mRNA della catena pesante β della miosina (Lower BD., et al 2002).

Sistema Renina Angiotensina Aldosterone

Il Sistema renina angiotensina aldosterone (RAAS) svolge un ruolo fisiopatologicamente importante per lo sviluppo e la progressione dello SC. Questo sistema comprende una complessa cascata enzimatico-proteica che porta alla produzione di mediatori biologicamente attivi i quali andranno ad agire regolando la pressione sanguigna, il tono vascolare, il volume plasmatico e, in caso di una loro eccessiva stimolazione, anche il rimodellamento cardiaco contribuendo alla progressione dello scompenso.

La *renina* è un enzima proteolitico della classe delle idrolasi, che viene secreto dalle cellule della iuxtaglomerulari del rene in risposta a stimoli specifici quali: calo della pressione arteriosa, riduzione della concentrazione di sodio nel plasma, quindi calo di sodio filtrato nel nefrone a livello del glomerulo e "misurato" dalle cellule della macula densa dell'apparato della juxtaglomerulari, stimolazione da parte del sistema adrenergico o altri stimoli di natura patologica. La renina, una volta in circolo, esplica la sua azione proteolitica sull'angiotensinogeno. Prodotto dal fegato l'*angiotensinogeno*, un' α -2-globulina di 452 amminoacidi appartenente alla famiglia delle serpine, viene immesso in circolo e proteolizzato in angiotensina I solo in presenza di renina.

L'*angiotensina I* è un decapeptide biologicamente inattivo che rappresenta il precursore dell'*angiotensina II*. La conversione dell'angiotensina I (decapeptide) a angiotensina II (octapeptide) è mediata da un enzima proteolitico, enzima convertitore dell'angiotensina (ACE), prodotto dall'endotelio dei capillari (soprattutto capillari dei polmoni); quest'enzima agisce anche sulla bradichinina convertendola in frammenti inattivi, condizione necessaria per garantire una corretta ed efficace azione dell'angiotensina II. La bradichinina deriva dal chininogeno attraverso l'azione della callicreina ed esplica la sua azione stimolando la vasodilatazione.

L'angiotensina II, è un potente vasocostrittore in grado di determinare un aumento totale delle resistenze periferiche e della pressione arteriosa. All'angiotensina II si attribuiscono altre funzioni, oltre a quelle emodinamiche. A livello cellulare l'angiotensina II modula la contrazione, la crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi; può favorire la produzione di citochine, l'espressione di molecole di adesione e il conseguente richiamo di cellule implicate nella risposta infiammatoria, l'attivazione dei macrofagi, la crescita dei fibroblasti e la sintesi delle proteine della matrice extracellulare attivando e sostenendo il processo di rimodellamento tissutale. Oltre all'azione proinfiammatoria e alla stimolazione alla produzione di molti fattori di crescita, l'angiotensina II si comporta da molecola segnale che permette il rilascio di *aldosterone*, ormone steroideo sintetizzato dalla corticale del surrene.

Sia l'angiotensina II che l'aldosterone hanno effetti diretti sul miocardio. L'angiotensina II ha effetti citotossici sui cardiomiociti: promuove l'ipertrofia cellulare, stimola la fibrosi miocardica ma risulta anche coinvolta nella stimolazione dell'apoptosi; tutte queste funzioni sono mediate dal suo legame al recettore per l'angiotensina di tipo I (AT-1R) (Gajarsa JJ., et al 2011).

Questo recettore è anche coinvolto nella vasocostrizione, nell'aumento del rilascio di aldosterone e nel potenziamento dell'attività simpatica. AT-1R è un recettore a sette eliche transmembrana accoppiati a proteine G con un classico sistema di secondi messaggeri che mediano la via di trasduzione del segnale a breve termine che comprende i ben noti effetti emodinamici ed endocrini mediati da angiotensina II e uno a lungo termine relativi ai processi di rimodellamento cardiaco attuati essenzialmente attraverso la modulazione dello stato ossidativo della cellula. L'azione dell'angiotensina II a lungo termine determina infatti l'attivazione del "sistema NADH/NADPH ossidasi" che svolge un ruolo chiave nella produzione dell'anione superossido (O_2^-), quindi aumento delle specie reattive dell'ossigeno (Griendling KK., et al 2000). Tutto ciò induce l'attivazione di effettori correlati allo stress ossidativo come il *transforming growth factor β* (TGF β) (Nath KA., et al 1998), e la protein chinasi C (PKC) che attiva a sua volta altre chinasi relative allo stress ossidativo come la *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) (Haurani MJ., et al 2007); tutto questo converge infine nel favorire il rimodellamento cardiaco.

Oltre al recettore AT-1R, per l'angiotensina II esiste un secondo recettore AT-2R; anche questo è un recettore a sette eliche transmembrana accoppiato a proteine G, il quale sembra avere effetti opposti a quelli dell'AT-1R. I segnali mediati dal recettore AT-2R sono implicati nell'antiproliferazione, nella differenziazione cellulare, nei segnali antiapoptotici, nella vasodilatazione e attivano segnali antinfiammatori (Yamamoto Y., et al 2008) (Fig. 7).

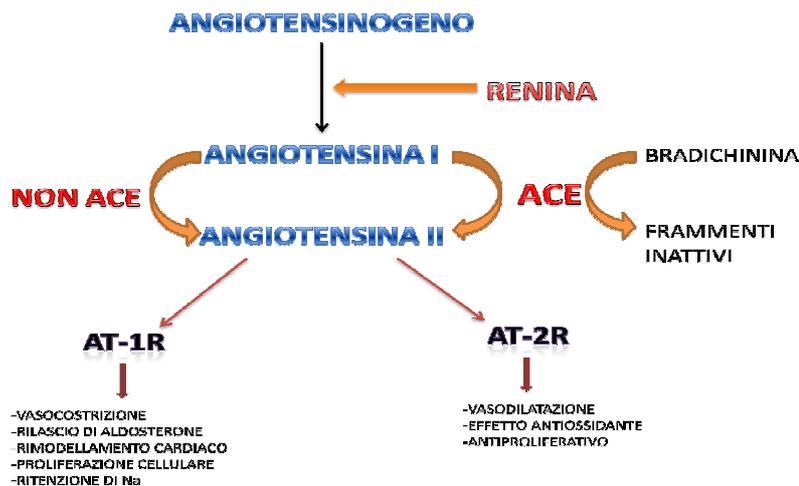


Figura 7: Sistema di attivazione dell'angiotensinogeno ad angiotensina II. Effetti dell'angiotensina II a livello dei bersagli, effetto mediato dai recettori AT-1R e AT-2R.

Diversi studi su modelli animali, hanno dimostrato che la perdita di AT-2R in un cuore infartuato porta ad un innalzamento dell'indice di mortalità ed ad effetti deleteri sul rimodellamento ventricolare. Infatti, se stimolato, AT-2R provvede a fornire una protezione contro l'apoptosi e induce una risposta anti-infiammatoria (Mill JG., et al 2011).

L'aldosterone è un ormone mineralcorticoide responsabile del bilancio dei liquidi sistemici e degli elettroliti. I principali effetti dell'aldosterone a livello del tubulo contorto distale del rene sono quelli della ritenzione di sodio e acqua (effetto quest'ultimo legato al rilascio dell'ormone antidiuretico ADH o Vasopressina) e di perdita di potassio e magnesio grazie al reclutamento e all'induzione dei canali per il sodio (ENaC). L'eccessiva produzione di aldosterone comporta quindi un aumento della volemia e di conseguenza possibile formazione di edema, portando ad un aggravamento del quadro clinico di un soggetto scompensato (Santesi G., et al 2005). L'aumento di aldosterone porta inoltre ad alterazioni elettriche: la deplezione di potassio può indurre aritmie (Arora RB., et al 1962), la deplezione di magnesio favorisce la vasocostrizione coronarica (Miyagi H., et al 1989) e può causare morte improvvisa (Eisemberg MJ. 1992). A livello cardiaco, all'aumentata presenza di aldosterone corrisponderà un aumento della proliferazione dei fibroblasti, con conseguente aumento di deposizione di collagene, in particolare collagene di tipo I e III (Iraqi W., et al 2009). La proliferazione dei fibroblasti e la produzione di collagene portano ad un aumento della rigidità passiva del ventricolo con disfunzione inizialmente diastolica e quindi anche sistolica (Santese G. et al 2005). L'aumento della fibrosi intorno al miocita induce inoltre un aumento della richiesta di ossigeno e di sostanze nutritive compromettendo la sopravvivenza delle cellule stesse. Questo è il substrato

per l'apoptosi e necrosi dei miociti, con lo sviluppo di aritmie ventricolari che si tramutano clinicamente in una progressiva dilatazione ventricolare e nel quadro di morte improvvisa (Liu P. 1996). Inoltre l'aldosterone è coinvolto in processi fibrinolitici, infatti se somministrato insieme all'angiotensina II sembra aumentare i livelli dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (Brown N. et al 2000); l'aldosterone inibisce inoltre l'*uptake* della noradrenalina da parte del miocardio che rimanendo libera, può indurre aritmie, ischemia e morte improvvisa (Santese G., et al 2005).

L'aldosterone risulta come un importante elemento prognostico, insieme all'angiotensina II, per i pazienti con SC; per questi soggetti, infatti, un'aumentata incidenza di mortalità correla con aumentati livelli di aldosterone (Swedberg K., et al 1990).

Strategie terapeutiche per contrastare l'azione del RAAS nello SC

Similmente a come visto per i β -bloccanti, anche gli inibitori del RAAS hanno avuto e continuano ad avere un ruolo importante nella terapia dello SC, fra questi ricordiamo l'azione terapeutica degli *ACE-inibitori* e dei *bloccanti del recettore dell'angiotensina (ARB)*.

Gli ACE inibitori, come si evince dalla stessa definizione, inibiscono l'enzima ACE che così non esercita la sua azione di conversione dell'angiotensina I a angiotensina II; contemporaneamente viene anche inibita la sua azione degradativa sulla bradichinina. Come conseguenza si osserva: la caduta del tono dei vasi sanguigni, la diminuzione della pressione arteriosa, una riduzione del rilascio di aldosterone, diminuzione degli effetti sfavorevoli sul cuore nel soggetto scompensato. Per quanto riguarda il ruolo che hanno questi farmaci sul rimodellamento cardiaco, studi sulla disfunzione ventricolare sinistra hanno mostrato che il trattamento per 1 anno con *Enalapril*, farmaco ACE-inibitore, riduce la mortalità per SC del 22% (The SOLVD Investigators, 1991); inoltre questo farmaco riduce la dilatazione della camera del ventricolo sinistro, migliorando le condizioni di vita del paziente. Un ruolo molto simile agli ACE-inibitori viene attribuito agli ARB; l'impossibilità dell'angiotensina II di potersi legare ai suoi recettori ne riduce gli effetti a livello sistemico e cardiaco, con effetti clinicamente importanti sul rimodellamento.

Oltre agli ACE-inibitori e ARB altri farmaci, tutt'ora in uso, per contrastare l'azione deleteria del RAAS nello SC sono gli *antialdosteronici*, tra cui *Eplerenone*. Questo farmaco, oltre ad agire a livello renale determinando la conservazione di potassio e magnesio, la cui deplezione è causa di aritmie e morte improvvisa, si è visto che riduce la fibrosi miocardica.

Endotelina

Le *endoteline* (ET) sono tra i più potenti peptidi vasoattivi conosciuti. Questa famiglia comprende tre isoforme ET-1, ET-2 e ET-3, ognuna di 21 amminoacidi, i cui geni si trovano rispettivamente sui cromosomi 6, 1 e 20 nell'uomo (Inoue A., et al 1989). Tra queste isoforme l'ET-1 è quella meglio caratterizzata. L'ET-1 viene tradotta come prepro-ET1, un peptide di 212 amminoacidi, ma subisce una serie di tagli proteolitici che portano ad ottenere un peptide di 38 amminoacidi denominato big-ET-1 (Yanagisawa M., et al 1988) che viene rilasciato in circolo. La forma matura dell'ET-1 è ottenuta dal taglio enzimatico della big-ET-1 mediato dall'azione dell'enzima di conversione dell'endotelina (ECE), che appartiene alla famiglia delle metalloproteinasasi.

È stato visto come l'ET-1 oltre ad agire a livello vasale determinando vasocostrizione, agisca anche a livello cardiaco. L'ET-1, oltre ad essere sintetizzata a livello dell'endotelio dei vasi, viene prodotta e secreta anche dai miociti, dai fibroblasti e dell'endotelio cardiaco, agendo sul cuore con azione paracrina e autocrina.

Si parla di effetti a breve termine (entro pochi minuti), quando l'ET-1 modula l'attività contrattile del cuore causando aritmie (Baltogiannis GG., et al 2005), mentre negli effetti a lungo termine il peptide induce la crescita dei cardiomiociti (Drawnel FM., et al 2013). Gli effetti a lungo termine dell'ET-1 sono associati a eventi ipertrofici tipici del rimodellamento cardiaco (Yorikane R. et al 1993) e alla progressione dello SC (Francis G., et al 1990). In condizioni fisiologiche, un aumentato carico di lavoro per il cuore comporta un maggior stiramento dei cardiomiociti e come conseguenza, dell'attivazione della risposta miogena del cuore, un aumento delle forze di contrazione; questa forza di contrazione viene ulteriormente potenziata dal rilascio di ET-1, la cui secrezione viene direttamente stimolata dallo stiramento ma è dipendente anche dalla presenza di angiotensina II (essa stessa rilasciata dai miociti sottoposti ad un sovraccarico di lavoro) (Sadoshima J., et al 1993; Yamazaki T., et al 1996; Pikkarainen S., et al 2006; Cingolani H., et al 2011). Qualora lo stimolo che induce il rilascio di ET-1 divenga persistente la produzione di questo peptide contribuirà al rimodellamento cardiaco (Yamazaki T., et al 1996).

I principali recettori per le ET individuati sono ET-A e ET-B, questi sono classici recettori a sette eliche transmembrana associati a proteine G eterotrimeriche, la cui stimolazione porta all'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale. Il recettore ET-A è prevalentemente espresso nelle cellule muscolari lisce, nei cardiomiociti ma non nelle cellule endoteliali (Hosoda K., et al 1991); questo recettore media principalmente l'azione vasocostrittrice dell'ET1 sebbene anche il recettore ET-B possa contribuire a tale funzione. Infatti il trascritto del recettore ET-B, che è ampiamente espresso nelle cellule endoteliali (Ogawa Y., et al 1991) dove

media la vasodilatazione attraverso il rilascio di NO e prostraciclina (De Nucci G., et al 1988; Wanner TD., et al 1989) è presente anche in alcune cellule della muscolatura liscia vascolare dove media vasocostrizione (Davenport AP., et al 1994).

In condizioni fisiologiche si è visto che tali recettori, nel cuore, hanno una diversa dislocazione nelle camere cardiache, entrambi risultano molto più espressi nelle camere atriali rispetto ai ventricoli (Molenaar P., et al 1993). Anche se entrambi i recettori nel cuore sono espressi, ET-A è l'isoforma predominante, con l'80% dei siti di legame per ET (Allen BG., et al 2003).

A livello ventricolare (nei miociti ventricolari isolati da cuori sani) è stato osservato solo il trascritto di ET-A, mentre sulla cellule non miocitiche (fibroblasti e cellule endoteliali) è stato possibile rilevare la presenza dei trascritti di entrambi i recettori (Modesti PA., et al 1999; Neri S., et al 2000).

Da alcuni studi emerge che l'espressione dei recettori dell'ET-1 sono aumentati sui cardiomiociti di soggetti scompensati e nei modelli animali che presentano malattie cardiovascolari (Motte S., et al 2003; McMullen JR., et al 2007). Nello SC si osserva un aumento della densità dei recettoriale in particolare nel ventricolo sinistro; questo aumento è attribuibile in particolare all'aumento del recettore ET-A (Giannessi D., et al 1999).

L'espressione dei recettori è regolata da vari fattori tra cui: l'ipossia e la ciclosporina le quali oltre a stimolare la produzione di ET-1 nelle cellule endoteliali, stimolano la produzione dell'ET-A nelle cellule muscolari lisce vascolari (Ando K., et al 1989); il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), c-AMP ed estrogeni *up*-regolano l'espressione del recettore ET-A in alcuni tessuti (Levin ER 1995). L'ormone CNP, angiotensina II ed FGF *up*-regolano l'espressione il recettore ET-B mentre angiotensina II, PDGF(fattore di crescita derivante dalle piastrine) *down*-regolano il recettore ET-A, infine cAMP e catecolammine *down*-regolano il recettore ET-B (Levin ER 1995).

L'ET stessa può modulare l'espressione dei suoi recettori come chiaramente indicato dall'osservazione che i siti di legame ET-1 su cellule di topo in coltura, come cellule muscolari lisce o cardiociti, sono *down*-regolati dal pretrattamento con ET-1 (Hirata Y., et al 1989).

In seguito al legame di ET-1 al suo recettore, ET-A, si avrà l'attivazione di una proteina G stimolatrice che induce a sua volta l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) e come conseguenza aumento della concentrazione di fosfatidil-inositolo 1,4,5 trisfosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). L'incremento di questi fattori comporterà: l'aumento della concentrazione citosolica di calcio; l'attivazione di proteine G monomeriche e l'attivazione di diverse chinasi.

Inoltre, ET-1 stimola nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ossidasi (NADPH ossidasi) (De Giusti VC., et al 2008) e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Cheng TH., et al 1999).

L'ET-1 agisce, fisiologicamente nel cuore, come fattore inotropo positivi, aumentando la forza di contrazione dei cardiomiociti, attraverso l'aumento della concentrazione di calcio citosolico. Il blocco selettivo del recettore ET-A con *BQ-123* riduce l'effetto inotropo di ET-1 mentre l'agonista selettivo del recettore ET-B, *sarafotoxina S6c*, non produce variazioni sugli effetti inotropi di ET-1 nel ventricolo (Pieske B., et al 1999).

Diverse sono le evidenze sperimentali che mettono in risalto il coinvolgimento dell'ET-1 nel rimodellamento cardiaco (Russell FD., et al 2000; Sugden PH. 2003). Alcuni studi sono stati indirizzati alla comprensione dei *pathway* attivati dall'ET-1 e la loro azione nel rimodellamento. In particolare l'aumentata attività della PLC può essere considerata di per se come segnale pro-ipertrofico. Inoltre si è visto come l'aumentata concentrazione di calcio intracellulare, oltre a garantire un aumentata forza di contrazione favorisce, attraverso vie diverse, l'attivazione di tutti quei *fattori trascrizionali* la cui azione porta all'espressione di geni coinvolti nel processo ipertrofico (Fig. 8) È stato dimostrato *in vitro*, su miociti ventricolari di ratto giovane posti in coltura (NRVM), che la stimolazione con ET-1 di queste cellule altera l'espressione di centinaia di geni, tra cui si osserva l'up-regolazione dei trascritti delle proteine contrattili come la catena leggera 2 della miosina, l'actina scheletrica e trponina 1 (Ito H., et al 1991), i quali sono gli stessi la cui alterata espressione è coinvolta nell'evento ipertrofico, tipico del rimodellamento (Cullingford TE., et al 2008).

In altri studi è stato visto che infettando modelli murini con il parassita *T. cruzi*, protozoo che porta allo sviluppo della malattia di Chagas che nella forma cronica da cardiomiopatia, ipertrofia e fibrosi miocardia seguita da morte cellulare e SC (Coura JR. e Viñas PA. 2010; Coura JR. e Borges-Pereira J. 2010), si registra un'aumentata espressione del gene che codifica per l'ET-1, similmente a quanto accade in caso di rimodellamento cardiaco indotto da altre cause. In topi, in cui il gene che codifica per ET-1 è stato silenziato, in seguito ad infezione con *T.cruzi* il processo di rimodellamento cardiaco diminuisce (Tanowitz HB., et al 2005).

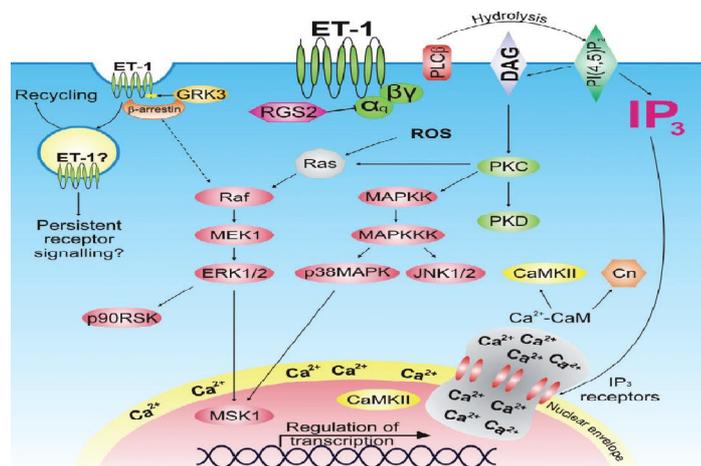


Figura 8: Vie di segnalazione intracellulare attivate dal legame ET-1 al suo recettore (ET_A). La formazione del complesso recettore ligando porta all'attivazione di una proteina G eterotrimerica e all'aumento della concentrazione intracellulare di IP₃ e DAG. Questi secondi messaggeri portano all'attivazione di cascate di protein chinasi e all'aumento della concentrazione di Ca²⁺ citosolico. Segue l'internalizzazione del complesso ET-1/ET_A mediato dall'attivazione di GRK3 e β-arrestina. Quest'ultima è anche coinvolta nell'attivazione della cascata delle MAPK. Modificato da Drawnel FM.2013.

Strategie terapeutiche per contrastare l'azione dell'ET

Le due più evidenti strategie anti-endotelina nello SC sono l'inibizione dell'enzima ECE-1 (che impedisce la generazione di ET-1 maturo da big-ET-1) e il blocco del recettore dell'ET-1 (Giannessi D., et al 2001).

La disponibilità di antagonisti recettoriali dell'ET ha permesso di indagare sul ruolo dell'ET endogena in situazioni fisiopatologiche; in particolare molti studi hanno cercato di valutare se antagonisti recettoriali selettivi e non di ET-A possano essere considerati come la migliore strategia terapeutica anti-ET per lo SC. Infatti, dopo lo studio di Sakai che ha dimostrato che la somministrazione cronica dell'antagonista selettivo del recettore ET-A, BQ123, migliora la sopravvivenza a lungo termine in ratti con SC (Sakai S., et al 1996), numerosi lavori sono stati dedicati a ricercare i possibili effetti benefici associati all'uso degli antagonisti selettivi per il recettore in modelli animali (Spinale FG 1997; Sakai S., et al 1998; Borgeson DD., et al 1998; Moe GW., et al 1998; Yamauchi-Kohno R., et al 1999). Nel loro insieme questi studi hanno indicato che il blocco del recettore ET-A dell'ET-1 può impedire il deterioramento della funzione cardiaca e migliorare la sopravvivenza. Inoltre, anche il trattamento con antagonisti non selettivi dell'ET come, il *bosentan*, hanno migliorato le condizioni emodinamiche (Mulder P., et al 1997; Fraccarollo D., et al 1997; Ohnishi M., et al 1998) e aumentato il tasso di sopravvivenza in modelli sperimentali di SC (Ohnishi M., et al 1998). Negli esseri umani, l'inibizione selettiva di ET-A (Love MP., et al 1996; Cowburn PJ., et al 1998) così come l'inibizione di ECE1 con *fosforamidone* favoriscono vasodilatazione sistemica in pazienti con SC.

La terapia a breve termine con bosentan, tramite infusione intravenosa (Kiowski W., et al 1995), è associata con un riduzione della pressione arteriosa sistemica e polmonare così come alla riduzione della resistenza vascolare rispetto al placebo, mentre non si osserva variazione della frequenza cardiaca. La concentrazione plasmatica di ET-1 aumenta di circa 2 volte dopo la somministrazione di bosentan mentre big-ET1 non varia. Simili effetti funzionali a breve termine sono stati osservati dopo somministrazione orale di bosentan in pazienti con SC sintomatico associato ad una terapia standard costituita da tre farmaci (diuretici, digossina e ACE-inibitori) (Sutsch G., et al 1997), mentre gli effetti sub-acuti del trattamento orale con bosentan includono un ulteriore riduzione delle resistenze vascolari sistemiche e polmonari (Sutsch G., et al 1997). Questi studi indicano che la terapia aggiuntiva a breve termine, con gli antagonisti del recettore dell'ET migliora le condizioni emodinamiche sistemiche e polmonari e può integrare il trattamento convenzionale (Sutsch G., et al 1997; Roux S., et al 1999).

Peptidi natriuretici

La storia molecolare dei peptidi natriuretici (NP) comincia nel 1981, quando Bold e collaboratori isolarono dagli estratti degli atri di ratto un peptide con attività natriuretica e miorilassante, questo fattore fu chiamato *atrial natriuretic peptide* ANP. In seguito furono isolati il BNP cioè il *brain natriuretic peptide*, e il CNP. Nell'uomo due diversi geni codificano per ANP e BNP, questi sono localizzati in tandem sul braccio corto del cromosoma 1. La trascrizione e traduzione del gene per ANP dà luogo a un precursore, prepro-ANP il quale dopo taglio proteolitico viene trasformato come prormone di 126 aminoacidi e conservato dentro i granuli atriali. Dopo il rilascio il pro-ANP viene scisso in un peptide di 28 aminoacidi e in un frammento che viene ritrovato in circolo. Nel rene può formarsi a partire dal pro-ANP un peptide di 32 aminoacidi, l'*urodilatina*. La trascrizione del gene BNP nell'uomo dà luogo a un precursore di 134 aminoacidi, il prepro-BNP. Dopo la rimozione del peptide segnale si ha la formazione del pro-BNP di 108 aminoacidi, dal quale viene poi staccato il BNP maturo, di 32 aminoacidi. Il gene che codifica per il CNP è localizzato sul cromosoma 2 nell'uomo e dà origine a un precursore di 126 aminoacidi, dal quale si libera prima il pro-CNP di 103 aminoacidi e poi si forma il peptide maturo di 22 aminoacidi (Colantuoni A. 2008).

I peptidi natriuretici presentano tutte la stessa conformazione strutturale con una catena peptidica, caratterizzata da un anello chiuso da un ponte cisteinico. La sequenza aminoacidica di questo anello è molto simile nei diversi ormoni natriuretici e risulta conservata nelle diverse specie animali, poiché è proprio questa porzione della molecola che si lega ai recettori specifici (Emdin M., et al 2005).

La secrezione dei peptidi natriuretici dipende da diversi stimoli. Il rilascio di ANP è strettamente correlato ad un aumento della tensione parete atriale, un incremento della frequenza cardiaca (come risultato di un'intensa stimolazione del SNS), ma anche l'azione dell'angiotensina II e dell'endotelina, così come ipossia, ischemia al miocardio e ipertrofia ne possono stimolare il rilascio. La secrezione del BNP è regolata dagli stessi stimoli osservati per ANP, mentre la secrezione del peptide natriuretico di tipo C viene stimolata da una serie di fattori di origine "vascolare" come: IL-1, TNF- β , trombina e lipopolisaccaradi. Il CNP, diversamente dai primi due peptidi, non viene prodotto dal cuore ma in caso di SC la sua concentrazione a livello cardiaco aumenta.

Sono stati individuati tre recettori attraverso i quali i PN possono svolgere la loro funzione: NPR-A, NPR-B e NPR-C.

I recettori NPR-A e NPR-B sono composti da un dominio extracellulare regolatore, con un sito di legame per l'ormone, da una regione trans membrana a catena singola e un dominio intracellulare catalitico per la conversione del GTP a cGMP, formando in questo modo il secondo messaggero intracellulare che media la risposta del *target* alla stimolazione indotta dal ligando. Il recettore NPR-C invece è prevalentemente un recettore di *clearance*. Gli effetti biologici riconosciuti ai peptidi natriuretici cardiaci includono principalmente: vasodilatazione, diuresi e natriuresi (Aspromonte N., et al 2010). Inoltre essi possono determinare *down-regolazione* del sistema RAAS, manifestare attività antifibrotiche sul muscolo cardiaco, nonché esercitare effetto lusitropo positivo (Braunwald E., Biomarkers in heart failure 2008).

I livelli dei peptidi natriuretici risultano particolarmente elevati in caso di SC. In particolare i livelli plasmatici di BNP risultano elevati nei pazienti con disfunzione ventricolare sinistra e correlano con la classe funzionale NYHA e con la prognosi (Palazzuoli A., et al 2009).

1.5.5.3 Rimodellamento cellulare

Il processo di rimodellamento ventricolare che nel cuore sottoposto ad aumentato carico di lavoro conduce alla disfunzione ventricolare e allo SC comprende una serie di eventi anatomici, cellulari e molecolari che in modo combinato tra loro concorrono a tale trasformazione (Lotrionte M., et al 2006). A livello cellulare è possibile osservare l'attivazione di processi di crescita quali iperplasia e ipertrofia.

Iperplasia e ipertrofia

Il miocardiocita, così come tutte le altre cellule dell'organismo, possiede sistemi complessi e ancora non del tutto noti che ne regolano il destino: i cosiddetti *death* o *survival pathways*. Per molti anni si è pensato che quando il cuore umano viene sottoposto a condizioni di aumentato

carico di lavoro, i miocardiociti, incapaci di replicarsi nel cuore adulto, rispondono esclusivamente con l'ipertrofia delle cellule già esistenti (Lotrionte M., et al 2006), ma questa tesi è stata da tempo confutata dimostrando che eventi iperplastici si registrano anche nel cuore adulto.

Iperplasia

L'*iperplasia*, in generale, rappresenta quel processo in cui il volume di un organo o tessuto aumenta come conseguenza dell'incremento del numero di cellule che lo costituiscono. Anche se inizialmente l'iperplasia miocardica fu interpretata come un meccanismo compensatorio, conseguenza di un aumentato carico di lavoro del cuore che subentra all'ipertrofia nel momento in cui questa non è più in grado di manifestarsi ulteriormente (Linzbach AJ. 1960), studi successivi, sia sull'uomo che sugli animali (Olivetti G., et al 1994; Reiss K., et al 1994; Setoguchi M., et al 1999; Beltrami AP., et al 2001), hanno dimostrato come l'iperplasia in realtà compaia in caso di un sovraccarico dell'attività cardiaca indipendentemente dall'ipertrofia, svolgendo in questo modo un ruolo importante nel rimodellamento del ventricolo e nella progressione dello SC. L'entità del sovraccarico è la variabile più rilevante nell'innescare l'ipertrofia o l'iperplasia cellulare. In conseguenza di un incremento graduale e modesto del carico di lavoro sul cuore, l'ipertrofia miocardica è il meccanismo prevalente. Di contro, un sovraccarico importante, acuto o cronico, induce la sintesi del DNA, la divisione nucleare mitotica e la proliferazione miocardiocitaria (Lotrionte M., et al 2006). Quindi, nelle fasi di compenso cardiaco, la crescita miocardica è associata esclusivamente ad ipertrofia dei miocardiociti, mentre l'iperplasia miocardiocitaria si verifica soltanto in presenza di disfunzione ventricolare e SC, indipendentemente dall'entità dell'ipertrofia e della massa miocardica raggiunte (Leri A. et al 2001; Anversa P., et al 2002).

Nelle fasi terminali dello scompenso, la proliferazione cellulare si riduce e prevale la morte cellulare per necrosi e apoptosi, tutto ciò contribuisce alla progressiva disfunzione cardiaca e al rimodellamento del ventricolo.

Ipertrofia

Con il termine di "ipertrofia" ci si riferisce in genere ad un aumento delle dimensioni di un tessuto a cui viene richiesto un incremento delle sue "normali" funzioni.

Il cuore è un muscolo e come tale può andare incontro a processi ipertrofici quando sussistono le condizioni che inducono questo incremento di volume. Si può affermare che nel cuore si attivano dei processi "ipertrofici fisiologici" subito dopo la nascita (eutrofia), ma anche un aumento del carico di lavoro generato da una regolare attività fisica può portare ad ipertrofia fisiologica del muscolo cardiaco.

La causa più comune di ipertrofia ventricolare sinistra, in condizioni patologiche, è legata principalmente all'ipertensione arteriosa, ma anche: all'infarto del miocardio (che riduce la componente contrattile del tessuto), stenosi/insufficienza valvolare, stimoli biochimici (ormoni come: GH, catecolammine, insulina, IGF-1, angiotensina II e ET-1) e in alcune circostanze anche fattori genetici.

A livello molecolare, l'ipertrofia è caratterizzata dall'attivazione del pattern di espressione genica della fase fetale, come isoforme fetali di geni i cui prodotti regolano la contrattilità cardiaca e il trasporto del calcio. In parallelo, si osserva una down-regolazione delle corrispondenti isoforme adulte (Olson EN. 2004). Vascolarizzazione miocardica alterata, cambiamenti nella composizione della matrice extracellulare e fibrosi sono spesso associate all'ipertrofia miocardica (De Boer RA., et al 2003).

Nel soggetto che presenta SC, a livello del miocardio, le vie molecolari che si attivano sono le stesse coinvolte nella risposta fisiologica con la differenza che in caso di SC più stimoli di stress contemporaneamente agiranno sul cardiomiocita amplificando questi meccanismi molecolari e producendo delle interferenze tra di essi (Giannessi D. 2011) (Fig. 9).

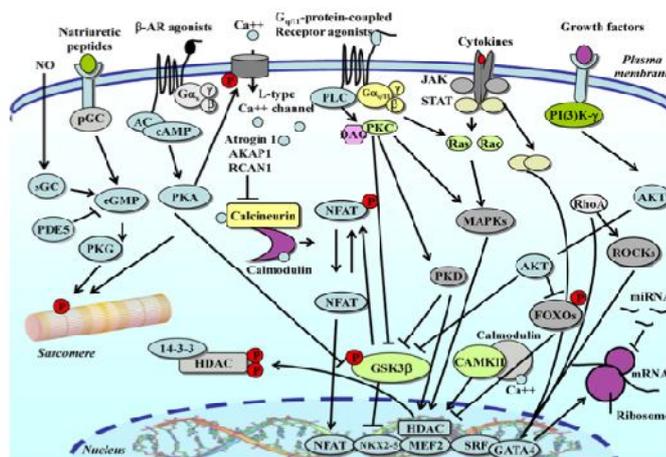


Figura 9: I diversi tipi di vie che si attivano contemporaneamente in caso di SC. Modificato da Mudd JO., et al 2008.

Una volta che i vari ligandi o stimoli meccanici avranno attivato i loro specifici recettori partiranno diversi segnali all'interno della cellula che convergono nell'attivazione di fattori trascrizionali di diversi geni (Giannessi D. 2011), con cambiamento della struttura cellulare. Nell'evento ipertrofico un ruolo chiave è stato attribuito alla calcineurina, una serin/treonin fosfatasi in grado di defosforilare, attivando, fattori trascrizionali come il *Nuclear Factor of Activated T cells* (NFAT) che traslocano nel nucleo e favoriscono così la trascrizione di geni coinvolti nell'ipertrofia (Molkentin JD., et al 1998), in particolare aumenta l'espressione dei

geni che codificano per: la miosina, troponina e la tropomiosina cioè per le proteine del sarcomero. Data la funzione cruciale nell'ipertrofia e nel rimodellamento, molti degli approcci terapeutici che sono stati proposti per limitare gli effetti dello SC, sono rivolti ad inibire il *pathway* calcineurina-NFAT, tra questi troviamo la ciclosporina A ed altri immunosoppressori usati nel trapianto d'organo (Giannessi D. 2011).

Da un punto di vista morfologico si è generalmente portati a distinguere l'ipertrofia in eccentrica o concentrica.

- L'ipertrofia eccentrica, con aggiunta di sarcomeri in serie nel miocardiocita, porta contemporaneamente ad un aumento dello spessore parietale e del diametro intraventricolare (in questo caso il rapporto tra spessore della parete ventricolare e diametro della camera rimane costante).
- L'ipertrofia concentrica, con aggiunta di nuovi sarcomeri in parallelo, è un esempio di ipertrofia "vera" con aumento del volume cellulare dipendente dall'aumento delle miofibrille e dei miofilamenti. Inoltre è possibile osservare un aumento delle dimensioni del nucleo e un aumento del numero di mitocondri. L'ipertrofia concentrica nasce, così come l'ipertrofia eccentrica, come conseguenza di un sovraccarico pressorio e porta ad un aumento dello spessore parietale e una diminuzione della camera ventricolare, questo tipo di modificazioni della camera ventricolare può essere conseguenza non solo di una condizione patologica, in particolare ipertensione arteriosa, ma può essere una risposta fisiologica ad attività sportive "intense" (Fig. 10).

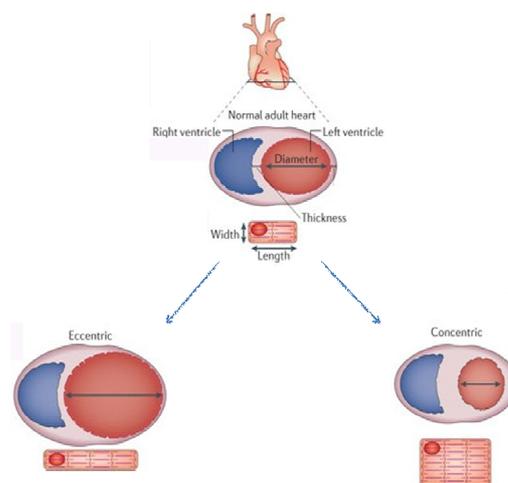


Figura 10: Rappresentazione dei modelli di ipertrofia; ipertrofia eccentrica con aumento del numero di sarcomeri in serie (a destra), ipertrofia concentrica con aumento del numero di sarcomeri in parallelo (a sinistra).

Le ripercussioni sul riempimento diastolico e sulla funzione di pompa sono differenti nei diversi tipi di ipertrofia. Nella ipertrofia concentrica la riduzione della *compliance* fa sì che aumenti la pressione telediastolica e diminuisca il riempimento ventricolare con conseguente riduzione della portata cardiaca anche in assenza di alterazioni della funzione sistolica. Nella ipertrofia eccentrica la diastole viene scarsamente influenzata e la portata cardiaca può aumentare per un incremento assoluto del riempimento ventricolare (Gensini GF., et al 1998).

All'ipertrofia dei miocardiociti non corrisponde però un adeguato incremento del letto capillare. L'inappropriata vascolarizzazione e dunque la carenza energetica non fanno altro che aggravare le condizioni di un cuore già in difficoltà. Il miocardiocita ipertrofico sarà dunque propenso ad eventi ischemici seguiti da eventi di morte cellulare dovuti a necrosi e/o apoptosi.

Fibrosi

In corso di rimodellamento, il cuore ipertrofico aumenta di volume ma non c'è un corrispettivo aumento della vascolarizzazione del tessuto. I miocardiociti ipertrofici hanno una maggiore probabilità di sviluppare ischemia rispetto ai miocardiociti "normali" e andranno così incontro a processi regressivi che li condurranno a morte cellulare per necrosi e/o apoptosi.

Lo spazio vacante, lasciato dalle cellule morte, sarà occupato da materiale cicatriziale.

Si assiste cioè all'attivazione dell'evento fibrotico, con aumento di deposizione di collagene nella matrice extracellulare.

La fibrosi in questo caso appare come conseguenza, una risposta secondaria dell'organismo al danno che ha portato alla necrosi del tessuto.

In alcuni casi la fibrosi, come è stato osservato in modelli sperimentali di ipertensione, rappresenta un fenomeno "reattivo" con assenza di necrosi cellulare (Gensini GF., et al 1998).

La fibrosi potrà essere una conseguenza del rilascio di *citochine* prodotte in particolare dai macrofagi, andando a spiegare in questo modo la presenza di fibrosi nel tessuto in cui si instaura un processo infiammatorio. Le citochine coinvolte nella regolazione dell'evento fibrotico sono principalmente: TNF- α , TGF- β e IL-1, che agiscono in modo differente sui fibroblasti inducendo o inattivando la deposizione di collagene nello spazio extracellulare.

In un soggetto scompensato la graduale sostituzione del parenchima con tessuto fibroso non farà altro che ridurre ulteriormente la sua capacità contrattile e quindi si aggraverà il suo situazione clinica.

1.5.5.4 **Il rimodellamento tissutale**

Matrice extracellulare

Il rimodellamento del ventricolo sinistro con modificazioni di forma, dimensione e funzione del cuore inizialmente in termini di ipertrofia compensatoria si rivela mal adattativo conducendo a ipertrofia decompensata, disfunzione contrattile ed, infine, SC (Aspromonte N., et al 2010).

Tale fenomeno del rimodellamento prefigura l'ipertrofia miocitaria, la proliferazione dei fibroblasti, l'alterazione dell'espressione e della distribuzione sia delle componenti intracellulari che delle più importanti proteine strutturali della matrice extracellulare (ECM) (Braunwald E., Biomarkers in heart failure 2008).

Nel cuore la ECM viene definita come una fitta rete che circonda e supporta cardiomiociti, capillari e fibroblasti, contribuendo all'integrità strutturale e funzionale dell'organo. Essa svolge un ruolo importante nell'influenzare il comportamento cellulare, regolando, ad esempio, la migrazione, la proliferazione, l'adesione e il *signalling* cellulare. Pertanto l'ECM non può essere considerata soltanto una struttura statica, ma piuttosto un complesso sistema di interazioni dinamiche tra molecole della matrice, cellule residenti, proteine transmembrana e proteine del *signalling*. L'ECM è costituita da una complessa rete di proteine strutturali (quali collagene e fibre elastiche) e di proteine multiadesive (come la fibronectina e le laminine), immerse in un ambiente ricco di proteoglicani e glicosamminoglicani.

Il collagene è la componente più abbondante della matrice; esso rappresenta una famiglia di proteine strettamente correlate tra di loro ma prodotte da geni diversi.

La componente maggiormente espressa nel miocardio è rappresentata dal collagene di tipo I, collagene fibrillare implicato nella forza di trazione, e collagene di tipo III, collagene elastico abbondante nell'ECM del sistema cardiovascolare.

Ad assicurare i cardiomiociti alla matrice extracellulare ci pensano le integrine. Queste sono recettori della membrana plasmatica che determinano il legame della cellula alla ECM ma nello stesso tempo inviano segnali all'interno del compartimento cellulare.

Altre componenti importanti della matrice sono le metalloproteinasi (MMPs) e i loro inibitori endogeni tissutali (TIMPs).

Metalloproteinasi

Le MMPs sono una famiglia di enzimi proteolitici zinco dipendenti, prodotti da vari tipi di cellule quali: cellule endoteliali, fibroblasti, cellule muscolari lisce e cardiomiociti. Sono

sintetizzate e secrete come proenzimi e solo dopo aver raggiunto l'ambiente extracellulare vengono attivate per taglio proteolitico da altre MMPs già attive o da Plasmina.

Le MMPs sono state classificate in base all'omologia strutturale e alla specificità dei substrati su cui agiscono, in famiglie diverse: le gelatinasi (MMP-2 e MMP-9); le collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13); stromelisine (MMP-3, MMP-10, MMP-12) e infine le metallo proteinasi di membrana ((MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP).

Data la straordinaria capacità degradativa di queste proteasi, si sono evoluti sistemi di regolazione a diversi livelli. Si parla di controllo trascrizionale e di controllo proteico (con riferimento alla regolazione dell'attività dei loro attivatori/inibitori).

La regolazione dell'espressione dei geni che codificano per le MMPs è affidata a numerosi fattori, stimolatori o soppressori. L'espressione delle varie MMPs può subire un *up-* o *down-regulation* da parte degli esteri del forbolo, da proteine della matrice extracellulare, da stress cellulari e da variazioni di forma della cellula. L'espressione inoltre è regolata da diverse citochine e fattori di crescita, tra cui le interleuchine, gli interferoni, l'*Epithelial Growth Factor* (EGF), il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), il TNF- α , il *Tumor Necrosis Factor*- β (TNF- β) e l'*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN). In particolare si è visto che il TGF- β può limitare l'espressione delle MMPs (McLennan SV., et al., 2000; Sternlicht MD., et al 2001)

Anche le interazioni cellula-matrice e cellula-cellula sono fondamentali per l'espressione genica delle MMPs (Nagase H., et al 1999). I livelli basali dell'espressione delle MMPs possono essere anche influenzati da variazioni genetiche che a loro volta possono influenzare lo sviluppo e il decorso di diverse malattie (Sternlicht MD., et al 2001).

Le MMPs sono sintetizzate come zimogeni, una volta escrete saranno attivate a proteasi attive tramite l'azione di altre MMPs già attive o dalla Plasmina. Un ruolo importante nel processo dell'attivazione è affidato alle MT-MMP che si trovano ancorate al versante extracellulare della membrana tramite una coda GPI, queste riconoscendo le proMMPs ne mediano l'attivazione mediante taglio proteolitico. In aggiunta all'attivazione classica mediata da enzimi proteolitici si è visto che le condizioni di stress ossidativo oltre a fornire lo stimolo per indurre la trascrizione e traduzione dei geni che codificano per le MMPs creano l'ambiente ottimale per fare avvenire questa attivazione.

Inibitori endogeni tissutali (TIMPs)

Tra gli inibitori dell'attività delle MMPs è importante ricordare: TIMP, RECK e α 2-macroglobulina.

A livello cardiaco l'attività di RECK e α 2-macroglobulina è trascurabile, mentre risulta rilevante l'azione inibitoria dei TIMP, che generalmente vengono classificati come tra i più importanti fattori di regolazione endogena delle metalloproteasi.

Questi fanno parte di una famiglia che include quattro componenti (TIMPs 1-4) di 20-29kDa, in grado di inibire reversibilmente le MMPs formando un complesso TIMPs-MMPs in un rapporto stechiometrico 1:1.

La capacità inibitoria delle TIMPs è legata alla sua estremità N-terminale, in cui sono presenti 12 residui di cisteina che formano 6 ponti disolfuro; tramite questa estremità TIMPs contatta le MMPs a livello del sito catalitico inibendone così la funzione.

In condizioni fisiologiche si ha una perfetta omeostasi tra l'azione delle MMPs e i loro inibitori tissutali (Aspromonte N., et al 2010).

Il turnover della matrice extracellulare (ECM) ha un ruolo importante durante il rimodellamento cardiaco è un paradigma ben accettato. Fino ad oggi un gran numero di studi ha documentato che il rimodellamento è accompagnato da aumenti sia nella sintesi che nella deposizione dei componenti della ECM, così come da aumenti delle proteasi extracellulari, soprattutto metalloproteasi della matrice (MMPs), che degradano i componenti dell'ECM (Zampila R., et al 2010).

La fibrosi iniziale è un evento di facile comprensione quando usato per spiegare la perdita di contrattilità del muscolo cardiaco, inteso come aumento di rigidità della parete del cuore per aumento di deposizione di collagene (principalmente di tipo I e III), ma risulta più complicato comprendere la sua implicazione nella fase dello scompenso caratterizzata da progressiva dilatazione e assottigliamento del ventricolo. Il contributo della ECM, a queste ultime importanti modifiche della parete ventricolare, viene associato all'azione degradativa questi enzimi zinco dipendenti. Tali enzimi, degradando la matrice, obbligano ad una riorganizzazione i miociti con graduale assottigliamento e dilatazione della parete ventricolare (Mann DL., et al 2005).

In corso di rimodellamento sono stati evidenziati incrementi nell'espressione di MMPs associati ad una dilatazione della camera ventricolare cardiaca e conseguente disfunzione dell'organo. Delle MMPs che sono state esaminate è emerso che MMP-9 può essere considerato come la metalloproteasi che ha maggiori effetti sul cuore in rimodellamento (Lindsey M., et al 2001). Si è infatti dimostrato come l'inibizione delle MMP-9 migliori il decorso clinico del paziente post-infarto (Rohde LE., et al 1999; Villarreal FJ., et al 2003). Inoltre la delezione del gene MMP-9 riduce il rimodellamento e stimola l'angiogenesi dopo un danno ischemico (Lindsey ML., et al 2006).

Nell'uomo i livelli plasmatici delle MMP-9 sono correlati con la progressione del rimodellamento, con aumentato reclutamento di leucociti nell'area danneggiata e con un aumento del rischio di mortalità in pazienti con malattie cardiovascolari. In uno studio condotto da Horne e collaboratori si è valutato la relazione tra decorso clinico di soggetti infartuati e polimorfismi legati ai geni delle MMPs (Horne BD., et al 2007). I polimorfismi presi in considerazione erano relativi a 4 MMPs (MMP-1, 2, 3 e 9) e 3 (TIMP-1, 2 e 3); solo il polimorfismo su MMP-9 sembrava correlare ad un più alto rischio di mortalità nel soggetto infartuato. In un altro studio condotto su 404 pazienti post-infarto, i livelli di MMP-9 e TIMP-1 risultano direttamente correlabili con i processi di rimodellamento a carico del cuore, sottolineando ancora una volta che questa metalloproteasi può a buon diritto essere considerata come un ottimo biomacatore clinico di rimodellamento e di prognosi sfavorevole (Kelly D., et al 2008). Inoltre, l'attivazione delle MMPs innesca un circolo vizioso in cui la degradazione dell'ECM promuove la sintesi di una matrice la cui composizione differisce rispetto a quella del miocardio sano; si accumulano, infatti, proteine ossidate e maggiormente *crosslinked* che hanno un *turnover* più lento e che perciò favoriscono la formazione di un'impalcatura meno flessibile, ostacolando l'eiezione sistolica rendendo eterogenea la composizione del miocardio.

L'aumentata produzione di MMP-9 in corso di rimodellamento è attribuibile all'incremento di differenti fattori neuormonali. Aumentati livelli di TNF- α sembrano essere principalmente coinvolti in tale situazione, giustificando in questo modo la possibile interazione tra sistema infiammatorio e ECM. Il TNF- α stimolerebbe le stesse cellule infiammatorie alla produzione di MMP-9 e MMP-2, legandosi al proprio recettore di membrana attivando un *pathway* di trasduzione che determina l'attivazione di fattori di trascrizione, tra cui NF- κ B che si occuperà anche della trascrizione dei geni per le metalloproteasi. Oltre al TNF- α anche altri fattori, implicati nella progressione dello SC sembrano favorire l'aumentata espressione delle MMPs e di conseguenza la degradazione della matrice, tra questi le catecolammine, IL-1 β e angiotensina II.

A quest'aumentata espressione delle MMP non corrisponde un aumento dei TIMP di conseguenza, in mancanza del loro inibitore, nelle fasi avanzate del rimodellamento l'attività degli enzimi degradativi sembra incontrastata.

L'intervento delle metalloproteasi sulla matrice libera diversi frammenti di collagene, elastina, laminina e fibronectina, che sono stati denominati *matrichine*, tali fattori sembrano essere in grado di regolare positivamente o negativamente le attività cellulari, con azione simile a quella delle citochine. Questi mediatori proteici sembrano essere coinvolti infatti in processi

differenti come: angiogenesi, la riparazione tissutale, ma allo stesso tempo possono indurre un incrementata produzione di MMPs.

Un'altra molecola segnale che sembra avere un significativo ruolo nel corso del rimodellamento della matrice è l'*osteopontina* (OPN). Normalmente espressa durante lo sviluppo embrionale, i livelli di OPN decrescono nel cuore del soggetto adulto.

In caso di danni al cuore si è registrata una ripresa nella produzione dell'OPN, che legandosi a recettori specifici sembrerebbe essere in grado di stimolare la produzione delle gelatinasi MMP-9 e MMP-2, contribuendo al rimodellamento.

Catepsine

Con il termine di *catepsine* vengono indicate una serie di cistein proteasi lisosomiali scoperte nella seconda metà del XX secolo. Inizialmente, la funzione di queste proteasi fu legata all'attività del lisosoma, cioè degradare componenti proteici provenienti sia dall'ambiente intracellulare che, attraverso endocitosi, dall'ambiente extracellulare. Recentemente è stato però dimostrato che alcune catepsine possono essere secrete e funzionare negli spazi extracellulare. La scoperta più sorprendente comunque riguarda il fatto che queste proteasi possono essere secrete e funzionare negli spazi extracellulari (Cheng XW., et al 2012) . Tra queste si ricordano la catepsina: F, K, S, B e L ; queste proteasi, la cui espressione risulta inducibile in particolari circostanze, risultano coinvolte nelle malattie infiammatorie e/o autoimmuni così come nell'aterosclerosi (Sukhova GK., et al 1998; Oorni K., et al 2004; Liu J., et al 2006; Jaffer FA., et al 2007; Sasaki T., et al 2010; Sun J., et al 2012), ma anche nell'obesità (Taleb S., et al 2006; Yang M., et al 2007; Yang M., et al 2008) , nel cancro (Mohamed MM., et al 2006), nelle cardiomiopatie (Spira D., et al 2007).

La famiglia delle catepsine cistein proteasi include, nell'uomo, 11 membri (le catepsine: B, C, F, H, K, L, O, S, V,W e Z) che sono sintetizzati come prepeptidi glicosilati, la loro attivazione dipende da un taglio proteolitico all'estremità N-terminale, taglio che può essere determinato da altre proteasi attive o come processo autocatalitico. Tranne la catepsina B, che è un'eso-peptidasi, e la catepsina H, che è una N-peptidasi, tutte le catepsine sono delle endopeptidasi e presentano un'alta omologia con gli appartenenti alla famiglia delle papaine.

La loro attività a livello intracellulare è regolata da specifici inibitori endogeni delle cistatine chiamate *stefin A* e *stefin B*, mentre a livello extracellulare le catepsine vengono regolate dalla cistatina C e dai chininogeni (Dubin G. 2005). Alcune catepsine sono tessuto specifiche, come le isoforme S, F e K, altre invece sono ubiquitariamente espresse (ad es. le isoforme B, H e L) (Barrett AJ., et al 1981; Reiser J., et al 2010).

Le catepsine vengono sintetizzate come proenzimi e sono caratterizzate da una "pre-regione" che include la sequenza segnale, la "catena pesante" e la "catena leggera". Grazie alla sequenza segnale, all'estremità N-terminale, le catepsine iniziano la loro sintesi nel citoplasma ma questa poi sarà terminata nel reticolo endoplasmatico rugoso; una volta completata la sintesi e attuate le prime modifiche post-traduzionali le catepsine sono indirizzate verso il Golgi dove subiranno ulteriori modifiche, come glicosilazione e conversione dei residui di mannosio in mannosio-6-fosfato. Queste ultime modifiche saranno utili per indirizzare l'enzima inattivo verso il lisosoma. In quest'ultimo organello l'attivazione proteolitica delle catepsine è mediata da enzimi diversi come: pepsina, elastasineutrofila, catepsina D e varie cistein proteasi (Nishimura Y., et al 1988; Rowan AD., et al 1992). Reiser e colleghi hanno formulato l'ipotesi che le catepsine una volta attivate possano essere assunti dagli endosomi e attraverso secrezione Ca^{2+} -mediata rilasciati nello spazio extracellulare (Reiser J., et al 2010).

Dato che questi enzimi lavorano in compartimenti acidi, quali i lisosomi, ci si è chiesto come sia possibile una loro azione nell'ambiente extracellulare dove il pH è neutro. Punturieri e collaboratori hanno ipotizzato a questo proposito ad un possibile coinvolgimento dei "contatti focali". Essi hanno dimostrato la formazione di un ambiente acido attorno ai macrofagi posti in coltura, che li isola dall'ambiente circostante (Punturieri A., et al 2000). L'acidificazione del microambiente sarebbe attribuibile alla traslocazione sulla membrana plasmatica della pompa protonica, H^+ -ATPasi, normalmente presente sulla membrana lisosomiale (Reddy VY., et al 1995).

Questi risultati sembrano fornire una spiegazione capace di giustificare l'importante azione delle catepsine .

Ad indurre la produzione delle catepsine sono diversi fattori. I cardiomiociti neonatali in coltura, in condizioni basali, esprimono livelli trascurabili di catepsina S mentre in seguito ad incubazione con $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ si assiste ad un incremento sia del suo mRNA sia della proteina (Cheng XW., et al 2006). Queste citochine inducono la produzione anche di altre catepsine come catepsina K, B e L. Inoltre, *in vitro*, è stato osservato che la loro azione è efficace oltre che sui cardiomiociti anche su fibroblasti e miofibroblasti nei quali inducono la produzione di catepsina S e B (Cheng XW., et al 2006).

Cheng e collaboratori hanno dimostrato che nella regolazione dell'espressione dei geni che codificano per la catepsina S sono ugualmente implicati oltre alle citochine anche angiotensina II e il perossido d'idrogeno (Cheng XW., et al 2008). Il perossido d'idrogeno sembra in grado di stimolare anche la produzione della cistatina C nel mezzo di crescita (Xie L., et al 2010). Questi risultati suggeriscono che le catepsine derivate dalle cellule cardiache possono partecipare ad eventi degenerativi a carico del cuore che nascono come conseguenza di stress ossidativo

e/infiammatorio (Cheng XW., et al 2012). È stato dimostrato che un'aumentata secrezione, di catepsine S e K nell'ECM si osserva nei soggetti ipertesi e con rimodellamento cardiaco in atto (Cheng XW., et al 2006).

Tra le catepsine, quella che risulta essere maggiormente coinvolta nel rimodellamento della matrice del cuore è la catepsina L (Reiser J., et al 2010); questa catepsina sembra avere un duplice ruolo in realtà essendo anche implicata in processi riparativi, in seguito ad un danno del miocardio (ad esempio danno ischemico). Sun e collaboratori hanno dimostrato in modelli animali che, seguito ad infarto i livelli di catepsina L sono aumentati e che in caso di una sua down-regolazione si avrà una progressione nella dilatazione della camera ventricolare e raddoppio delle morti dopo l'infarto (Sun M., et al 2011).

Il loro coinvolgimento nel rimodellamento della matrice è dimostrato dall'azione attivante della catepsina sulle MMP-9, questa una volta attiva agisce sulla ECM procedendo alla degradazione dei suoi vari componenti (Fig. 11).

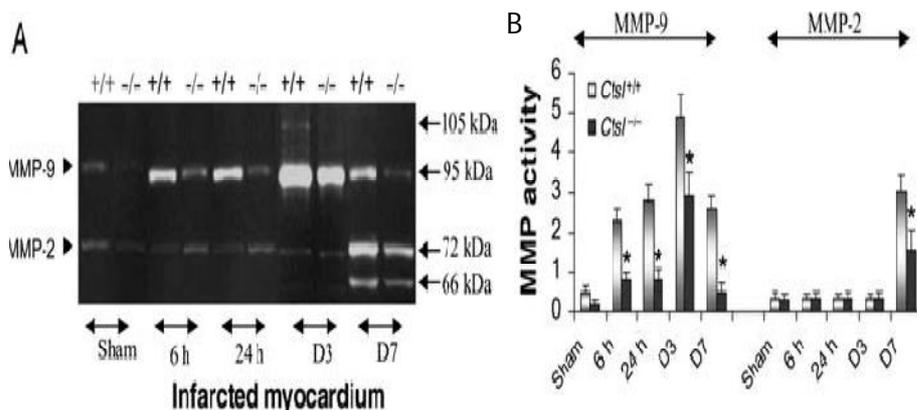


Figura 11: Livelli di espressione delle MMP-9 e MMP-2, misurati tramite zimografia, in cuore infartuato di topi Ctsl^{-/-} e Ctsl^{+/+}; modificato da Sun M., et al 2011.

1.5.5.5 *I processi di morte cellulare*

Nello SC uno squilibrio tra i processi che promuovono la sopravvivenza cellulare e quelli che ne promuovono la morte (apoptosi e necrosi) porta alla riduzione del numero dei cardiomiociti, contribuendo alla progressiva disfunzione cardiaca e rimodellamento ventricolare.

Apoptosi

L'apoptosi (o morte cellulare programmata) è un processo finemente regolato di morte cellulare. Questa è fondamentale durante l'embriogenesi, nel garantire una corretta morfogenesi, nella selezione timica, nella risposta immunitaria ed è importante nell'adulto per

il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Una deregolazione del processo apoptotico risulta catastrofica soprattutto per quei tessuti che hanno una scarsa capacità rigenerativa, nei quali il tessuto mancante non potendo essere sostituito con parenchima funzionale verrà sostituito con materiale cicatriziale e perderà la sua funzione.

L'evento apoptotico è stato osservato anche a livello del cuore. Originariamente si pensava che la morte cellulare che seguiva al danno indotto da ischemia fosse attribuibile solo alla necrosi. Successivi studi, condotti su modelli animali di ischemia-riperfusion e su cuore umano espantato da soggetti con SC terminale e sottoposti a trapianto, hanno dimostrato che ambedue i modelli presentano evidenti alterazioni morfofunzionali e danni al DNA caratteristici e correlabili con l'evento apoptotico (Narula J., et al 1996; Olivetti G., et al 1997). Recentemente è stato ipotizzato che l'apoptosi potrebbe essere uno degli eventi che media la transizione dello SC dallo stadio "lieve" allo stadio terminale (Masri C., et al 2008). Questa osservazione suggerisce che un trattamento in grado di modulare l'apoptosi potrebbe aiutare a ripristinare la funzione sistolica e invertire il rimodellamento, attenuando la gravità e progressione dello SC (Wencker D., et al 2003; Chandrashekar Y., et al 2004).

L'evento apoptotico sembra essere modulato da diversi fattori: neuro-ormonale, citochine e fattori attivanti extracellulari (Gajarsa JJ., et al 2011). Diversi studi *in vitro* dimostrano che molti dei fattori che contribuiscono all'insorgenza e progressione dello scompenso siano allo stesso tempo cause importanti che inducono la cellula ad apoptosi, tra questi troviamo: stress ossidativo, TNF α e angiotensina II (Leri A., et al 1998; Krown KA., et al 1996).

Una cellula in apoptosi mostra evidenti caratteristiche morfologiche: la cellula tende ad arrotondarsi ed a perdere i contatti con le cellule adiacenti, ciò appare una conseguenza della scomparsa delle giunzioni cellulari e delle zone specializzate della membrana plasmatica all'interazione con le cellule adiacenti; il nucleo si rimpicciolisce e si frammenta mentre la cromatina viene condensata e degradata in frammenti lunghi 200bp circa; la cellula diventa più piccola mentre gli organuli cellulari rimangono di dimensioni "normali"; successivamente la cellula si frammenta in vescicole chiamate *corpi apoptotici* grazie ad un processo che prende il nome di *blebbing*. Questi corpi apoptotici verranno in seguito fagocitati da parte dei macrofagi; questo è possibile perché espongono dei marcatori glucidici che fungono da segnali per la fagocitosi. Dunque la morte cellulare che avviene per apoptosi è una morte cellulare "pulita" nella quale cioè la cellula non lascia traccia di sé, diversamente da quanto accade nella necrosi.

I meccanismi dell'apoptosi

L'apoptosi o morte cellulare programmata rappresenta un processo altamente regolato e dipendente dal delicato equilibrio tra i fattori pro- e anti-apoptotici; ogni meccanismo che possa alterare questa condizione di parità tra segnali di vita o di morte determinerà il destino della cellula nell'una o nell'altra direzione.

Gli eventi iniziali che si riscontrano in una cellula che va incontro ad apoptosi sono diversi, fra questi: il rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio, l'attivazione delle caspasi (Narula J., et al 1999) e l'inibizione dell'attivazione di Akt (Rodriguez J. 2000); questa è un importante fattore antiapoptotico, che interferisce sia con l'attivazione della via intrinseca che estrinseca dell'apoptosi, rivestendo un ruolo rilevante nell'omeostasi nei cardiomiociti (Gao F., et al 2002)

Gli aspetti morfologici che si osservano in una cellula che va incontro ad apoptosi sono il risultato dell'azione delle cistein proteasi, note comunemente come caspasi.

Le caspasi sono gli esecutori materiali della morte cellulare per apoptosi. Si trovano in tutti i tipi di tessuto in una forma inattiva, detta pro-caspasi che per l'attivazione richiedono un taglio proteolitico generato da altre caspasi già attive. In genere si fa la distinzione tra: "caspasi iniziatrici" che rispondono agli stimoli apoptotici e attivandosi vanno ad agire su un secondo gruppo di caspasi dette "esecutrici" le quali agiranno invece sui componenti cellulari. La caspasi esecutrice generalmente coinvolta è la caspasi 3. All'attivazione di questa si giunge attraverso la stimolazione proveniente da due vie diverse ma comunicanti e cioè la *via estrinseca* e la *via intrinseca* dell'apoptosi (Fig. 12).

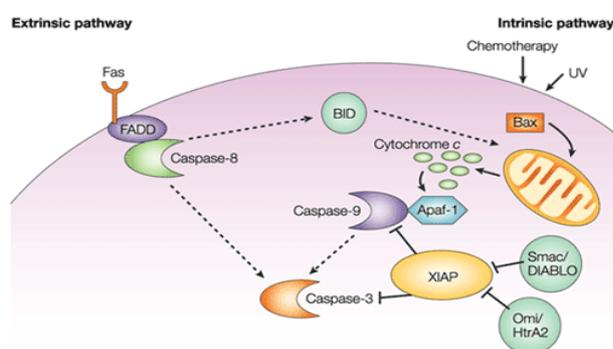


Figura 12: I meccanismi molecolari dell'apoptosi. Illustrazione schematica dei principali fattori coinvolti nell'evento apoptotico.

La via estrinseca

Questa via è definita anche come via dei recettori di morte, che comprendono il recettore FAS/CD95, TNF1R, ed altri recettori simili, situati sulla membrana cellulare.

Il legame del ligando, FasL ad esempio, al suo recettore ne determina l'attivazione. Tutto ciò innesca la via di trasduzione del segnale che vede l'interazione del dominio intracellulare (definito "effettore di morte") del recettore con una molecola adattatrice, FADD la quale provvederà a favorire il reclutamento delle procaspasi 8. Queste ultime infine si attiveranno mediante un processo definito *induzione per prossimità*.

Una volta attiva la caspasi 8 (caspasi iniziatrice) provvederà all'attivazione per taglio proteolitico della caspasi 3, che potrà agire sui substrati sensibili. Tra questi si ricorda *Caspase Activated DNase (CAD)*, una endonucleasi che si trova normalmente a livello citosolico legata al suo inibitore *Inhibitory CAD*. La caspasi 3 separa CAD dal suo inibitore in modo che questa arrivi all'interno del nucleo e vada a svolgere la sua funzione frammentando il DNA, in piccoli frammenti di 200bp circa. Non sempre la sola caspasi 8 è sufficiente per attivare la caspasi 3 e avviare la cellula a morte, in tali circostanze è possibile che la caspasi iniziatrice vada ad agire su una proteina citosolica, appartenente alla famiglia delle Bcl-2, Bid. Questo fattore proapoptotico attivo trasloca sulla membrana mitocondriale determinando il rilascio del citocromo *c*, elemento cruciale per la via intrinseca dell'apoptosi. Si stabilisce quindi un ponte tra via estrinseca e intrinseca determinando un potenziamento del segnale di morte.

Nello SC la morte per apoptosi è attivata principalmente tramite la via estrinseca, il mediatore principale di tale evento è il TNF α , iperespresso in caso di scompenso e prodotto dalle stesse cellule miocardiche. Il TNF α legandosi al suo recettore TNF1R innesca la stessa cascata di eventi descritti per FasL e il suo recettore.

La via intrinseca

Questa via è attivata da diverse forme di stress cellulari in particolare danno esteso al DNA o mancanza di fattori di crescita.

Generalmente in seguito ad un danno irreversibile al DNA, p53 fa partire un segnale di attivazione di trascrizione dei geni che codificano per fattori pro apoptotici appartenenti alla famiglia Bcl-2.

È importante sottolineare che alla famiglia Bcl-2 appartengano fattori sia pro-apoptotici (Bax, Puma, Bak, Noxa) che anti-apoptotici (Bcl-2, Lcl1, ecc). In caso di danno esteso al DNA p53 favorisce l'espressione di Bax, questo lega Bid nel citosol e assieme arrivano al mitocondrio permeabilizzando la membrana al citocromo *c*. Inoltre, Bid favorisce l'attivazione di fattori pro-apoptotici costitutivamente espressi e presenti sulla membrana mitocondriale in uno stato

funzionale inattivo perché legati a Bcl-2 tra cui abbiamo lo stesso Bax e Bak. Si suppone (secondo il modello del *displacement*) che Bid attivato vada a legare con maggiore affinità Bcl-2 che lascia così liberi Bak e Bax alla polimerizzazione sulla membrana mitocondriale.

Una volta uscito dal mitocondrio, il citocromo c lega Apaf-1 e si procede alla produzione dell'Apoptosoma un complesso eptamerico che favorisce il reclutamento e attivazione della procaspasi 9. Questa attivata agisce sulla caspasi 3 e da qui si procederà come descritto per la via estrinseca. Come precedentemente detto l'evento apoptotico è finemente regolato, la cellula decide di attivare questo meccanismo di morte solo se è necessario. Esistono infatti molte fattori anti-apoptotici come: c-FLIP che inibisce l'attivazione della caspasi 8, XIAP che impedisce l' "erronea" attivazione della caspasi 9, ed anche i componenti anti-apoptotici appartenenti alla famiglia delle Bcl-2, come Bcl-2 e Bcl-XL.

È stato visto che non tutte le cellule cardiache soccombono all'attivazione dell'evento apoptotico. Si suppone che le cellule che sopravvivono siano capaci di interrompere tale processo, nonostante l'attivazione delle caspasi o il rilascio del Citocromo C (Narula J., et al 1996; Reed JC., et al 1999). Alcuni studi suggeriscono che questo blocco del processo potrebbe essere attribuito al raggiungimento di un nuovo equilibrio di tipo adattativo tra fattori pro- e anti-apoptotici attenuando in questo modo la stimolazione cronica data dai vari fattori di stress che agiscono sulla cellula (Giannessi D. 2011). La presenza di questo equilibrio adattativo è stata dimostrata nel tessuto cardiaco di modelli animali con SC (Prescimone T., et al 2011). I risultati di questo studio indicano che il processo apoptotico è attivo nei cuori scompensati, come mostrato dal significativo aumento di espressione di caspasi 3, ma questa attivazione non è accompagnata da un incremento di cellule apoptotiche o frammentazione del DNA. È stato ipotizzato che le cellule cercano di resistere agli stimoli apoptotici over-esprimendo molecole anti-apoptotiche come Bcl-2 o Hsp72, al fine di prevenire la completa attivazione del programma di morte cellulare (Giannessi D. 2011).

In tali condizioni di apparente "equilibrio" tra fattori pro e anti-apoptotici è stata valutata, da Prescimone e collaboratori, anche l'espressione di alcune citochine infiammatorie, quali IL-6 e TNF- α ed è emerso che è presente un significativo aumento di questi mediatori di infiammazione nel cuore scompensato rispetto al controllo ma l'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi, stimolata tali indici infiammatori, non era accompagnata dall'attivazione simultanea della via intrinseca che guida le cellule verso la formazione dell'apoptosoma e la morte cellulare, come mostrato dalla mancanza di aumento di espressione della Casp-9 (i livelli sono simili nei controlli e nei cuori scompensati) (Prescimone T., et al 2011).

Inoltre, la stimolazione dei miocardiociti con TNF- α sembrerebbe aumentare i livelli di NO. NO potenzialmente induce l'espressione di diversi geni cito-protettivi come HSP72, che protegge le cellule dall'apoptosi (Chung HT., et al 2001) bloccando il reclutamento della procaspasi 9 da parte dell'apoptosoma Apaf-1.

Anche se nel cardiomiocita scompensato è stata dimostrata l'attivazione dell' "equilibrio adattativo" come meccanismo per bloccare l'apoptosi, tanto resta ancora da chiarire sul ruolo dei vari fattori che risultano coinvolti in tale evento.

Necrosi

Oltre all'apoptosi, l'altro classico meccanismo di morte che si osserva a livello cellulare, è la *necrosi*. Questa viene definita come l'evidenziazione strutturale dell'avvenuta morte di gruppi di cellule nell'ambito di un tessuto (Pontieri 2010). L'evento necrotico determina la scomparsa dei limiti tra le cellule, alterazioni della struttura del tessuto che si trasforma in una massa compatta e amorfa, friabile, generalmente eosinofila, con pochi resti nucleari isolati (Pontieri 2010). In genere si va a distinguere la necrosi in: colliquativa (tipica del cervello), caseosa (tipica del granuloma tubercolare) e coagulativa (caratteristica morte ipossica del miocardio) tipica dell'evento ischemico, è caratterizzata dalla condizione per cui il tessuto conserva la propria architettura anche dopo la morte cellulare; soltanto in seguito il danno evolverà verso la colliquazione operata dai leucociti che arriveranno nell'aria colpita.

La cellula necrotica manifesta alterazioni sia a livello citoplasmatico che nucleare. Il citoplasma appare eosinofilo, con rigonfiamento dei vari organelli citoplasmatici, il nucleo si raggrinzisce (picnosi), la cromatina si raccoglie inizialmente a ridosso della membrana nucleare e solo dopo l'avvenuta morte cellulare si addensa in una massa compatta (Fig. 13). L'evento necrotico è caratterizzato dal susseguirsi di eventi "catastrofici" per la cellula che verrà così indotta, come conseguenza dell'evento ischemico, a morte. L'assenza di ossigeno e nutrienti determinerà l'arresto della produzione di ATP da parte del mitocondrio; questa deplezione di energia si traduce in riduzione funzionale delle pompe di membrana ATP-dipendenti, di conseguenza alterazione del potenziale di membrana, accumulo di Na⁺ intracellulare seguito da movimento di acqua per osmosi, da qui rigonfiamento della cellula e degli organelli tipici della necrosi.

La cellula tenta di rispondere al danno attivando le proteine da stress *Heat Shock proteins* (Hsp) che inibiscono la denaturazione delle proteine, conseguenza dell'acidificazione del citosol, e la distruzione delle stesse. Nel contempo si ha un incremento della concentrazione di ione Ca²⁺ a livello citosolico proveniente sia dai depositi intracellulari che dall'esterno. Questo determinerà l'attivazione delle fosfolipasi e conseguente danno alle membrane, ma si ottiene

anche l'attivazione di proteasi come le *calpaine*, idrolasi che vengono rilasciate dal lisosoma, ed endonucleasi. Il tentativo da parte delle Hsp di bloccare la distruzione della cellula risulta a questo punto inutile ed ad un certo punto la cellula muore.

In caso di SC si assiste, in corso di rimodellamento, ad un aumento della massa dei cardiomiociti che però non risulta sostenuta parallelamente da formazione di nuovi vasi, quindi il tessuto sottoposto a vari tipi di stress e poco supportato, in termini di contributi energetici, dalla circolazione andrà incontro a necrosi.

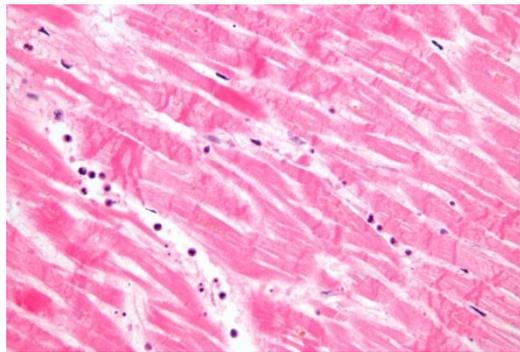


Figura 13: Necrosi coagulativa in miocardio infartuato. è possibile osservare la presenza di cellule necrotiche con nucleo in picnosi inoltre, in alcuni casi, è difficile distinguere i limiti tra le cellule. Modificato dal web.

Autofagia

L'autofagia si è evoluta come un processo di sopravvivenza cellulare (Maiuri MC., et al 2007). La cellula si degrada e ricicla i componenti plasmatici, quali le proteine e gli organelli, con ruolo protettivo e di "risparmio energetico".

Livelli basali di autofagia sono importanti per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Una disregolata autofagia è un rischio per la sopravvivenza cellulare, perciò l'autofagia deve essere finemente regolata.

Esistono vari tipi di autofagia:

- *Microautofagia*: sequestro di componenti citosoliche direttamente dai lisosomi attraverso invaginazione della loro membrana;
- *Macroautofagia*: particolare forma intracellulare di fagocitosi: si formano delle vescicole chiamate "autofagosomi" che sequestrano porzioni del citoplasma, organelli o microbi, e vengono trasferite ai lisosomi dove sono degradate. Per esempio, in assenza di nutrimento le cellule sono in grado di sopravvivere attraverso l'autofagia;

- *Chaperon-mediated autophagy* (CMA): traslocazione diretta di proteine "unfolded" attraverso una "chaperone" (Hsp 70) ed un recettore-canale di membrana (Lamp-2A). Degrada solo proteine solubili in maniera selettiva, che sono giudate attraverso il recettore-canale Lamp-2A dentro il lisosoma.

I geni coinvolti in questo processo sono stati identificati nel lievito e definiti *autophagy-related genes* (ATG), le proteine codificate da tali geni sono importanti per la produzione degli autofagosomi. La regolazione dell'autofagia è ancora poco conosciuta.

L'Autofagia può essere indotta da segnali ambientali, come nutrienti ed ormoni, ed anche da microbi patogeni. Diverse sono le chinasi che regolano l'autofagia tra cui quella più studiata è *target of rapamicina* (TOR), che regola negativamente il processo.

L'Autofagia gioca un ruolo importante nel cuore, dove è importante a bassi livelli per il *turnover* degli organelli in condizioni basali (Levine B., et al 2004). Nel cuore i livelli di autofagia possono essere alterati non solo in caso di stress indotto da ischemia riperfusione (Hamacher-Brady A., et al 2006; Matsui Y., et al 2007) ma anche da stress in associazione a ipertrofia e SC (Shimomura H., et al 2001). Apoptosi, necrosi e autofagia sono state contemporaneamente osservate nel cuore scompensato (Kostin S., et al 2003).

Tuttavia non è ancora ben chiaro se l'autofagia sia un percorso attuato dal cardiomiocita scompensato che ne favorisce la sopravvivenza oppure uno sia percorso suicida dello stesso (Nishida K., et al 2009).

In alcuni studi si è visto che in condizioni basali o di lieve stress, l'autofagia ha un ruolo cardioprotettivo perché rimuove dal citosol organelli danneggiati, come i mitocondri, che potrebbero rilasciare fattori pro apoptotici (Nishida K., et al 2009). Si è inoltre visto che in assenza di autofagia, le proteine che normalmente venivano eliminate tramite questa via, saranno ubiquitinate, ma non potendo essere degradate dal proteasoma si accumulano funzionando come fattore di stress sul reticolo endoplasmatico e conducendo la cellula a morte per apoptosi (Nakai A., et al 2007).

Tuttavia è stato anche dimostrato che un'esasperata attività autofagica indotta da stimoli importanti come stress provocato da ischemia riperfusione (Hamacher-Brady A., et al 2007), può portare alla distruzione di molti mitocondri e componenti citosolici e indurre nello stesso modo la cellula a morte per apoptosi.

In caso di un importante aumento pressorio (Zhu H., et al 2007) e durante la riperfusione di un tessuto ischemico (Matsui Y., et al 2007) è stata osservata un'aumentata espressione del gene Beclin 1 appartenente alla famiglia dei geni ATG, coinvolti nell'evento apoptotico.

La sovraespressione dei geni ATG è una condizione particolarmente grave che può mettere la cellula nelle condizioni di essere "incapace" di sopravvivere, degradando molte delle sue componenti proteiche e organelli, e avvia alla morte per apoptosi.

La relazione tra autofagia e apoptosi è molto complessa; entrambe sono regolate dagli stessi fattori. Bcl-2, fattore anti-apoptotico inibisce anche Beclin1 e quindi l'autofagia, questa proteina ATG interagisce anche con altri fattori appartenenti alla famiglia Bcl-2.

È stato osservato in *vitro* che nei cardiomiociti transgenici di topo in cui veniva sovraespressa Bcl-2 si bloccava sia l'apoptosi che l'autofagia nelle cellule (Pattingre S., et al 2005). Mutazioni del dominio BH3 di Beclin1 aboliscono l'inibizione su di esso da parte di Bcl-xl, avviando il processo autofagico nella cellula. Anche se sono diverse le prove che dimostrano questa relazione tra i due processi, molti sono i dubbi che dovranno essere chiariti (Nishida K., et al 2009). Molti restano i dubbi sulla azione dell'autofagia nello SC. Come detto l'evento autofagico è importante in caso di stress di media entità, per eliminare organelli e proteine danneggiate, allo stesso modo un incremento degli stimoli lesivi porta l'autofagia a trasformarsi in un suicidio cellulare più che una via di sopravvivenza.

Le ipotesi che stanno ora prendendo piede a tal riguardo, spiegano questo duplice ruolo dell'autofagia come conseguenza del fatto che molti sono i *pathway* molecolari che attivati possono portare ad autofagia. Quindi in base a quale via di trasduzione viene attivata verrà favorito un destino cellulare anziché l'altro; ma resta ancora molto da chiarire.

Hsp 70

Le *Heat shock proteins* (Hsp) sono una famiglia di proteine conservate nell'evoluzione che svolgono diverse funzioni all'interno della cellula: assicurano il corretto *folding* delle catene polipeptidiche appena sintetizzate sia a livello citosolico, che nel reticolo endoplasmatico e nel mitocondrio; aiutano al mantenimento o alla creazione di uno stato parzialmente denaturato della proteina favorendone così il trasporto attraverso le membrane dei differenti organelli citosolici; dirigono l'assemblaggio di complessi multi enzimatici; stabilizzano le proteine danneggiate formatesi a seguito di stress di natura fisica o chimica, determinandone o un *re-folding* o la degradazione.

Uno dei primi studi sulle condizioni di stress cellulare è stato condotto agli inizi degli anni sessanta (Ritossa FM. et al, 1964), esponendo ghiandole salivari di *Drosophila melanogaster* a temperature leggermente al di sopra di quelle ottimali per la crescita e lo sviluppo del moscerino e notando la formazione di rigonfiamenti localizzati dei cromosomi politenici. Tale evidenza suggeriva uno specifico cambio di espressione genica, con la trascrizione di geni codificanti per particolari proteine, definite *heat shock protein*. In seguito fu dimostrato che la

sintesi di queste proteine può essere stimolata anche da altre condizioni di stress tra cui: ipossia, ischemia, stress meccanico, presenza di specie ossidanti, presenza di agenti virali, aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare, ecc.

Alcune di queste proteine vengono espresse costitutivamente della cellula, altre invece sono sintetizzate solo in caso di uno specifico stimolo.

Le Hsp generalmente, vengono classificate sulla base del loro peso molecolare, si ottengono così 6 classi tra cui: Hsp100 (100-110 kDa), Hsp90 (83-90 kDa), Hsp70 (66-78 kDa), Hsp60, Hsp40 e le *small* Hsp (15-30 kDa). In realtà esiste un altro tipo di classificazione che porta a distinguere le Hsp in ATP dipendenti, tra cui Hsp 100, Hsp90 e Hsp 70, e le ATP indipendenti come le *small* Hsp.

Tra le diverse Hsp particolare interesse ha destato, per il suo coinvolgimento a livello cardiaco SC, la *chaperon* Hsp 70.

La famiglia delle Hsp 70 è ampiamente diffusa nei procarioti e negli eucarioti nei quali risulta presente sia a livello citosolico che nel mitocondrio e a livello del reticolo endoplasmatico.

Hsp appartenenti a questa famiglia e presenti nell'uomo sono: Hsp 72 (inducibile in seguito a stress), Hsp 70 (costitutivamente espressa), Hsp 75 (proteina mitocondriale) e GRP 78 (localizzata a livello mitocondriale).

Diverse sono le funzioni attribuite alle Hsp 70: legano le proteine *unfolded* assicurandone un cambiamento conformazionale, agiscono evitando l'aggregazione non funzionale delle stesse proteine *unfolded* e nel caso in cui questa erronea aggregazione si realizzi possono intervenire determinando la disgregazione di queste, cooperando con Hsp 100.

Alcuni studi hanno rivelato come le Hsp 70 possa essere considerata come marcatore clinico di SC, in quanto sono stati segnalati aumentati livelli circolanti di queste Hsp in casi avanzati di scompenso (Genth-Zotz S., et al 2004).

In un lavoro recente Li e collaboratori hanno dimostrato come i livelli di Hsp 70 siano aumentati già in stadi clinicamente precoci della malattia (Li Z., et al 2013).

L'Hsp 70 ha un ruolo cardioprotettivo e in alcuni modelli animali è stato registrato un incremento della sua espressione in seguito a danno ischemico (Troost SU., et al 1998).

È plausibile che HSP70 rappresenti un meccanismo protettivo non solo nelle manifestazioni acute, ad esempio associato a danni da ischemia e riperfusione a seguito di bypass coronarico (Dybdahl B., et al 2002), ma anche in pazienti sottoposti a stress in maniera cronica, come nello SC. È stato riferito che una riduzione della produzione di HSP70 può giocare un ruolo significativo nella riduzione della funzione contrattile durante lo sviluppo dello SC in un modello di ratto (Tanonaka K 2004).

Come noto il sistema neuroormonale ci permette di spiegare molti degli eventi che si osservano in corso di SC. È stato dimostrato in modelli animali che l'angiotensina II e la noradrenalina possono indurre la produzione di Hsp (Moalic JM., et al 1989; Meng X., et al 1996; Tanwar V., et al 2010). Inoltre evidenze sperimentali dimostrano come Hsp70 possa attivare il recettore CD14/*toll-like receptor* dei globuli bianchi inducendo il rilascio di citochine infiammatorie (Welch WJ. 1993). In particolari situazioni Hsp70 si ritrova anche nel circolo periferico, dove correla con i livelli di IL-6 e con la gravità della patologia (Giannessi D., et al 2007).

Non è ancora compreso il meccanismo mediante il quale l'Hsp70 lascia la cellula in seguito a stimolazione, si ipotizza che in seguito a danno o comunque ad una condizione di stress l'Hsp 70 approfitti di un'aumentata permeabilità della membrana e questo favorisca la sua uscita nell'ambiente extracellulare.

1.5.6 Il Metabolismo Cardiaco

Il cuore è un organo caratterizzato dalla funzione di pompa, dai processi di contrazione e rilasciamento delle cellule muscolari cardiache si sviluppano quelle forze che permettono al sangue di raggiungere i diversi distretti dell'organismo. Per svolgere questo vitale ruolo il cuore ha bisogno di un cospicuo contributo energetico; una qualsiasi condizione che determini una ridotta alimentazione di questo motore corrisponderà ad una deficienza della sua funzione.

Il lavoro di pompa del cuore richiede un dispendio energetico che si può desumere dalla quantità di adenosin trifosfato (ATP) consumata nel corso delle 24 ore. In condizioni fisiologiche, l'ATP utilizzato ammonta a circa 3,5-5 Kg al giorno. Pertanto il cuore necessita di un continuo rifornimento di ossigeno e nutrienti attraverso il circolo coronarico. Il metabolismo energetico del miocardio è molto complesso. Il cuore ricava energia "bruciando" grassi e/o zuccheri in condizioni diverse dipendenti dalla disponibilità o meno di glucosio in circolo. Il glucosio viene prevalentemente usato durante il periodo post-prandiale, quando la glicemia è alta e c'è rilascio di insulina che "invita" i vari tessuti a rimuovere rapidamente dal circolo sanguigno il metabolita. In fasi inter-prandiali, il cuore preferisce gli acidi grassi come combustibile per realizzare il suo lavoro.

L'acetil-CoA, ottenuta dal catabolismo del glucosio e degli acidi grassi rispettivamente attraverso glicolisi e β -ossidazione, viene avviata all'ossidazione nel mitocondrio attraverso il ciclo di Krebs, da cui si andranno a ricavare i prodotti di scarto del catabolismo cellulare, CO_2 e acqua. Inoltre, grazie a tutte le reazioni di ossido-riduzione che si realizzano nel ciclo dell'Acido Citrico, si andranno a ottenere equivalenti riducenti che, usando specifici trasportatori di elettroni (NAD/NADH, FAD/FADH₂), verranno indirizzati verso la catena respiratoria. Dal

trasferimento degli elettroni attraverso i complessi della catena respiratoria si crea energia, questa verrà immagazzinata come gradiente protonico ai due lati della membrana mitocondriale interna e sfruttata, infine, dall'ATP sintasi per formare ATP, partendo da ADP e P_i . Il trasporto e l'utilizzo dell'energia così prodotta dai mitocondri alle miofibrille richiede l'intervento di un sistema di chinasi conosciute come *Creatinchinasi*. Di questo enzima ne esistono diverse isoforme. La creatinchinasi mitocondriale (CK_{mit}) si occupa del trasferimento di un gruppo fosfato ad alta energia da una molecola di ATP ad una di *creatina*, ottenendo in questo modo ADP e *fosfocreatina (PCr)*. La creatina è sintetizzata dal fegato a partire da Arginina, S-adenosil metionina e glicina, è principalmente usata a livello muscolare per la rigenerazione di ATP, dopo che come appena descritto essa stessa venga convertita in PCr.

La PCr così prodotta diffonde rapidamente dal mitocondrio al citoplasma dove la sua concentrazione risulta in equilibrio con i livelli di ATP e ADP, in questo modo la PCr può funzionare come piccola riserva energetica presente nel muscolo, ma la PCr prodotta viene anche direttamente indirizzata alle miofibrille dove la CK miofibrillare si occuperà di usare questa riserva per ricostituire ATP, partendo da ADP e PCr.

L'energia così ottenuta è fondamentale per il cuore, sia per lo svolgimento della sua funzione contrattile, ma è necessaria anche per conservare l'impianto strutturale della cellula miocitica e per tutte le altre funzioni metaboliche ed elettrofisiologiche. Questa energia viene utilizzata per mantenere i gradienti ionici attraverso il doppio strato fosfolipidico attraverso la funzione di pompe ATP dipendenti, come N^+/K^+ ATPasi o Ca^{2+} ATPasi, il mantenimento del potenziale trans membrana garantisce alla cellula di poter svolgere diverse funzioni: generare potenziali d'azione, garantire la contrazione, favorire il movimento di molecole attraverso il doppio strato fosfolipidico.

L'apporto di metaboliti e la produzione di energia nel cuore sono eventi finemente regolati, visto che il cuore ha un carico di lavoro elevato e costante. Una deregolazione del metabolismo energetico, come si osserva in caso di SC, si traduce in uno stato di inefficienza funzionale e di "fame" energetica (Giannessi D. 2011). Grande importanza è stata data all'ipotesi secondo cui l'alterazione del metabolismo energetico possa giocare un ruolo importante tra i meccanismi che portano al rimodellamento cardiaco patologico e progressione dello SC. Infatti mutazioni in geni codificanti per le proteine coinvolte nel metabolismo energetico e nella produzione di ATP sono state identificate in casi di cardiomiopatia ipertrofica (Tanaka T., et al 2001; Taylor RW., et al 2000). Il rapporto tra PCr e ATP è considerato una misura del bilancio energetico; questo rapporto è alterato in caso di SC, a causa della ridotta attività della CK, con conseguente anomalia nella disponibilità di ATP (Weiss RG., et al 2005).

Il metabolismo energetico del cuore è strettamente regolato durante lo sviluppo e in risposta a diversi stimoli, sia fisiologici che patologici (Lehman JJ., et al 2002). Durante lo sviluppo, il cuore fetale funziona in condizioni di ipossia, ricava energia dal metabolismo anaerobio del glucosio e del lattato. Alla nascita, a seguito dell'aumentata richiesta energetica del miocardio, dovuta alle variazioni delle condizioni emodinamiche, il numero dei mitocondri e l'espressione delle proteine mitocondriali aumentano drasticamente, e l'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi diviene la principale fonte di ATP per il miocardio adulto (Giordano C., et al 2005). La possibilità di ottenere energia dall'ossidazione degli acidi grassi, richiede l'espressione dei geni che sono implicati in tale via oltre all'espressione dei vari elementi che fanno parte della catena respiratoria mitocondriale. Da diversi studi condotti sono stati identificati alcuni di questi geni, la cui espressione viene indotta dopo la nascita, tra cui *peroxisome proliferator-activated receptor- α* (PPAR α) e il suo coattivatore PPAR γ -1, detto anche PGC-1 α , considerati tra i più importanti regolatori dell'espressione dei geni dell'ossidazione degli acidi grassi e della biogenesi mitocondriale (Barger MP., et al 2000; Lehman JJ., et al 2000).

I livelli di espressione di questi due geni aumentano sia dopo la nascita ma anche in seguito ad una aumentata richiesta di ATP del cuore dell'adulto, come nel caso di digiuno o esercizio fisico. In caso di rimodellamento cardiaco, nel corso dell'ipertrofia del ventricolo si nota una riduzione dell'espressione di questi stessi geni e il metabolismo cardiaco assume di nuovo le caratteristiche tipiche della vita fetale in cui abbiamo una drastica riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi (Fig.14). Questa "regressione" metabolica avviene in parallelo con la riespressione di isoforme fetali di una varietà di altri geni, come quelli che codificano per le proteine contrattili. Questa iniziale risposta del cuore ipertrofico potrebbe essere intesa come una risposta adattativa alla mancanza di ossigeno, in cui si ritorna a fare prevalentemente uso di glucosio e al suo catabolismo anaerobio per la produzione di ATP.

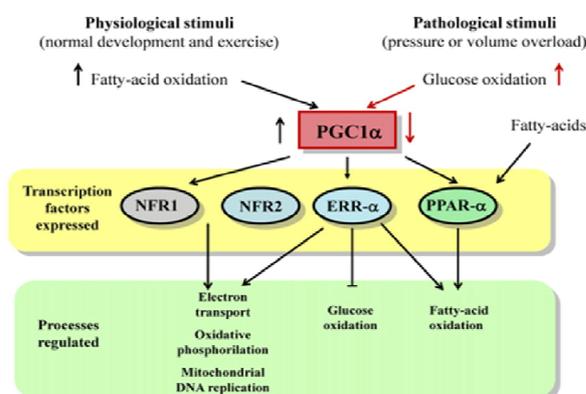


Figura 14: Differenti pattern di ossidazione e cascate di traduzione del segnale tra uno stato fisiologico (sinistra) e di SC (destra). Modificato da Mudd e Kass, 2008.

L'uso del glucosio per la produzione in anaerobiosi di ATP, si registra nelle primissime fasi di insorgenza dello SC; nel tempo il miocardio andrà incontro ad una sorta di resistenza dell'insulina che limiterà la sua capacità ad assumere glucosio.

Dunque in caso di SC e progressione del rimodellamento si osservano importanti modifiche alla normale attività metabolica del cuore, ridotto utilizzo degli acidi grassi per la produzione di energia a causa di una alterata espressione genica, iniziale uso di glucosio che si riduce però al procedere dello scompenso, ed infine come già detto, il rapporto tra PCr e ATP è notevolmente ridotto, come conseguenza di ridotta funzionalità della CK. In particolare rispetto ai livelli fisiologici si registra una riduzione della funzionalità della CK_{mit} del 20%, mentre un calo del 50% si registra per quanto riguarda l'attività CK miofibrillare. In questo modo la possibilità di ricreare ATP dalle riserve energetiche di PCr viene notevolmente ridotta.

Tutto questo non fa altro che alterare la funzionalità del cuore scompensato, che non è più in grado di contrarsi correttamente sia per le modifiche strutturali a cui va incontro ma anche a causa di una diminuzione dell'energia necessaria per contrarsi.

Un'altra caratteristica importante che influenza la disponibilità di energia è la densità di capillari nel muscolo cardiaco (Giannessi D. 2011). In un modello animale di ipertrofia, il rimodellamento cardiaco è risultato strettamente dipendente ad una inefficace risposta dell'angiogenesi alla crescita muscolare (Shiojima I., et al 2005). L'equilibrio tra ipertrofia (crescita muscolare) e densità capillare (apporto di nutrienti) è parzialmente regolato dal fattore di trascrizione GATA 4, che ha un ruolo importante nella stimolazione dell'angiogenesi (Heineke J., et al 2007). Così, la modulazione dell'equilibrio tra fattori pro- e anti- angiogenetici potrebbe essere rilevante come un nuovo target terapeutico in alcuni stadi dello SC (Mudd JO., et al 2008).

1.6 Il ruolo dell'infiammazione nello Scompenso Cardiaco

L'infiammazione o flogosi costituisce una risposta dei tessuti connettivi vascolarizzati a stimoli di natura endogena o esogena che causano danno e rappresentano un processo di estrema importanza per garantire l'integrità dei tessuti. Il suo significato ultimo è, infatti, duplice: difesa e riparo (Rugarli 2010). La risposta infiammatoria innescata in seguito al danno ai tessuti è un processo programmato che ha come obiettivo: eliminare o contenere la causa iniziale del danno; rimuovere le cellule morte e i detriti della matrice; riparare i tessuti danneggiati attraverso o la formazione di cicatrici, con la fibrogenesi, o la guarigione senza cicatrice, attraverso la rigenerazione dei tessuti. Tutte queste attività permettono il ripristino della

struttura e della funzione originale dell'organo danneggiato (Leibovich SJ., et al 1976; Eming SA., et al 2009).

Il processo infiammatorio può essere: acuto o cronico.

L'infiammazione acuta, che si sviluppa nel giro di pochi minuti o poche ore, è accompagnata da formazione di edema e dal reclutamento di leucociti (principalmente neutrofili) nell'area danneggiata. L'infiammazione cronica è un processo di più lunga durata in cui in generale predomina l'accumulo di linfociti e macrofagi; essa risulta essere spesso accompagnata dal rimodellamento dei tessuti con fibrosi (Rugarli 2010).

L'infiammazione rappresenta un processo biologico che gioca un ruolo fondamentale in quasi tutti gli aspetti che caratterizzano le malattie cardiovascolari, compreso lo SC (Jiang B., et al 2010).

Lo SC viene spesso definito come un processo caratterizzato da un persistente evento infiammatorio, con elevati livelli circolanti di citochine pro- e anti-infiammatorie. L'attivazione della risposta infiammatoria nello SC può essere la conseguenza della presenza di antigeni riconosciuti come possibili elementi nocivi (come in caso di miocarditi acute o reazioni di rigetto del trapianto), oppure l'infiammazione si può attivare come risposta ad eventi che danneggiano il miocardio (come nel caso di infarto).

Lo SC rappresenta il punto d'arrivo di una serie di insulti al miocardio di vario tipo, tra i quali l'infarto del miocardio è la causa più comune (Jiang B., et al 2010).

Dopo un infarto al miocardico o danno da ischemia-riperfusion, le cellule danneggiate attivano una serie di segnali di flogosi tramite la produzione di chemochine e citochine (i mediatori dell'infiammazione) per reclutare i leucociti, tra cui neutrofili e monociti/macrofagi, in modo da liberare la zona infartuata dalle cellule morte e dai detriti di matrice (Jiang B., et al 2010). Questa reazione infiammatoria è attivata con l'obiettivo di riparare e guarire il tessuto danneggiato. Tuttavia, a livello del cuore il processo di riparazione e completa guarigione del tessuto contrattile risultano complicati non solo dalla limitata capacità rigenerativa dei cardiomiociti, ma anche dal fatto che il cuore non può cessare la contrazione durante queste fasi. Di conseguenza lo spazio vuoto che viene lasciato dalle cellule morte deve essere immediatamente sostituito per impedire la rottura del ventricolo, da qui la deposizione di materiale fibrotico e formazione di cicatrice cardiaca (Jiang B., et al 2010). Quindi i risultati di guarigione dell'infarto si manifestano in un profondo rimodellamento molecolare e strutturale, con formazione di cicatrici per sostituire i cardiomiociti persi nella zona infartuata e ipertrofia della zona non infartuata accompagnati da dilatazione della camera ventricolare e *up-regolazione* dell'espressione genica fetale (Jennings RB., et al 1995).

Il successivo aumento cronico nell'infiammazione tissutale ha come risultato una continua fibrosi e perdita di cardiomiociti e contribuisce al rimodellamento cardiaco "avverso" e, in ultima analisi, allo sviluppo di SC (Jiang B., et al 2010).

Il sistema infiammatorio lavora in sinergia con quello dell'immunità innata: questi rappresentano due processi intimamente connessi e in generale indistinguibili. Le strategie che vengono usate dal sistema dell'immunità innata e dal sistema infiammatorio per riconoscere l'eventuale presenza di un agente patogeno o comunque un tessuto danneggiato sono legate all'espressione di molecole recettoriali dette *Pattern Recognition Receptor* (PRR), questi attivano immediatamente la risposta difensiva dell'organismo al fattore lesivo. I PRR si distinguono in: recettori solubili (come fattori del complemento, pentraxine), recettori di membrana (come i *Toll-like receptors TLR*), e recettori citoplasmatici (appartenenti alla famiglia NOD). Questi recettori sono principalmente espressi sulle cellule del sistema immunitario, tra cui macrofagi e cellule dendritiche, ma possono essere espressi anche in altri tipi cellulari.

Il "*danger model*" proposto da Matzinger ha suggerito che la presenza dei soli contenuti potenzialmente infettivi e/o di elementi danneggiati non è sufficiente per attivare il sistema immunitario senza un appropriato segnale di allarme da parte delle cellule o tessuti stressati o danneggiati (Matzinger P. 1994) che potenzia questa stimolazione. Secondo tale modello le cellule adiacenti al tessuto infettato o danneggiato riescono a percepire la presenza di fattori di stress rilasciate dalle stesse cellule morenti. Tali elementi servono come segnali di allarme che avviano la risposta infiammatoria interagendo con le molecole PRR. A livello cardiaco risultano espressi i recettori TLR-2, -3, -4 e -6 (Jiang B 2010). In caso di danno ischemico al cuore, le cellule necrotiche possono rilasciare ad esempio *high-mobility group box protein 1* (HMGB1), una proteina nucleare non istonica ubiquitariamente e altamente espressa nella maggior parte dei tipi cellulari (Rovere-Querini P., et al 2004). Questa può attivare la risposta infiammatoria nelle cellule circostanti attraverso il TLR4 *signaling* (Tsong A., et al 2005; Kaczorowski DJ., et al 2009). Anche frammenti della matrice rilasciati in seguito alla lesione del tessuto sono in grado di attivare questi recettori.

Il recettore TLR4, in risposta ai segnali di pericolo, avvia una cascata di chinasi che termina con l'attivazione del fattore nucleare NF- κ B, un fattore di trascrizione essenziale che regola l'espressione di numerosi geni infiammatori come molecole di adesione, chemochine e citochine. NF- κ B è critico per innescare l'infiammazione ed è coinvolto nella cardioprotezione e nel processo di guarigione post-infarto (Jiang B., et al 2010).

Dunque i segnali rilasciati dalle cellule morenti in sinergia con chemochine e citochine ottenute da cellule vicine all'area danneggiata risultano in uno stimolo iniziale sufficiente ad una efficace attivazione (con reclutamento dei globuli bianchi) del processo infiammatorio.

1.6.1 Citochine infiammatorie

Con il termine di citochine vengono indicate una serie di mediatori chimici, polipeptidici, non antigeni specifici che agiscono come segnali di comunicazione fra le cellule del sistema immunitario fra diversi organi e tessuti. Originariamente si riteneva che questi mediatori chimici fossero prodotti e secreti solo dalle cellule del sistema immunitario, in realtà si è visto come le citochine siano sintetizzate anche dai diversi organi e tessuti.

La produzione delle citochine è transitoria, in genere agiscono a breve distanza e di regola non si trovano in quantità importanti in circolo in condizioni normali. Molte citochine sono pleiotropiche, agendo su una grande varietà di cellule e tessuti; alcune di esse pur essendo strutturalmente molto diverse hanno funzione sovrapponibile. Queste condizioni però non rappresentano delle caratteristiche assolute per le citochine, infatti il *Transforming Growth factor-β* (TGF-β) risulta essere presente nella circolazione periferica anche in condizioni fisiologiche; interleuchina (IL)-6 è prodotta in risposta a segnali infiammatori locali, ma agisce a distanza sul fegato.

La classificazione delle citochine può essere fatta usando criteri diversi: caratteristiche strutturali, la classe di recettori riconosciuta, e le loro caratteristiche funzionali.

Da un punto di vista funzionale le citochine possono essere classificate come:

- Citochine ematopoietiche
- Citochine dell'immunità specifica
- Citochine infiammatorie primarie
- Citochine anti-infiammatorie
- Chemochine

1.6.1.1 Le citochine infiammatorie primarie

Le citochine infiammatorie primarie, tra cui IL-1, TNF-α e IL-6 costituiscono dei mediatori fondamentali. In generale, queste citochine sono pleiotropiche, agendo su una varietà di tessuti diversi; inoltre, nonostante il fatto che queste tre molecole interagiscono con recettori strutturalmente diversi, le loro attività si sovrappongono (Rugarli, Medicina interna sistematica 2010).

Insieme a IL-1, il TNF-α viene rilasciato immediatamente in caso di insulto/danno all'organismo mettendo in movimento l'intera cascata di mediatori caratteristici dell'infiammazione. Questi mediatori hanno azione locale, reclutando nel tessuto danneggiato dei leucociti. IL-6 agisce come fattore secondario, rispetto a TNF-α e IL-1, agendo sul fegato infatti permette la produzione delle proteine di fase acuta, le quali amplificheranno così a livello sistemico i

meccanismi dell'immunità innata. Come molti segnali biologici, le citochine pro-infiammatorie sono in grado di attivare la risposta desiderata sulla cellula/tessuto *target* e nello stesso tempo sono altrettanto efficaci nell'attivare una risposta di "spegnimento" del loro rilascio e quindi della loro azione.

Un primo circuito di spegnimento è costituito dall'induzione dell'espressione di citochine anti-infiammatorie come: IL-10 o TGF- β . Un altro circuito è rappresentato dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Infatti TNF- α e IL-1 agiscono sull'ipotalamo inducendo la produzione di *releasing factors*, che provocano a livello ipofisario la produzione dell'ormone adrenocorticotropo. Questo agendo a livello del surrene stimolerà il rilascio di glucocorticoidi i quali sono in grado di spegnere la produzione delle citochine su dette.

Nel 1990, Levine e collaboratori hanno documentato una correlazione positiva tra TNF- α e SC (Levine B., et al 1990). Da allora la ricerca ha individuato la relazione tra altre citochine e lo SC. L'interesse per la comprensione del ruolo di mediatori infiammatori nello SC deriva dall'osservazione che in realtà molti aspetti di questa patologia possono essere spiegati tramite l'intervento di questi fattori. In particolare è stato osservato che se queste citochine sono presenti ad elevati livelli, così come in caso di infarto, sono capaci di indurre alcuni degli aspetti tipici delle SC come: progressiva disfunzione del ventricolo sinistro, edema polmonare, rimodellamento del ventricolo sinistro, espressione di geni tipici dello stadio fetale e cardiomiopatie (Thaik CM., et al 1995; Bozkurt B, et al 1998).

Si è affermato così un nuovo modello per spiegare i complessi meccanismi che si registrano durante lo SC, il "modello dell'infiammazione" il quale si affianca a quello neurormonale. In questo nuovo modello viene evidenziato l'effetto citotossico esercitato dalle cascate di citochine endogene sul cuore che hanno un'azione deleteria si registra solo in caso di una sovraespressione di queste stesse citochine (Mann DL. 2002).

Tumor necrosis factor (TNF)

Il TNF deve il suo nome all'attività necrotizzante esplicita nei confronti di alcuni tumori sperimentali (Rugarli, Medicina interna sistematica 2010). Il ruolo principale del TNF però non è quello necrotizzante ma fa parte della categoria di citochine definite "pro-infiammatorie".

Il TNF presenta due isoforme: TNF- α e TNF- β (conosciuta come linfotossina perché prodotta solamente dalla cellule linfoidi).

Il TNF- α viene sintetizzato in massima parte dai macrofagi, ma la sua sintesi è legata all'attività di altri tipi cellulari tra cui anche le cellule miocardiche. Il TNF- α è sintetizzato come un precursore di 26 kDa ed è una proteina transmembranaria di tipo II, cioè presenta l'estremità

N-terminale all'interno della membrana plasmatica. Il TNF- α arriva alla membrana cellulare come omotrimerico, ed è così che viene esposto sul versante extracellulare (Rugarli 2010).

L'azione dell' TNF- α *Converting Enzyme* (TACE), appartenente alla famiglia delle metallo proteinasi, agisce sull'omotrimerico di membrana dando origine alla forma solubile nei liquidi biologici di 17 kDa. Sia la forma di membrana che la forma solubile di TNF- α risultano comunque capaci di legare il loro recettore e di attivare la risposta del tessuto target.

I recettori per il TNF- α sono di due tipi: il recettore di tipo I (TNFR I o p55) e il recettore di tipo II (TNFR II o p75). Come detto il TNF- α viene espresso sulla membrana come omotrimerico e come tale si ritrova nella forma solubile, nel momento in cui contatta il recettore ne causa la multimerizzazione e così può essere trasdotto il segnale nella cellula target.

Il TNFR1, insieme al recettore Fas, fa parte della famiglia dei recettori di morte la cui attivazione può determinare l'avvio della via estrinseca dell'apoptosi. Espresso in tutte le cellule dell'organismo tale recettore risulta avere, principalmente, attività citotossica e antivirale.

Nel momento in cui TNF- α lega TNFR I questo trimerizza e fa partire così un segnale intracellulare. La prima proteina a essere reclutata è *TNFR1-associated death domain protein* (TRADD) che funge da piattaforma di reclutamento di altri mediatori come *receptor interacting protein 1* (RIP1), *Fas-associated death domain protein* (FADD) e *TNF-receptor associated factor 2* (TRAF2). Grazie a FADD, il recettore attivato da ligando darà avvio al segnale pro-apoptico favorendo l'attivazione della caspasi 8 (come descritto nella via estrinseca dell'apoptosi). Diversamente da FADD, l'attivazione di TRAF2 favorisce l'avvio dei segnali di sopravvivenza.

TRAF2 è coinvolto anche nella via di trasduzione del segnale del TNFR-II (recettore che è espresso principalmente da cellule endoteliali e cellule dell'immunità immediata) attivato; quindi, da questo livello in poi (e solo per la via del segnale mediata da TRAF2) l'attività dei due recettori di TNF risulta sovrapponibile.

L'azione di TRAF 2 nelle 2 vie sarà importante per l'attivazione di un fattore trascrizionale NF- κ B, coinvolto nell'induzione dell'espressione di molti geni i cui prodotti sono coinvolti principalmente nei processi di flogosi, tra cui: citochine, chemochine, molecole adesive, NO sintasi inducibile e fattore tissutale.

Nello specifico l'azione di TRAF2 attiverà alcune chinasi citosoliche, conosciute come IKK1 e IKK2 che risultano normalmente complessate con la proteina inibitoria NEMO. Il complesso chinasi IKK1/IKK2 attivo agisce fosforilando l'inibitore di NF- κ B (I κ B) che verrà così inattivato lasciando libero il fattore trascrizionale di migrare nel nucleo e legarsi a promotori dei geni target.(Fig. 15).

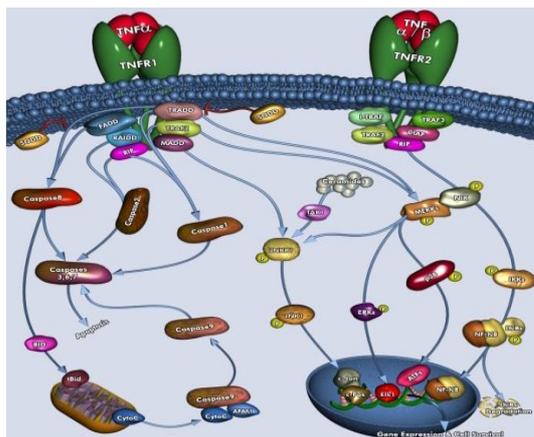


Figura 15: Vie di trasduzione del segnale del TNF-alfa. Pathway attivato dal TNFR I a sinistra. Via attivata da TNFR II a destra. Modificato dal web.

Sia TNFR-I che TNFR-II una volta attivati inducono come descritto l'avvio di cascate di chinasi le quali coinvolgono anche le MAPK. Questa via, stimolata, converge nell'attivazione di ulteriori fattori trascrizionali come: c-Jun, c-Fos, ERK, i quali permetteranno l'espressione di geni i cui prodotti saranno importanti per la risposta infiammatoria.

Ruolo del TNF- α nello SC

L'osservazione che le citochine pro-infiammatorie siano in grado di modulare la funzione del ventricolo sinistro è stata segnalata per la prima volta da una serie di importanti studi sperimentali i quali dimostrarono che iniezioni dirette di dosi di TNF possono determinare ipotensione, acidosi metabolica, emocoagulazione e la morte in pochi minuti, imitando così la risposta cardiaca/emodinamica vista durante shock settico indotto da endotossina (Tracey KJ., et al 1986). Gli studi condotti su cani hanno dimostrato che una singola infusione di TNF- α si traduce in anomalie della funzione sistolica entro le prime 24 ore dall'iniezione (Natanson C., et al 1989; Pagani FD., et al 1992).

Studi sperimentali sui ratti hanno dimostrato inoltre, che concentrazioni circolanti di TNF- α che coincidono con quelle osservate nei pazienti con SC sono sufficienti a produrre effetti persistenti inotropi negativi, che sono rilevabili a livello dei cardiomiociti (Mann DL. 2002). Gli effetti inotropi negativi del TNF- α sono completamente reversibili, infatti quando si interrompono le iniezioni gli effetti prima visti si attenuano (Bozkurt B, et al 1998).

Per quanto riguarda i potenziali meccanismi attraverso cui il TNF- α determina i suoi effetti deleteri sulla funzione ventricolare sinistra sono state suggerite due diverse vie: 1) un percorso rapido, che si manifesta in pochi minuti, mediato dall'attivazione della via di segnalazione dipendente dalla sfingomielinasi e da NO (Oral H., et al 1997); 2) un percorso tardivo, che

richiede ore o giorni per svilupparsi, ed è mediato sempre dal NO che indebolisce la stimolazione β -adrenergica sul cuore. (Gulick TS., et al 1989; Balligand JL., et al 1993).

La funzione della sfingomielinasi è quella di catalizzare l'idrolisi della sfingomielina nella membrana cellulare, producendo in tal modo ceramidi, come la sfingosina. Questo lipide, poi, funge da secondo messaggero intracellulare, soprattutto in due situazioni di importanza biologica: il differenziamento cellulare dei tessuti e la morte cellulare programmata o apoptosi (Vittorini S., et al 2011). La sfingosina possiede anche un effetto inotropo negativo sui miocardiociti isolati; questa azione sembra dovuta al blocco del recettore della rianodina, riducendo in questo modo il rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico (Hedayat M., et al 2010). Gli effetti inibitori sulla contrazione miocardica a lungo termine, sono dovuti sempre al NO, la cui espressione attraverso la NO-sintasi calcio dipendente è indotta dal TNF- α .

Il monossido d'azoto interagisce con la guanilil ciclasi e induce la sintesi di cGMP (guanosina 3'-5' monofosfato ciclico), questo riduce la forza contrattile stimolando l'attività ionica che espelle dal citosol gli ioni calcio.

Il TNF- α contribuisce allo SC non solo modulando la capacità contrattile del cuore ma può indurre la morte cellulare per apoptosi (attraverso il percorso estrinseco che parte dal TNFR I).

Oltre agli effetti appena descritti, ci sono diversi studi che suggeriscono come il TNF possa promuovere rimodellamento del ventricolo sinistro attraverso modifiche nella ECM (Mann DL. 2002). Quando concentrazioni di TNF equivalenti a quelle osservate nei pazienti con SC (concentrazioni superiori a 10^{-7} M) sono infuse nei ratti si osserva un cambiamento, tempo-dipendente, delle dimensioni del ventricolo sinistro che sono accompagnate da una progressiva degradazione della ECM (Mann DL. 2002). Questo stesso risultato è stato ottenuto con topi transgenici in cui veniva sovraespresso il gene che codifica per la citocina pro-infiammatoria.

Sia il TNF- α che la IL-1 β diminuiscono la sintesi del collagene e l'espressione di mRNA del procollagene in cellule cardiache in cultura, sia neonatali che adulte (Siwik DA., et al 2000).

Tuttavia, il TNF- α mostra un'azione bifasica, che si esplica mediante uno sbilanciamento di meccanismi che possono indurre da una parte la sintesi della matrice extracellulare e dall'altra la sua degradazione (Siwik DA., et al 2004). Questo effetto bifasico è influenzato dal tempo di esposizione. Nel breve periodo, il TNF- α induce l'attivazione delle MMPs con degradazione della matrice e progressiva dilatazione del ventricolo (Hedayat M., et al 2010). La progressiva perdita della matrice che circonda le singole cellule miocardiche determina uno slittamento/disorganizzazione dei fasci di miofibrille nella parete del ventricolo (Weber KT., Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. 1989) e conseguente riduzione della capacità contrattile.

Una stimolazione cronica di TNF- α diversamente induce la deposizione di collagene e la produzione di una cicatrice fibrotica (Mann DL. 2002). Anche se ancora non sono completamente chiari i meccanismi che portano a questo cambio di funzione della citochina, è stato osservato che in caso di stimolazione cronica i livelli delle MMPs diminuiscono mentre aumentano i livelli di espressione dei TIMPs. In tutto ciò risulta coinvolta l'attività di TGF- β il quale è capace di indurre fibrosi cardiaca (Creemers EE., et al 2011).

Interleuchina (IL)-1

IL-1, citochina pro-infiammatoria, è presente in due isoforme, codificate da geni distinti, l'IL-1 α e l'IL-1 β . Queste molecole hanno attività simile e interagiscono con gli stessi recettori benché dal punto di vista strutturale abbiano un'omologia di sequenza solo del 20% (Rugarli, Medicina interna sistematica 2010). Sia IL-1 α che IL-1 β vengono sintetizzate come pro-peptidi di circa 33 kDa, questi saranno poi processati all'interno della cellula in molecole mature di 17 kDa e poi rilasciati nell'ambiente extracellulare, attraverso un processo non convenzionale, dato che IL-1 β non ha una sequenza segnale. Il pro-peptide IL-1 β viene processato da una caspasi definita *IL-1 Converting Enzyme* o ICE.

I principali produttori di IL-1 sono monociti/macrofagi, anche se questa citochina viene espressa da diversi tipi cellulari. Similmente a quanto descritto per il TNF- α sono diversi gli stimoli che portano al rilascio di IL-1, la presenza di "detriti" di cellule morte e della matrice, ma anche antigeni microbici possono indurre l'attivazione dei TLR e da qui il rilascio di questa citochina. È stato anche visto che il rilascio di IL-1 è indotto dalla stessa IL-1 e dal TNF- α ; si innesca così un meccanismo di amplificazione della risposta all'evento lesivo.

La famiglia delle IL-1 comprende, oltre a IL-1 α e IL-1 β , anche un antagonista recettoriale, *IL-1 Receptor Antagonist* o IL-1ra. Questo è prodotto dalle stesse cellule che producono IL-1 e la sua produzione è indotta dagli stessi segnali che portano al rilascio della citochina infiammatoria. IL-1ra è un antagonista di IL-1 in quanto si lega allo stesso recettore della citochina pro-infiammatoria, ma non attiva la risposta biologica nella cellula target.

Il recettore di IL-1, costituito da due catene: IL-1RI e la catena accessoria (AcP), è una proteina transmembranaria dotata di un sito di legame al ligando nel versante extracellulare, un dominio che attraversa il doppio strato fosfolipidico e il dominio intracellulare conosciuto come *Toll-IL-1 receptors* (TIR) necessario per la trasduzione del segnale.

In presenza di IL-1, le due catene recettoriali formano un complesso che favorisce l'attivazione della trasduzione del segnale. IL-1ra lega IL-1RI, ma non ne favorisce l'associazione con AcP, impedendo in tal modo l'attivazione di tale segnale. Esiste un secondo recettore per IL-1 che

può essere espresso sulla membrana cellulare o rilasciato in circolo, il IL-R II definito anche come *decoy receptor*. Questo recettore è in grado di interagire con la citochina impedendone l'effetto biologico in quanto non è in grado di far partire alcun segnale intracellulare. La presenza di questi elementi di regolazione negativa di IL-1 sottolinea l'importanza di questa molecola la cui azione è potenzialmente devastante per l'integrità dell'organismo.

IL-1 interagendo con il suo recettore attiva una cascata di trasduzione del segnale che è centrata sull'adattatore MyD88. Grazie al suo dominio TIR, MyD88 interagisce con IL-RI, mentre con il suo dominio DD recluta attivandole alcune chinasi come *IL-1 Receptor Activated Kinase* (IRAK). Questa fosforila, attivando, un adattatore TRAF 6 che recluta altre chinasi. Il fine di questa cascata di chinasi sarà l'attivazione di alcuni fattori trascrizionali tra cui NF- κ B (come visto per TNF- α).

Ruolo dell'IL-1 nello SC

IL-1 è una delle citochine pro infiammatorie che rivestono un ruolo importante per l'attivazione della complessa rete di meccanismi che si verificano nell'evento flogistico. Questa è una proteina pleiotropica e molte delle sue funzioni sono sovrapponibili a quelle del TNF- α , sia per quanto riguarda il ruolo "protettivo" delle citochine sia per quanto riguarda il loro coinvolgimento nei meccanismi che portano allo SC.

Elevati livelli di IL-1 possono esercitare, nel cuore danneggiato, un effetto inotropo negativo che sommandosi all'azione TNF- α riduce sensibilmente la capacità contrattile del cuore.

L'esposizione cronica ad aumentati livelli di IL-1 induce una riduzione sia dell'espressione genica che dei livelli tissutali di SERCA (calcio ATPasi del reticolo sarcoplasmatico) e del fosfolambano. La diminuzione del SERCA è a sua volta responsabile di una alterata rimozione degli ioni calcio dal citoplasma e, di conseguenza, di un ridotto rilascio di calcio dal reticolo (Vittorini S., et al 2011) (Fig. 16). In tal modo, la concentrazione di ioni calcio disponibile all'apparato contrattile in sistole è ridotto, mentre in diastole le concentrazioni dello ione sono elevate rispetto alle condizioni fisiologiche.

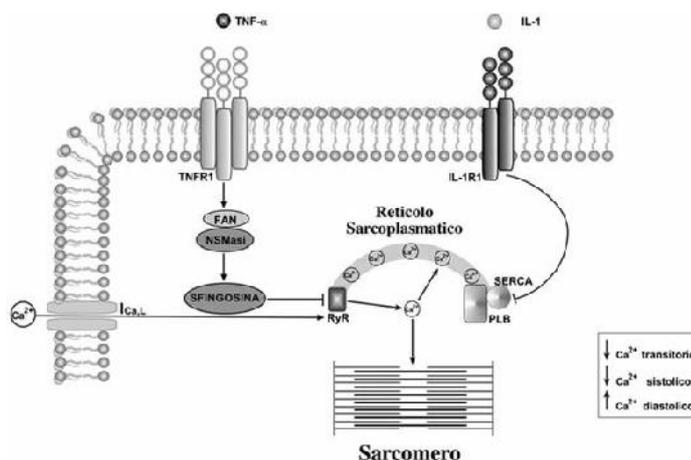


Figura 16: Azioni del TNF- α e dell'IL-1 nei confronti dell'apparato contrattile del cuore. Modificato da Vittorini S., et al 2011.

Oltre a funzionare come fattore inotropo negativo IL-1 sembra coinvolto anche nel rimodellamento del miocardio inseguito a danno (come danno da ischemia/riperfusion); infatti, nelle fasi iniziali del danno insieme al TNF- α , può indurre una riduzione della sintesi e deposizione di collagene nell'ECM favorendo in questo fasi precoci la dilatazione del ventricolo. Studi *in vitro* hanno infatti dimostrato come l'esposizione ad elevati livelli di citochine pro infiammatorie, sia il TNF- α che la IL-1 β , diminuiscono la sintesi del collagene e l'espressione del mRNA del procollagene in cellule cardiache in cultura, sia neonatali che adulte (Siwik DA., et al 2000).

La letteratura diversa sono gli esperimenti che riconoscono a IL-1 un ruolo nell'attivazione del programma di morte cellulare della cellula cardiaca. IL-1 induce apoptosi in cellule in cultura attraverso l'attivazione della NO sintasi (Ing DJ., et 1999), e all'aumento dello stress ossidativo sulla cellula conducendola a morte.

È stato, inoltre, dimostrato che nel sito del danno cardiaco risulta essere espresso oltre a IL-1 anche il suo antagonista IL-1ra in modo da attenuare potenzialmente gli effetti di IL-1 dopo infarto miocardico acuto (Bonetti A., et al 2008). Questi dati suggeriscono che un meccanismo anti-infiammatorio endogeno può essere coattivato per bilanciare il grado di risposta infiammatoria tissutale. Sulla base di questi dati, studi recenti dimostrano che la somministrazione di IL-1ra ricombinante o la sovraespressione di IL-1ra è in grado di ridurre l'apoptosi dei cardiomiociti danneggiati in modelli animali (Abbate A., et al 2008).

Interleuchina (IL)-6

IL-6 appartiene alla famiglia delle citochine pro infiammatorie. Questa citochina, che ha un peso molecolare di 16 kDa, viene sintetizzata da diversi tipi cellulari ma principalmente è espressa in cellule monocitiche macrofagiche. IL-6 compare dopo le altre due citochine pro infiammatorie e sembra svolgere il ruolo di mediatore a livello sistemico di molte attività di IL-1 e TNF- α .

Il recettore per IL-6 è costituito da due catene: il gp130 e IL-6 α . Mentre il gp130 è espresso da tutte le cellule dell'organismo e può interagire con altri recettori che riconoscono altre citochine (quindi lo si può considerare come la parte aspecifica del recettore), IL-6 α è la catena del recettore che si occupa del riconoscimento del ligando. IL-6 α è presente associato alla membrana, nelle cellule del sistema immunitario, ma si può trovare anche in una forma solubile. Una volta formato il complesso IL-6/IL-6 α questo si associa a gp130 e a questo punto potrà partire il segnale intracellulare.

IL-6 agisce principalmente attraverso la via delle JAK/STAT determinando l'attivazione della trascrizione di geni target di versi a seconda del tipo di tessuto (Fig. 17).

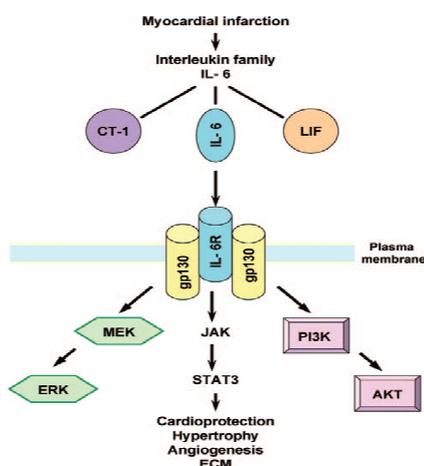


Figura 17: Pathway di trasduzione del segnale attivato dalla famiglia di IL-6 a livello cardiaco in seguito ad infarto. Modificato da Jugdutt BI. 2010

IL-6 agisce come fattore di crescita ematopoietico, favorendo la differenziazione megacariocitaria e la proliferazione dei linfociti T e B. IL-6 agisce anche sull'endotelio vascolare amplificando l'espressione di molecole adesive e chemochine; si comporta da mediatore degli effetti a livello sistemico delle altre due citochine pro infiammatorie ed induce a livello epatico la produzione delle proteine di fase acuta.

Ruolo dell'IL-6 nello SC

IL-6 svolge un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza cellulare, della crescita e della differenziazione in vari tipi cellulari (Kamimura D., et al 2003).

A livello cardiaco, diversi studi hanno rilevato come, sia negli uomini che in modelli animali, sia possibile registrare elevati livelli di IL-6 in prossimità dell'area infartuata; tale citochina in questa circostanza viene prodotta sia dai cardiomiociti, che dai fibroblasti e dalle cellule infiammatorie (Wood S. 2002; Hughes S. 2002) e ha un ruolo cardioprotettivo.

IL-6 così espressa sembrerebbe essere coinvolta nella riduzione della contrattilità del miocardio, attraverso l'induzione dell'espressione di NO sintasi. La cardiotrofina 1, citochina appartenente alla superfamiglia delle IL-6, risulta capace di attivare nel cuore, attraverso via JAK/STAT (Fig. 17), processi antiapoptotici e ipertrofici (Jugdutt BI. 2010). Si è ipotizzato che queste tre risposte indotte da IL-6 (riduzione della contrattilità, ipertrofia reazione anti apoptotica) potrebbero favorire la sopravvivenza del miocardio circostante l'area danneggiata (Wood S. 2002).

In topi con deficit di IL-6 è stato osservato un aumentato accumulo di collagene interstiziale e una grave dilatazione cardiaca, associati ad un marcato aumento della popolazione dei fibroblasti e ad una concomitante diminuzione di altre popolazioni cellulari (Banerjee I., et al 2009), favorendo in tal modo la progressione della disfunzione del ventricolo danneggiato.

Allo stesso tempo, come per TNF- α , aumentati livelli circolanti di IL-6 correlano con la progressione dello SC e il rimodellamento del ventricolo.

Sarebbe proprio un aumento della formazione del complesso tra IL-6 ed il suo recettore specifico il segnale iniziale per la risposta ipertrofica che si osserva nel miocardio in corso di rimodellamento (Vittorini S., et al 2011).

Tutto ciò a dimostrazione del fatto che anche per il processo infiammatorio, come per altri processi biologici, una carenza e/o eccessiva risposta al fattore stimolante la sua attivazione può portare in egual misura ad un alterato intervento protettivo, creando anzi un aggravamento dei danni al tessuto.

1.6.1.2 Chemochine: Interleuchina(IL)-8

Le chemochine sono un gruppo di proteine di basso peso molecolare, appartenenti alla famiglia delle citochine, che svolgono un ruolo cruciale per il reclutamento leucocitario. Le chemochine sono caratterizzate dalla presenza di due ponti disolfuro coordinati tra la prima e la terza e la seconda e la quarta di quattro cisteine altamente conservate che determinano una struttura tridimensionale conservata, cruciale per l'interazione con i recettori. In base alla

posizione relativa delle prime due cisteine si possono identificare quattro famiglie di chemochine: CXC, CC, linfotattina e CX3C. L'IL-8 appartiene alla famiglia delle chemochine CXC e rappresenta un segnale chemiotattico importante per i neutrofili (Pontieri 2010). In alcuni lavori è stato dimostrato che in seguito a danno da ischemia riperfusione IL-8 è rilasciata dai macrofagi e cellule endoteliali e i suoi livelli sono marcatamente aumentati entro un'ora dal danno (Kukielka GL., et al 1995). È stato anche dimostrato, *in vitro* su cardiomiociti di origine canina, che IL-8 aumenta l'adesività dei neutrofili verso i cardiomiociti favorendone l'azione citotossica (Kukielka GL., et al 1995). Le chemochine esplicano la loro funzione attraverso dei recettori a sette eliche transmembrana associati a proteine G eterotrimeriche la cui attivazione causa l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare e l'attivazione del metabolismo dei fosfolipidi di membrana ad opera delle fosfolipasi C, D ed A2.

1.6.1.3 Nuovi indici di flogosi

La necessità di individuare nuovi biomarcatori e nuovi target per il trattamento delle malattie cardiovascolari ha permesso di ampliare l'elenco delle molecole prodotte e secrete dal cuore, definite come *cardiochine* (Shimano M., et al 2012). Il numero totale di cardiochine non è ancora noto, ma si stima che per l'uomo questo valore sia compreso tra 30-60 cardiochine (Frost RJ., et al 2007; Belmont PJ., et al 2008; Stastna M., et al 2010).

Le cardiochine individuate rivestono funzioni diverse, oltre ad essere impegnate nel garantire le funzioni fisiologiche del cuore e del sistema cardiovascolare, inviano segnali di "sofferenza" dell'organo o indicano aggravamento di una patologia (es. citochine), possono inoltre essere coinvolte nei processi di rimodellamento ventricolare così come nel "recupero" di funzione dell'organo danneggiato (ad esempio le proteine della matrice extracellulare e fattori di attivazione per le cellule staminali) (Doroudgar S., et al 2011).

A questa categoria appartengono proteine con funzione diversa: ANP e BNP che sono *up* regolati in risposta allo stiramento del miocardio (Koller KJ., et al 1992; Nishikimi T., et al 2006); Come visto sia ANP e BNP favoriscono il rimodellamento cardiaco influenzando direttamente le cellule cardiache in modo autocrino e/o paracrino. Inoltre, ANP e BNP influenzano escrezione di elettroliti e acqua dal rene regolando il tono vascolare e influenzano anche la crescita delle cellule vascolari mediante il rilascio di fattori endocrini (Nishikimi T., et al 2006). In condizioni di stress, il cuore produce anche angiotensina II, che contribuisce all'ipertrofia e fibrosi cardiaca. Il gruppo delle cardiochine include, inoltre, le classiche citochine come TNF- α e TGF- β , sintetizzate e secrete in seguito a danno al miocardio, possono promuovere il reclutamento delle cellule infiammatorie e facilitare la crescita ipertrofica e la

fibrosi (Kleinbongard P., et al 2011; Schultz JJ., et al 2002). A questo gruppo di molecole sono state aggiunte recentemente: GDF-15, IL-33 e il suo recettore ST2.

GDF-15

Il *Growth Differentiation Factor-15* (GDF-15) fa parte della superfamiglia di proteine conosciute come *Transforming growth factor-β* (TGF-β) che comprende più di 40 membri coinvolti nella regolazione dello sviluppo, del differenziamento e nella riparazione di vari organi (Shi Y., et al 2003). Il GDF-15, noto anche come *macrophage inhibitory cytokine 1*, viene secreto da diversi tipi cellulari come una proteina di 12 kDa.

L'espressione di GDF-15 è stata documentata nella prostata, nella placenta e la sua produzione aumenta rapidamente nei macrofagi in seguito a stimolazione con le stesse citochine proinfiammatorie (IL-1, TNF-α e IL-6), agendo in questo modo come modulatore negativo dell'evento flogistico (Bootcov MR., et al 1997). Inoltre, p53 (oncosoppressore) induce l'espressione di GDF15, che agisce come una molecola inibitoria della crescita in cellule tumorali (Tan M., et al 2000).

Kempf e collaboratori hanno scoperto che l'espressione di GDF15 a livello cardiaco è indotta rapidamente in seguito a danno da ischemia/riperfusion attraverso segnalazione ossido nitrico dipendente (Kempf T., et al 2006). Alcuni studi condotti su modelli animali hanno dimostrato come l'inibizione dell'espressione del GDF-15 favorisca l'evento ipertrofico in risposta ad un sovraccarico pressorio, con conseguente riduzione della capacità di pompa del cuore (Xu J., et al 2006); mentre, in caso di infarto la mancata espressione di GDF-15 può determinare un aumento dell'evento apoptotico (Kempf T., et al 2006). Si è inoltre dimostrato come alcuni modelli murini, in cui veniva sovraespresso il gene che codifica per GDF-15, risultassero "resistenti" a sviluppare ipertrofia cardiaca in seguito a sovraccarico pressorio (Xu J., et al 2006), sottolineando in questo modo l'effetto cardioprotettivo di GDF-15 (Ago T., et al 2006).

I recettori di GDF-15 fanno parte alla famiglia dei recettori per i TGF-β.

Questi sono recettori transmembrana con attività serin/treonina chinasi chiamati recettori di tipo I e II. Questi recettori sono delle glicoproteine che dimerizzano dopo il legame al ligando. A stabilire quale via del segnale intracellulare sarà attivata è il recettori di tipo I (ALK1 a ALK7) (Ago T., et al 2006). Meccanismi di segnalazione intracellulare indotti dalla superfamiglia TGF-β sono suddivisi in percorsi Smad-dipendenti e indipendenti (Derynck R., et al 2003). Nel primo caso, il complesso Smad2/3 e/o Smad1 / 5/8, sono fosforilati da recettori di

tipo I e, dopo aver costituito un complesso eterotrimerico con il comune mediatore Smad, cioè Smad4, sono traslocati nel nucleo dove andranno a modulare la trascrizione.

Le molecole attivate invece dal percorso Smad-indipendente includono MAPK, TAK-1, e PI3K/Akt, ma tuttora non è stato chiarito in che modo tali mediatori siano attivati dal recettore (Derynck R., et al 2003) (Fig.18).

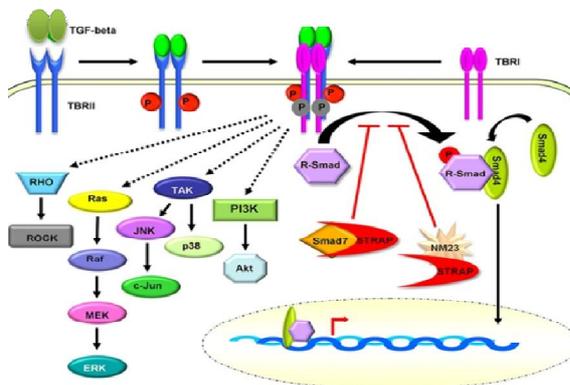


Figura 18: Via del segnale attivata da GDF-15

GDF-15 protegge i cardiomiociti dall'apoptosi attraverso l'attivazione della via PI3K-Akt, mentre conduce alla attenuazione della risposta ipertrofica cardiaca attraverso l'attivazione di SMAD2/3/4 (Xu J., et al 2006).

Pur avendo un ruolo cardioprotettivo, come si è visto per altre citochine, il GDF-15 quando è presente a elevati livelli può avere un effetto avverso sul cuore. Come detto appartiene alla famiglia dei TGF- β e come tale si è visto influenzare moderatamente l'effetto fibrotico. (Wollert KC., et al 2012).

I livelli circolanti di GDF-15 sono elevati nei pazienti con sindromi coronariche acute e sono associate ad un aumentato rischio di mortalità post-infarto (Wollert KC., et al 2007; Eggers KM., et al 2010). Anche nei pazienti con SC, alti livelli di GDF-15, sono associati con la progressione della malattia ed un aumentato rischio di morte (Anand IS., et al 2010). Pertanto, GDF-15 agisce come biomarcatore prognostico di cardiopatie e la sua misurazione fornisce utili informazioni per monitorare la gravità della malattia e per predire il rischio cardiovascolare (Shimano M., et al 2012).

Le informazioni prognostiche, date da GDF-15, sembrano essere indipendenti da quelle fornite da altri classici biomarcatori tra cui BNP, proteina C reattiva e troponina indicando quindi che questo nuovo marcatore può aiutare a chiarire alcuni degli aspetti dello SC (Anand IS., et al 2010; Bonaca MP., et al 2011; Wang TJ., et al 2012). L'associazione di GDF-15 con un

aggravamento della condizione clinica del paziente scompensato ha incentivato la ricerca di terapie che ne riducano i livelli e l'incidenza dei rischi associati a questo biomarcatore (Wollert KC., et al 2012).

Anche se è stata comprovata, da diversi studi *in vitro*, la capacità di produzione e secrezione di GDF-15 da parte dei cardiomiociti, sottoposti a danno da ischemia riperfusione o sovraccarico pressorio, recentemente è stato stabilito da Lok e collaboratori che la secrezione di questa citochina, da parte dei cardiomiociti *in vivo*, è irrilevante rispetto alla concentrazione che si ritrova in circolo (Lok SL., et al 2012). Questi dati suggeriscono che la sede della sintesi della proteina stress inducibile GDF-15 è da ricercarsi, in caso di SC, in organi diversi dal cuore, i quali vanno in sofferenza nel momento in cui si ha la disfunzione della pompa cardiaca. La citochina, una volta in circolo, potrà agire sui differenti target tra cui il cuore.

Adiponectina

L'adiponectina (ADN) è una proteina di 247 amminoacidi appartenente alla famiglia delle adipochine, è prodotta principalmente dagli adipociti maturi è stata isolata per la prima volta nel 1995 (Scherer PE., et al 1995).

Prodotta nel tessuto adiposo, l'ADN viene secreta nella circolazione periferica dove rappresenta lo 0,01-0,05% delle proteine plasmatiche totali, con livelli variabili tra i 3 e i 30 µg/mL (Scherer PE., et al 1995; Maeda K. et al 1996; Hu E., et al 1996).

L'ADN è costituita da quattro domini: all'estremità N-terminale presenta la sequenza segnale, a cui segue una regione variabile specie-specifica, un dominio collagene (sito coinvolto nelle interazioni con altri monomeri di ADN per la formazione dei complessi); all'estremità C-terminale è presente un dominio globulare di trimerizzazione altamente conservato, che ha un certo grado di omologia con la regione C-terminale del TNF-α (Wang Y., et al 2008)(Fig. 19).

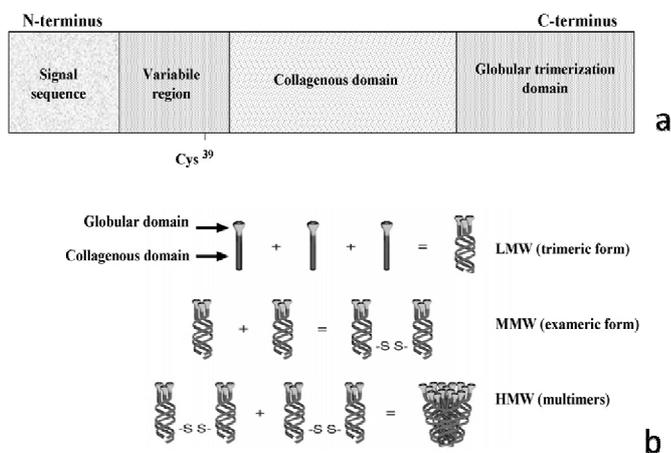


Figura 19: I domini dell'ADN (a); i multimeri dell'ADN (b). Modificato da Gianni D., et al 2007.

L'ADN può formare dei multimeri, negli adipociti si trova oltre che come monomero anche come trimero a basso peso molecolare, (LMW), esamero a peso molecolare intermedio (MMW) e il complesso formato da otto o più monomeri (HMW) ad alto peso molecolare.

Nel plasma sono presenti solo le forme multimeriche e la forma monomerica dell'ADN non è presente. Prima di essere rilasciata nel torrente circolatorio, l'ADN subisce una serie di modifiche post tradizionali che ne influenzano l'emivita in circolo (Simpson F., et al 2010).

Il gene per l'ADN (AdipoQ) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 3. Ad oggi non sono stati chiariti tutti i meccanismi che ne regolano l'espressione ma appare evidente, da studi condotti in *vitro* su adipociti, che stimoli quali catecolammine o citochine pro-infiammatorie (TNF- α ; IL-6) possono ridurre l'espressione dell'adipochina. (Kamigaki M., et al., 2006).

Diversamente a quanto in precedenza si pensava, la trascrizione e traduzione del gene per l'ADN non è prerogativa solo del tessuto adiposo (Maeda K., et al 1996). Una serie di studi ha dimostrato che il gene per l'ADN è up-regolato nei tessuti danneggiati, mRNA dell'ADN è stato ritrovato espresso nel fegato di topo dopo trattamento con tetracloruro (Yoda-Murakami M., et al 2001), ma anche nel tessuto muscolare scheletrico inseguito a stress ossidativo (Delaigle AM., et al 2006). È stato dimostrato inoltre che il trascritto dell'AND si ritrova anche a livello dei cardiomiociti di topo (Pineiro R., et al 2005) in seguito a danno da ischemia risperfusion (Shibata R., et al 2007). Ma in ogni caso il contributo endogeno di ADN, come elemento cardioprotettivo, risulta inferiore rispetto alla ADN che viene prodotta e secreta dal tessuto adiposo (Shibata R., et al 2007).

ADN e lo Scompenso Cardiaco

Numerose sono le evidenze sperimentali che dimostrano come l'ADN svolga un ruolo protettivo contro lo sviluppo di stati clinici particolari come: ipertensione, ictus, resistenza all'insulina, malattie cardiovascolari (Shibata R., et al 2009).

Nel Framingham Offspring Study, elevati livelli plasmatici di ADN risultano altamente protettivo nei confronti di possibili eventi cardiaci (Ai M., et al 2011).

Studi clinici hanno esaminato il ruolo dell'ADN nella patologia ipertrofica cardiaca utilizzando modelli murini vari. Topi ADN-*Knockout* (ADN-KO) sviluppano una grave ipertrofia concentrica cardiaca e mostrano un aumento della mortalità dopo un sovraccarico pressorio causato dalla costrizione aortica rispetto ai topi WT (Shibata R., et al 2004; Liao Y., et al 2005). Ridotti livelli di ADN accelerano anche la transizione da ipertrofia cardiaca verso SC, in caso di sovraccarico di pressione (Shimano M., et al 2010).

La compromissione della funzione del ventricolo sinistro nei topi APN-KO è accompagnata da un aumento di ipertrofia dei miociti, apoptosi e fibrosi interstiziale, e da una ridotta densità capillare nella zona infartuata (Shibata R., et al 2012).

In realtà si è per lungo tempo dibattuto se veramente l'ADN abbia un ruolo protettivo contro le malattie del sistema cardiovascolare, questo perché molte sono le evidenze sperimentali che hanno confermato come elevati livelli di ADN siano presenti in soggetti con SC (Kistorp C., et al 2005; George J., et al 2006).

Dati clinici confermano che al momento dell'ospedalizzazione di pazienti con SC, i livelli di ADN siano stati trovati aumentati e che in seguito a trattamento degli stessi con β -bloccanti si ha una diminuzione dei livelli dell'adipochina (Ohara T., et al 2011)

La sovraregolazione di adiponectina può essere una risposta compensatoria alla condizione di stress dovuta allo SC, condizione simile a quanto descritto per la secrezione di BNP (Shibata R., et al 2012). Livelli di BNP sono correlati con i livelli di adiponectina nello scompenso cardiaco umano, e BNP stimola direttamente gli adipociti umani nel rilasciare l'adiponectina tramite un percorso cGMP-dipendente (Tsukamoto O., et al 2009).

L'unica spiegazione che ad oggi viene data a questo fenomeno che prende il nome di "paradosso dell'adiponectina" sembrerebbe essere quella per cui, nel soggetto scompensato, si crei resistenza verso l'ADN, per cui, mancando i recettori che recepiscono il segnale, non sarà possibile avere la risposta protettiva voluta.

I recettori dell'ADN

I recettori per l'ADN descritti sono: AdipoR1, AdipoR2, T-caderina, e calreticulina (Takemura Y., et al 2007; Denzel MS., et al 2010).

Diversi studi indicano che AdipoR1 e AdipoR2, attivati dal legame con ADN, attivano protein chiasi attivata da AMP (AMPK) e PPAR α . Queste molecole, a loro volta, attivano una cascata di trasduzione del segnale che porta rispettivamente al miglioramento dell'assorbimento del glucosio e dell'ossidazione degli acidi grassi (Yamauchi T., et al 2003).

L'ADN sopprime l'ipertrofia dei cardiomiociti, dovuta a iperstimolazione con catecolamine e ET-1, legandosi al suo recettore AdipoR1. In studi *in vitro*, condotti su cardiomiociti, l'ADN legandosi ad AdipoR1 induce la fosforilazione e attivazione dell'AMPK la quale potrà così intervenire bloccando le vie di trasduzione del segnale attivate da noradrenalina e ET-1 (Shimano M., et al 2010; Fijioaka Y., et al 2006). L'ablazione del gene che codifica per AdipoR1 abolisce la fosforilazione e attivazione di AMPK, ma non si ottiene lo stesso risultato in caso di delezione del gene per AdipoR2 (Shimano M., et al 2010).

E' stato inoltre osservato che ADN inibisce i segnali pro-infiammatori proprio grazie all'interazione con AdipoR1 e AdipoR2, ma in modo diverso. Il suo legame con AdipoR1 espresso sulla membrana dei macrofagi induce una riduzione del rilascio del TNF- α . Mentre il suo legame con AdipoR2 induce un aumento di espressione di IL-1ra, antagonista della citochina pro infiammatoria IL-1 (Shibata R., et al 2012).

Anche l'attività di T-caderina sembra essere importante nel mediare l'azione cardioprotettiva di ADN sul cuore. L'ablazione del gene che codifica per T-caderina riduce l'attivazione dell'AMPK-ADN dipendente, porta ad un significativo incremento dell'ipertrofia cardiaca in condizioni di ipertensione e ad un più grave danno acuto da ischemia-riperfusion. Un altro ruolo attribuito a T-caderina è la rimozione dal circolo di ADN, per cui una sua ridotta espressione può giustificare gli aumentati livelli nel plasma dell'adipochina e la riduzione del suo ruolo cardioprotettivo. (Denzel MS., et al 2010).

Anche l'attività del calreticulina gioca un ruolo importante nella protezione dei cardiomiociti. L'ablazione del gene che codifica per tale recettore riduce l'azione protettiva dell'ADN nell'attivazione di Akt. Di conseguenza si registrerà, *in vitro*, una diminuzione della sopravvivenza dei cardiomiociti in coltura (Maruyama S., et al 2011). Questi risultati dimostrano che l'ADN protegge contro l'apoptosi attraverso un segnale calreticulina dipendente.

Interleuchina (IL)-33 e ST2

IL-33, una citochina membro della superfamiglia di IL-1, è il ligando del recettore ST2 (Schmitz D., et al 2005). L'espressione di IL-33 è stata descritta in numerosi tipi cellulari come: cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule epiteliali bronchiali, adipociti e in alcune cellule del sistema immunitario tra cui macrofagi e cellule dendritiche (Schmitz D., et al 2005; Wood IS 2009). Inizialmente era stato proposto che, come IL-1, IL-33 venisse sintetizzata come un precursore di 30 kDa (pro-IL-33) e quindi clivata dalla caspasi-1 nella forma attiva di 18 kDa (Schmitz D., et al 2005). È stata avanzata l'ipotesi che, in realtà, la pro-citochina con peso molecolare di 30 kDa sia la forma attiva di IL-33, e che le altre forme clivate (20- 22 kDa) siano isoforme meno attive da un punto di vista biologico, che potrebbero essere il risultato dell'attivazione di caspasi-3 e -7 (Cayrol C., et al 2009; Talabot-Ayer D., et al 2009; Luthi AU., et al 2009). ST2 è un recettore appartenente alla famiglia dei recettori Toll/IL-1. Ritenuto un tempo recettore orfano si è poi dimostrato in grado di trasdurre e mediare gli effetti biologici di IL-33. ST2 esiste in due diverse isoforme (ottenute da *splicing* alternativo): l'isoforma transmembranaria del recettore *ST2L* e l'isoforma solubile *sST2* (Yanagisawa K., et al 1993).

ST2L è caratterizzato da un dominio extracellulare, attraverso cui lega il ligando, un dominio transmembrana e uno intracellulare definito SIR che risulta omologo al dominio TIR dei recettori Toll e IL-1R. Questo recettore nel momento in cui contatta IL-33 può contattare la catena accessoria IL-1RAcP e far partire così il segnale. sST2 rappresenta la forma solubile del recettore; mancando della componente transmembrana e intracellulare, similmente a IL-1R II, si comporta da *decoy receptor* legando IL-33 ed impedendone così l'azione biologica (Fagundes CT., et al 2007; Yin H., et al 2006; Hayakawa H., et al 2007).

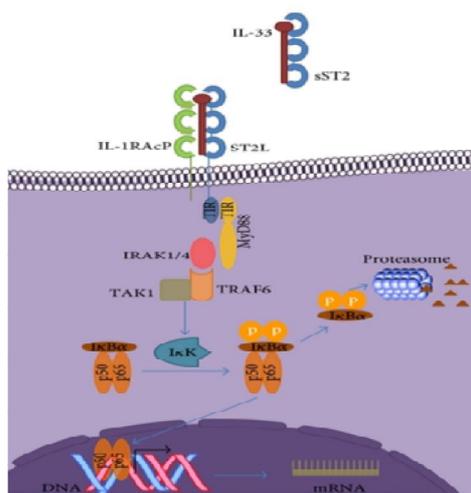


Figura 20: Via di trasduzione del segnale di IL-33/ST2 e sST2 forma solubile del recettore.

Anche a livello cardiaco è stata registrata la produzione di IL-33 e del suo recettore. IL-33 è prodotta principalmente dai fibroblasti cardiaci in seguito a stress meccanico (Sanada S., et al 2007). Studi effettuati *in vitro*, su cardiomiociti e fibroblasti neonatali di ratto, hanno rivelato che in seguito ad un stress meccanico l'espressione di IL-33 e sST2 è 5 volte maggiore nei fibroblasti rispetto alla componente contrattile del cuore (Sanada S., et al 2007). È stato inoltre dimostrato che l'espressione della citochina può essere indotta, in entrambi i tipi cellulari, da altri stimoli come l'angiotensina II, a concentrazioni non inferiori a 0.1 mM, mentre né il TNF- α né IL-1 β sembrano in grado di facilitarne l'espressione (Sanada S., et al 2007). Anche l'espressione di ST2, sia nella sua forma solubile che quella transmembrana, è regolata da fonti di stress biomeccanico (Weinberg EO., et al 2002).

È stato dimostrato che l'attività del complesso IL-33/ST2L risulta coinvolto nella risposta cardioprotettiva al sovraccarico pressorio, attenuando l'ipertrofia e la fibrosi cardiaca (Sanada S., et al 2007). Il recettore sST2, invece, inverte l'effetto anti-ipertrofico dell'IL-33 sequestrando la citochina e impedendone il legame con ST2L. Alcuni dati suggeriscono come

un aumento dei livelli di sST2 siano indicatori di prognosi negativa per i soggetti con scompenso (Weinberg EO., et al 2003; Shimpo M., et al 2004).

Il ruolo cardioprotettivo di IL-33/ST2L risulta nell'attenuazione dell'attività di NF- κ B. Il recettore ST2 fa parte della famiglia dei recettori Toll/IL-1R; grazie al suo dominio SIR riesce a contattare MyD88 e ad attivare in questo modo una cascata di segnali intracellulari che convergeranno anche nell'attivazione di NF- κ B. Questo fattore di trascrizione gioca un ruolo fondamentale nell'ipertrofia dei cardiomiociti, sia *in vitro* che *in vivo* (Freund C., et al 2005; Ha T., et al 2005). Sanada e collaboratori hanno studiato come l'azione di IL-33/ST2 sull'attività di NF- κ B possa manifestarsi, in caso di stress, in un segnale cardioprotettivo. Questi studi hanno evidenziato come, IL-33 agisca sui cardiomiociti in condizioni fisiologiche favorendo, una volta legata al recettore, l'attività trascrizionale di NF- κ B; nel momento in cui si induce un stress meccanico sul cuore e aumentano i livelli di angiotensina II e di altri fattori che stimolano marcatamente l'attività di NF- κ B, l'attività del complesso IL-33/ST2 si modifica e diminuisce l'attivazione del fattore trascrizionale, riducendo in questo modo lo stimolo proipertrofico (Sanada S., et al 2007). I meccanismi mediante i quali IL-33 può smorzare l'attivazione di NF- κ B non sono del tutto chiariti. Gli esperimenti di Sanada suggeriscono che IL-33 potrebbe sopprimere la generazione di ROS indotta da angiotensina II e in questo modo impedire l'attivazione di NF- κ B ROS dipendente (Hirota S., et al 2002).

Queste osservazioni indicano che l'asse IL-33/ST2 rappresenta una stimolazione paracrina cardioprotettiva tra fibroblasti e cardiomiociti (Shimano M., et al 2012) e fanno ipotizzare ad un potenziale ruolo terapeutico per IL-33 nel limitare i danni da sovraccarico pressorio. Studi clinici hanno, inoltre, dimostrato che ST2 sia espresso ad elevati livelli in pazienti scompensati e si comporta come biomarcatore prognostico negativo indipendente da altri classici biomarcatori.

1.7 Dispositivo di assistenza ventricolare sinistra

Nonostante esistano diverse terapie per ridurre la morbilità e la mortalità dovute a SC, l'incidenza di questa malattia non è cambiata, anzi rimane il tipo di patologia più frequente per i pazienti con età superiore 65 anni (McAlister FA., et al 2001; Levy D., et al 2002; Foody JM., et al 2002). Nella fase terminale di SC il trapianto d'organo continua a rappresentare il trattamento di elezione a cui sottoporre il soggetto scompensato, in quanto garantisce una maggiore sopravvivenza e una migliore qualità della vita. Dato il limitato numero di donatori d'organo è stato necessario trovare soluzioni efficaci per favorire la sopravvivenza del soggetto scompensato in attesa di trapianto d'organo.

Diversi dispositivi di sostegno meccanico, a lungo termine, sono stati sviluppati; questi vanno dai *cuori artificiali* ai *dispositivi di assistenza artificiale* (VAD) (Wilson SR., et al 2009).

Lo scopo principale dei VAD è supportare il circolo sistemico e/o polmonare, prelevando sangue dal ventricolo inefficiente (destra, sinistra o entrambi) sospingendolo, attraverso l'ausilio di una pompa, all'interno dei vasi principali al fine contribuire a mantenere la gittata cardiaca e la perfusione degli organi vitali. Questi dispositivi meccanici possono essere impiegati nei soggetti scompensati come trattamento che può avere obiettivi terapeutici diversi. Originariamente i VAD sono stati pensati come *ponte provvisorio al recupero* (bridge to recovery) e poi come *ponte al trapianto*, ma in un numero crescente di pazienti con SC, come terapia permanente o *terapia di destinazione*, in particolare con dispositivi di più recente progettazione (Rose EA., et al 2001).

In particolare:

- L'uso dei VAD come ponte per il recupero è riservato ai pazienti che hanno bisogno solo di sostegno temporaneo, per giorni o settimane, durante i quali la reversibilità del ventricolo può verificarsi, con l'allontanamento dell'insulto, in tal caso si potrà poi rimuovere il dispositivo (Wilson SR., et al 2009).
- L'impianto di VAD come ponte al trapianto è previsto in pazienti in attesa di trapianto. Questo è il caso in cui più di frequente viene usato il VAD come terapia.
- L'impiego del VAD come terapia di destinazione è riservata ai pazienti con SC terminale che non rispondono più alle terapie convenzionali e non possono essere candidati al trapianto (a causa dell'età avanzata, dell'obesità, di insufficienza renale e ipertensione polmonare) (Wilson SR., et al 2009).

L'unità funzionale del VAD è costituita da una "camera di pompaggio" impiantata attraverso sternotomia mediana, operazione chirurgica tipica di un bypass cardiopolmonare, in sede sotto diaframmatica in una posizione pre-peritoneale o intra-addominale o può essere dislocata in una sede fuori dal corpo. Negli ultimi tempi si sta cercando di costruire dei dispositivi più piccoli che possano essere impiantati a livello toracico. Il VAD è collegato al cuore mediante una cannula anastomizzata di afflusso che decomprime la cavità ventricolare e permette al sangue di arrivare alla camera artificiale, questa è caratterizzata da un sistema di valvole che garantiscono l'unidirezionalità del flusso ematico. Da questo ventricolo accessorio si diparte una cannula anastomizzata di efflusso che immette il sangue nell'aorta ascendente o nell'arteria polmonare. In questo modo il ventricolo destro o sinistro viene esonerato dal proprio lavoro ed è ottimamente sostituito da queste camere artificiali. In condizioni ottimali, il

ventricolo nativo si comporterà come un condotto passivo attraverso il quale la pompa meccanica si riempie durante l'intero ciclo cardiaco, e il ventricolo decompresso dovrebbe contribuire ben poco alla portata cardiaca sistemica.

Se, invece si genera una gittata sistolica ventricolare e all'ecocardiografia si rileva che le cuspidi valvolari aortiche/polmonari si aprono, si potrà essere nella condizione in cui o la decompressione del ventricolo nativo è inadeguata per cui si dovrebbe sospettare una disfunzione del dispositivo di assistenza, o vi è un recupero della funzione ventricolare nativa (Wilson SR., et al 2009). Dal dispositivo si dipartono dei fili di controllo e dei cavi di alimentazione che tramite via percutanea collegano il dispositivo interno a una console esterna portatile (componente elettronica o pneumatica) ed a un alimentatore che può essere trasportato in una borsa (Fig.21) (Wilson SR. 2009).

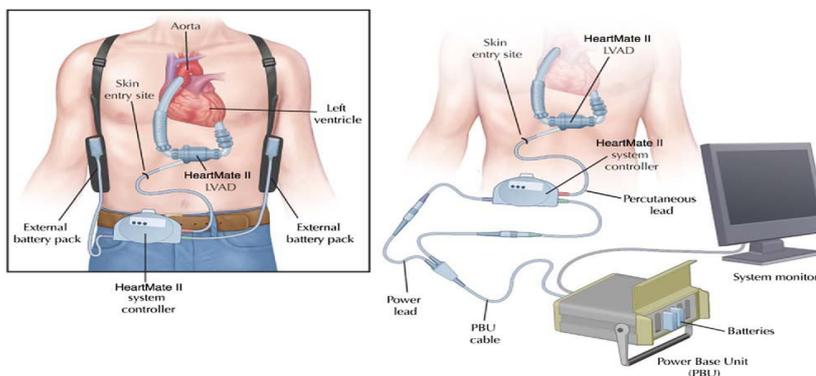


Figura 21: Dispositivo di assistenza ventricolare. Simulazione di un dispositivo a flusso continuo impiantato (a sinistra), componenti esterne con cui interagisce il dispositivo per una corretta funzionalità, batteria e console. (a destra). Modificato da Wilson SR., et al 2009.

1.7.1 Complicanze dei VAD

La maggior parte delle complicanze, che si hanno in seguito all'impianto del dispositivo, sono legate sia alla terapia cui i pazienti in VAD sono sottoposti sia alle limitazioni delle soluzioni tecnologiche attualmente adottate in questi dispositivi. Dopo l'impianto del VAD la frequenza delle emorragie postoperatorie è piuttosto elevata, tale da richiedere una revisione chirurgica nel 20 ed il 50% dei casi. Inoltre, questi soggetti sono a rischio di infezioni batteriche che possono scaturire da contaminazioni localizzate, in seguito all'impianto del dispositivo ed evolvere in una successiva disseminazione sistemica (Slaughter MS., et al 2007). Si potranno osservare anche eventi trombo-emolitici, dovuti principalmente ad eventi coagulativi anomali tra il sangue e le superfici del VAD.

In molti casi l'impianto di un LVAD (dispositivo di assistenza ventricolare sinistra) può portare via via ad una insufficienza ventricolare destra; in questo caso si può intervenire con un RVAD

(dispositivo di assistenza ventricolare destra) o si potrà impiegare il BVAD (dispositivo di assistenza biventricolare). Dati clinici dimostrano inoltre che in seguito all'impianto di un dispositivo VAD circa il 30% dei pazienti va incontro a decesso a causa di uno scompenso multi organo, questo rappresenta nella maggior parte dei casi l'evento finale di un percorso complicato da sepsi e sanguinamenti.

1.7.1.1 *Tipi di dispositivo*

La storia delle assistenze meccaniche alla circolazione parte da molto lontano, il primo ad ipotizzare il loro utilizzo fu Cesar Legallois, medico francese, che nel 1812 scriveva: *“se si potesse sostituire il cuore con una sorta di iniezione e nello stesso tempo si fosse potuta fornire all'iniezione in modo continuo una provvista di sangue arterioso sia naturale sia artificiale, si sarebbe arrivati a mantenere la vita indefinitamente”*.

Si dovrà aspettare il 1966 per avere il primo prototipo di dispositivo di assistenza ventricolare; ideato da De Bakey e impiantato, ad una paziente, dopo un intervento cardochirurgico in cui il cuore non si contraeva più sufficientemente. Dopo un periodo di degenza in ospedale il dispositivo venne tolto e alla fine la donna fu dimessa. Solo nel 1984 però si arrivò alla creazione di dispositivi “portatili”, cioè dispositivi che garantissero, dopo il loro impiego, la deambulazione del paziente.

Da allora a oggi molti sono stati i progressi fatti in campo Biomedico e Bioingegneristico che hanno portato alla creazione dei dispositivi che si trovano attualmente in commercio.

Questi nuovi dispositivi sono suddivisi in quattro categorie, tale divisione è stata fatta in base alla forma del dispositivo, alla tipologia di impianto, alla durata del supporto e alle altre peculiarità del dispositivo.

- VAD a flusso non pulsatile: *resuscitative device*.

Questi sono usati principalmente nei laboratori di cateterizzazione cardiaca, nelle unità di terapia intensiva nei dipartimenti addetti alle emergenze per pazienti sofferenti a causa di uno *shock* cardiogenico acuto che non rispondono alla terapia farmacologica o all'uso delle pompe intraortiche. Questi dispositivi, non pulsatili, sono composti da una membrana polmonare, da uno scambiatore di calore e da una pompa centrifuga, tutte queste parti, poi, sono connesse ad una sorgente di gas attraverso un mixer che permette appropriati scambi dei flussi gassosi. Il flusso di sangue attraversa la membrana polmonare mentre l'ossigeno e l'anidride carbonica vengono diffusi dalla stessa. Lo scambiatore di calore serve per mantenere il sangue sempre ad una temperatura costante. Il corpo centrale è la *pompa centrifuga* che, pur essendo la prima

forma di VAD usato, è ancora sul mercato grazie alla sua semplicità, accessibilità e facile applicabilità. Questa pompa, inserita tra l'apice e la base del cuore, crea un flusso non pulsatile attraverso un rotore magnetico alimentato a corrente. La forza centrifuga è usata per generare energia che spinge il sangue, entrato dalla sommità della pompa, ad uscire dalla base della stessa nella direzione corretta del flusso. L'uscita della pompa è proporzionale alla velocità di rotazione del rotore e riesce a provvedere alle necessità circolatorie dell'organismo.

Questo è un supporto che può essere impiegato sia per la parte destra che per la parte sinistra del cuore e, normalmente, si tende a non prolungare il tempo di utilizzo (circa dieci giorni per gli adulti, un po' di più per i bambini) per limitare le complicanze.

I vantaggi dell'utilizzo di questo dispositivo sono sicuramente nella semplicità e nell'adattabilità dell'utilizzo, nella protezione da emboli e nel minimo trauma che produce nel sangue e nel corpo non necessitando di estese incisioni toraciche. Gli svantaggi sono legati al tempo di utilizzo ovvero alla capacità di ridurre o limitare il flusso d'uscita del sangue prima che la pressione raggiunga un limite tanto elevato da danneggiare le piastrine e i globuli rossi (Grigioni M., et al 2004).

- VAD a flusso non pulsatile: supporto esterno

Questi dispositivi di assistenza sono costituiti da tutte le parti elencate per la categoria precedente e hanno le stesse specifiche, la differenza si trova nella modalità d'uso. Infatti i primi vengono utilizzati per un tempo limitato, per situazioni di emergenza contingente e si deve sottoporre il paziente ad una continua terapia anticoagulante; questi, invece, sono indicati come supporti esterni per pazienti in attesa di un trapianto cardiaco. Il tempo di supporto varia chiaramente a seconda delle disponibilità di organi, ciò implica che i dispositivi devono essere in grado di mantenere delle condizioni di funzionamento fisiologico del cuore per un tempo più lungo evitando di compromettere sia la struttura dei globuli rossi, cercando di ridurre l'emolisi, che il sistema immunitario del paziente, cercando di evitare possibili infezioni.

- VAD a flusso pulsatile

Questi VAD sono caratterizzati dalla capacità di produrre un flusso pulsato tale da determinare escursioni sistole-diastoliche della pressione sanguigna, molto simili a quelle fisiologiche. Dal punto di vista del loro funzionamento, essi sono costituiti da una camera di riempimento all'interno della quale il sangue si raccoglie proveniente dalla cannula di afflusso e da cui viene eiettato con propulsione pneumatica o elettromeccanica nella cannula di efflusso.

Distinguiamo due tipi di pompe:

- pompa a pistone nella quale la camera di riempimento è circondata dal sistema di compressione solitamente costituito da piatti rigidi azionati da energia pneumatica o elettromeccanica o idraulica.
- pompa a sacco nella quale la camera di riempimento è un sacco delimitato da un diaframma mobile che viene alternativamente compresso e rilasciato con la conseguente espulsione o riempimento del sangue contenuto. La propulsione del diaframma è ottenuta mediante l'applicazione su di esso di energia pneumatica, attraverso compressori dedicati.

L'adeguato direccionamento del flusso in entrata o in uscita all'interno della camera di riempimento è garantito da un sistema di valvole unidirezionali posiziona nel punto di ingresso e che di uscita della camera stessa. Risulta inoltre evidente che, trattandosi di dispositivi che debbono generare una gittata sistolica adeguata in relazione ad una frequenza di lavoro, la camera di riempimento non potrà avere dimensioni virtuali ma dovrà occupare uno spazio adeguato che limiterà necessariamente la possibilità di miniaturizzare il VAD. Tra questi dispositivi pulsatili il più usato è *HeartMate XVE* (Fig. 22)

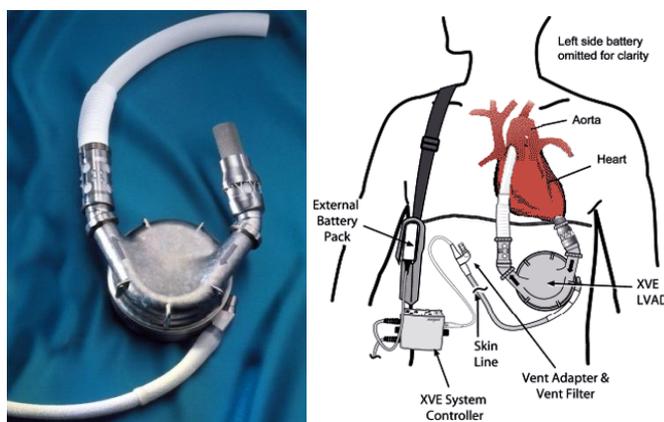


Figura 22: Dispositivi di assistenza ventricolare pulsatile HeartMate XVE (a sinistra). Simulazione dell'impianto del dispositivo HeartMate XVE (a destra).

- VAD a flusso continuo

Si definiscono dispositivi a flusso continuo tutte quelle assistenze al circolo capaci di generare un flusso ematico continuo privo di una escursione sisto-diastolica. Tra questi ricordiamo le pompe centrifughe (a rotazione meccanica, a levitazione magnetica), l'ECMO, le pompe miniaturizzate e le pompe assiali.

Si può affermare che LVAD a flusso continuo forniscono un sicuro, affidabile ed efficace supporto emodinamico nei pazienti in attesa di trapianto. L'impianto è associato ad un tasso molto basso di malfunzionamento del dispositivo o di infezioni che richiedono la sostituzione (Pagani FD., et al 2009).

Appartiene a questa categoria *HeartMate II*, che risulta il più usato nella pratica clinica.

Tale dispositivo viene alloggiato in sede addominale e collegato con le cavità cardiache e i grossi vasi mediante cannule che attraversano il diaframma e il pericardio. Per ogni ventricolo assistito meccanicamente sono quindi utilizzate due cannule di collegamento con il paziente, una di drenaggio posta sull'apice del ventricolo sinistro, ed una di reinfusione del sangue solitamente anastomotizzata sul tratto dell'aorta ascendente. Al tempo stesso il VAD è mosso da un motore elettronico interno ed è collegato ad un sistema di controllo solitamente agganciato alla cintura del paziente (Fig. 23).

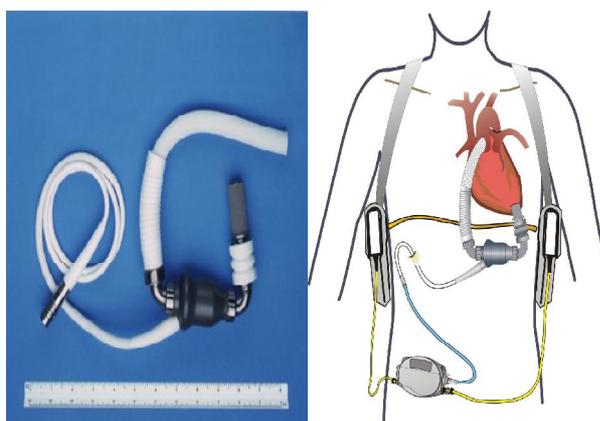


Figura 23: Dispositivo di assistenza ventricolare a flusso continuo HeartMate II (a destra). Simulazione dell'impianto del dispositivo HeartMate II (a sinistra).

L'*HeartMate II* nasce, nel 2008, come dispositivo da usare come ponte al trapianto. I risultati positivi ottenuti in diversi studi, in cui venivano monitorati pazienti sottoposti ad impianto del dispositivo a flusso continuo confrontati con i pazienti in cui era stato impiantato un dispositivo a flusso pulsatile, hanno promosso l'*HeartMate II* come supporto da usare come terapia da destinazione (Bogaev RC., et al 2011).

1.7.1.2 Selezione dei pazienti candidabili al VAD

La selezione corretta dei candidati rappresenta la chiave del successo dell'impianto di qualsiasi VAD (Slaughter MS., et al 2011; Lund LH., et al 2010). Il paziente che verrà selezionato per l'assistenza ventricolare deve rispondere a dei precisi criteri emodinamici, di resistenze polmonari, di condizioni emocoagulative adeguate, di funzionalità renale regolare.

Anche se le indicazioni date da questi parametri sono importanti per individuare i candidati all'impianto del dispositivo, una condizione fondamentale per il buon esito o il fallimento di tale pratica è strettamente legato alla precocità dell'indicazione chirurgica e dell'impianto del VAD. Una scelta del timing troppo precoce o peggio ancora ritardata può portare a quella condizione paradossale in cui criteri di indicazione e fattori di rischio possono coincidere.

L'assistenza meccanica al circolo trova, attualmente, impiego quando il trattamento intensivo convenzionale non è più in grado di assicurare condizioni cliniche ed emodinamiche accettabili, con il mantenimento di una perfusione d'organo sufficiente ad evitarne la disfunzione.

Tradizionalmente il profilo dinamico del paziente destinato al VAD è stato caratterizzato da :

- pressione arteriosa sistolica ≤ 80 mmHg
- pressione capillare polmonare > 20 mmHg
- indice cardiaco < 2 l/min/m²

Dal 23 luglio 2006 è attivo un registro istituito nel 2005 dalla *United States National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) dove si ha l'obbligo di inserire i dati dei pazienti sottoposti, in Nord America, ad impianto di uno dei dispositivi di assistenza meccanica approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento dell'insufficienza cardiaca avanzata (Kirklin JK., et al 2008). Questo registro prende il nome di INTERMACS (*Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support*), e grazie alla sua istituzione è stato possibile raccogliere ed analizzare i dati di quasi 3000 pazienti impiantati con un dispositivo (Kirklin JK., et al 2011).

Sia per la classificazione NYHA che la classificazione ACC/AHA i pazienti potenzialmente candidabili per l'impianto del VAD rientrano nel gruppo di maggiore gravità, non tenendo conto che tra i pazienti con SC avanzato esistono sottogruppi molto diversi per caratteristiche cliniche. Con l'istituzione del registro INTERMACS è stata creata un'ulteriore classificazione per gli stadi dello SC avanzato in base a livelli di stabilità/instabilità clinica con possibilità di confronto anche in termini prognostici (Tabella 5).

Nel lavoro della Stevenson e collaboratori (Stevenson LW., et al 2009), oltre ad una accurata descrizione dei profili, viene introdotto il concetto di "evento clinico" in grado di modificare in senso peggiorativo il livello di compromissione del paziente (Tabella 6).

Questa metodologia di classificazione si è dimostrata quindi essere molto duttile ed adattabile all'evoluzione della patologia, in un paziente complesso come lo è quello affetto da SC in stadio avanzato (Boyle AJ., et al 2011).

Livelli	Descrizione dei profili INTERMACS	Tempistica intervento
1° Shock cariogeno critico	Pazienti con ipotensione severa nonostante rapido aumento del supporto inotropo, "critica" ipoperfusione d'organo, spesso associata a peggioramento dell'acidosi e/o dei livelli di lattati	Necessario intervento definitivo entro poche ore
2° Declino progressivo	Pazienti con declino funzionale nonostante supporto inotropo, può manifestarsi con peggioramento della funzione renale, declino dello stato nutrizionale, impossibilità di ripristinare un adeguato equilibrio volemico. Descrive, inoltre, lo stato di declino di quei pazienti intolleranti alla terapia con inotropi (ad esempio a causa di aritmie)	Necessario intervento definitivo entro pochi giorni
3° Stabile ma dipendente da inotropi	Pazienti con stabilità della pressione arteriosa, della funzione d'organo, dello stato nutrizionale e dei sintomi con supporto inotropo continuo e.v. (o con dispositivo supporto circolatorio temporaneo o entrambi), ma con ripetuti fallimenti dei tentativi di svezzamento dal supporto inotropo/meccanico, a causa del ripresentarsi di ipotensione severa o disfunzione renale.	Intervento definitivo elettivo nell'arco di settimane o pochi mesi
4° Sintomi a riposo	Il paziente può essere stabilizzato in condizioni prossime all'euvolemia, ma presenta quotidianamente sintomi da congestione a riposo o durante le normali attività quotidiane. Generalmente il dosaggio del diuretico si attesta su valori molto alti. Devono essere adottati sia una gestione più intensiva che strategie di monitoraggio, che, in alcuni casi, possono compromettere la compliance e di conseguenza il risultato, con qualsiasi terapia. Alcuni pazienti possono fluttuare tra il livello 4 e 5.	Intervento definitivo elettivo nell'arco di settimane o pochi mesi
5° Intolleranza all'esercizio	Paziente asintomatico a riposo e durante le normali attività quotidiane, ma incapace di intraprendere qualsiasi altra attività, vivendo prevalentemente in casa. È un paziente asintomatico a riposo, ma può avere comunque un sovraccarico di volume refrattario alla terapia diuretica, e spesso associato a insufficienza renale.	Urgenza variabile, dipende dallo stato nutrizionale, dalla disfunzione d'organo e dalla tolleranza all'esercizio
6° Limitazione all'esercizio	Il paziente, scevro da sovraccarico di volume, è asintomatico a riposo, durante le normali attività quotidiane e le piccole attività fuori casa, ma diventa rapidamente sintomatico dopo pochi minuti di attività fisica significativa. L'attribuzione ad un sottostante deficit cardiaco richiede una attenta misurazione del picco di consumo di ossigeno, e, in alcuni casi, una valutazione emodinamica, a conferma della severità della disfunzione cardiaca.	Variabile, dipende dallo stato nutrizionale, dalla disfunzione d'organo e dalla tolleranza all'esercizio
7° NYHAIII avanzata	Questo livello si apre a future nuove descrizioni più precise. Include pazienti senza attuali o recenti episodi di instabilità e ritenzione di fluidi, che vivono asintomatici e sono in grado di tollerare attività fisiche significative fino all'attività fisica lieve.	Trapianto o supporto circolatorio potrebbero non essere indicati al momento

Tabella 5: Livelli INTERMACS-Profilo e tempistiche di intervento. Modificata da Stevenson LW. ,et al 2009

Eventi in grado di aggravare il profilo INTERMACS	
Temporary Circulatory Support (TCS)	Applicabile ai livelli 1,2,3 di pazienti ospedalizzati
Il dispositivo viene impiantato in tali casi solo a pazienti ospedalizzati	
A-Aritmia	Applicabile a tutti i livelli INTERMACS
È applicabile a qualsiasi profilo. Tachi-aritmia ventricolare ricorrente che recentemente ha sostanzialmente contribuito alla compromissione clinica del paziente. Include frequenti interventi appropriati dell'ICD o la necessità di defibrillazione elettrica esterna, solitamente più di 2 volte a settimana.	
FF-Frequent Flyer	Livello 3, se a domicilio, 4, 5, 6. Un Paziente "Frequent Flyer" è raramente ad un livello 7
È applicabile solo a pazienti non ospedalizzati, descrivendo quei pazienti che richiedono frequenti rivalutazioni cliniche in emergenza o ospedalizzazioni per terapia diuretica, ultrafiltrazione, o infusione temporanea di terapia vasoattiva.	

Tabella 6: Eventi clinici in grado di modificare il profilo INTERMACS. Modificato da Stevenson LW., et al 2009.

1.7.2 Il Rimodellamento Inverso

Lo SC è un processo progressivo strettamente associato con il rimodellamento cardiaco caratterizzato da modificazioni a livello anatomico, cellulare e molecolare che compromettono la funzione e la struttura del miocardio (Braunwald E., Heart failure 2013).

Fino a poco tempo fa si credeva che questo percorso fosse unidirezionale, progressivo e irreversibile. Tuttavia il concetto di irreversibilità è stato ampiamente superato e diversi sono gli studi che rivelano la possibilità di recuperare parzialmente o totalmente la naturale morfologia del ventricolo e di conseguenza la sua funzione (Birks EJ. 2013). Questo fenomeno, definito "rimodellamento inverso", può avvenire in risposta allo scarico di lavoro del ventricolo sostituito nella sua funzione da un dispositivo di assistenza ventricolare. In alcuni casi, questo processo di rimodellamento inverso risulta così significativo da permettere la rimozione del dispositivo e il recupero totale della funzione cardiaca (Birks EJ. 2013).

Tuttavia, solo una piccola percentuale dei pazienti con LVAD ha mostrato un miglioramento tale da permettere il recupero totale del cuore. Non sempre quindi il rimodellamento inverso può essere associato a guarigione o miglioramento delle condizioni cliniche del paziente.

Rimodellamento inverso può essere visto come una inversione dei meccanismi patologici che si verificano nel rimodellamento oppure come la generazione di nuovi percorsi (Birks EJ. 2013).

1.7.2.1 Ipertrofia

Il 70-90% del volume del cuore è occupato dai cardiomiociti anche se questi rappresentano il 35% della componente cellulare totale del cuore (Nag AC., et al 1979).

I cardiomiociti sono sottoposti ad importanti cambiamenti durante la progressione dello scompenso tra cui l'ipertrofia (Birks EJ. 2013). Per mezzo di colorazione con ematossilina ed eosina di campioni miocardici prelevati da pazienti con SC avanzato, al momento dell'impianto del LVAD, hanno permesso di osservare questo aumento delle dimensioni dei cardiomiociti. Diversi sono gli studi che dimostrano una riduzione dei cardiomiociti ipertrofici (Zafeiridis A., et al 1998; Drakos SG., et al 2010) (Fig. 24) e dell'istologia generale del tessuto (Rose AG., et al 2005) dopo l'utilizzo di un dispositivo di assistenza ventricolare. Bruckner e collaboratori hanno mostrato una significativa correlazione tra la durata del trattamento con il dispositivo e la variazione delle dimensioni dei cardiomiociti (Fig. 25) (Bruckner BA., et al 2001).

La riduzione e la regressione dell'evento ipertrofico sono una conseguenza dello scarico di lavoro a cui il ventricolo è sottoposto dopo LVAD, ma questa condizione non necessariamente è associata a recupero clinico e funzionale dell'organo (Ambardekar AV., et al 2011).

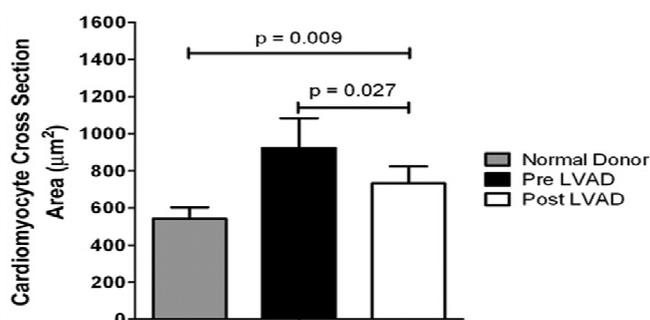


Figura 24: Confronto delle dimensioni dei cardiomiociti prelevati da un soggetto normale (grigio); e sezioni di tessuto pre-LVAD (nero) e post-LVAD (bianco). Modificato da Drakos SG., et al 2010.

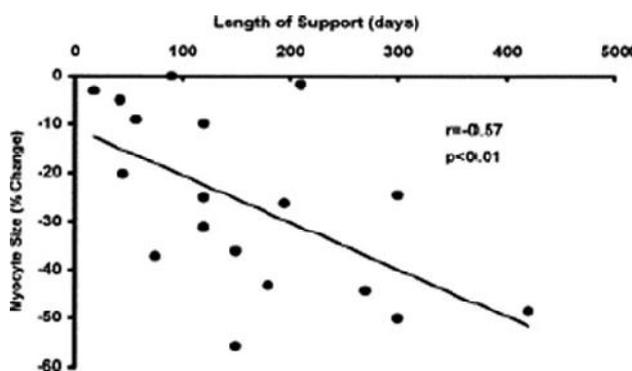


Figura 25: Variazioni nella dimensione dei cardiomiociti del soggetto impiantato con LVAD in funzione del tempo di trattamento con il dispositivo (Bruckner BA., et al 2001).

1.7.2.2 ***Apoptosi***

Un progressivo declino della funzione ventricolare sinistra è stata collegata alla perdita di quasi un terzo dei cardiomiociti come risultato dell'evento apoptotico, sia per l'uomo (Narula J., et al 1996) che per gli animali che si trovano in stadi avanzati dello SC (Haider N., et al 2009). L'apoptosi, che comunemente viene definita come processo di morte programmata, è finemente regolata da una serie di fattori pro e anti apoptotici con funzioni chiaramente opposte.

In seguito ad impianto del LVAD si verifica un aumento dei livelli di mRNA dei fattori antiapoptotici tra cui: FasExo6Del, isoforma più abbondante tra gli antagonisti solubili del recettore Fas che compete con il recettore per il legame a FasL impedendo così l'apoptosi e Bcl-XL, fattore antiapoptotico appartenente alla famiglia Bcl-2 (Bartling B., et al 1999). Inoltre si è anche visto una riduzione dei livelli di citocromo c nel citoplasma delle cellule miocardiche dei pazienti in cui era stato impiantato il dispositivo (Birks EJ. 2013).

È stato visto che in seguito a trattamento con LVAD si otteneva una ridotta attivazione di Akt (chinasi antiapoptotica) e conseguente aumento della GSK-3 β nello stato non fosforilato (Baba HA., et al 2003). Inoltre, è stata descritta da diversi studi una riduzione o meglio "normalizzazione" dell'attività di NF- κ B, fattore di trascrizione cruciale per l'espressione di geni associati alla sopravvivenza (Baichwal VR., et al 1997), il quale risulta iper-stimolato in corso di scompenso in seguito all'impianto del dispositivo (Baba HA., et al 2003; Wohlschlaeger J., et al 2005; Soppa GK., et al 2008).

Quello che emerge da questi studi è l'effetto antiapoptotico che il LVAD ha sul cuore scompensato, ma si deve ancora fare chiarezza sui complicati meccanismi che si realizzano.

1.7.2.3 ***Accoppiamento eccitazione-contrazione***

I meccanismi che determinano la contrazione cardiaca in seguito all'attivazione elettrica prevedono: un aumento della concentrazione del Ca²⁺ intracellulare, il legame di questo ione con la troponina, movimento della tropomiosina che espone i siti attivi dell'actina e legame di questi con la miosina e generazione di forza contrattile. L'incipit per dare avvio a tutto ciò è rappresentato dall'aumentata concentrazione di Ca²⁺ intracellulare. Durante il potenziale d'azione (in particolare durante la fase di *plateau*) il Ca²⁺ entra nella cellula attraverso il canale L voltaggio dipendente presente nella membrana cellulare. L'entrata dello ione dall'ambiente extracellulare non è sufficiente a dare avvio ai processi pocanzi descritti ma è importante per l'attivazione dei canali per il calcio conosciuti come *recettori per la rianodina* (RyR2), espressi sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico, che permettono il rilascio dello ione dai depositi

intracellulari e l'avvio del fenomeno della contrazione. Terminato l'evento contrattile il recettore RyR2 rapidamente si chiude mentre, sempre sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico, si registra l'attivazione del *sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase* o SERCA. Questa pompa rimuove rapidamente il Ca²⁺ dal citosol riportandolo nei depositi intracellulari mentre contemporaneamente sulla membrana plasmatica uno scambiatore Na⁺/Ca²⁺ e una pompa per il calcio eliminano lo ione in eccesso nell'ambiente extracellulare. In portante nella fase di rimozione dello ione sembra essere anche la fosforilazione del fosfolambano. Nel caso in cui si attivi il sistema nervoso simpatico e ci sia una stimolazione β -adrenergica, si otterrà come risultato dell'attivazione della protein chinasi cAMP dipendente o PKA la fosforilazione del fosfolambano e un'aumentata velocità di eliminazione dello ione e quindi rilasciamento dei miociti. Alterazioni dei movimenti dello ione Ca²⁺ contribuiscono alla riduzione della capacità contrattile dei cardiomiociti e rappresentano eventi importanti per la progressione dello SC. In un soggetto scompensato di può notare una riduzione della concentrazione dello ione dai depositi intracellulari (Birks EJ. 2013). In seguito ad impianto di un dispositivo LVAD è stato dimostrato una ricostituzione del reticolo sarcoplasmatico come deposito intracellulare di calcio. La ricaptazione dello ione attraverso SERCA2a, che veniva compromessa in caso di SC, migliora dopo l'impianto del dispositivo (Dipla K., et al 1998). Inoltre, è stato dimostrato che inseguito a terapia con LVAD, i transienti dello ione Ca²⁺ si modificano anche più rapidamente rispetto al soggetto scompensato (Chaudhary KW., et al 2004); è stata anche provata una sovraregolazione dell'espressione del gene che codifica per SERCA2a correlata con aumento nella forza e frequenza di contrazione dei miociti supportati da LVAD (Heerdt PM., et al 2006). Oltre all'espressione e all'attività di SERCA2a in questi pazienti è stato dimostrato anche un aumento della espressione del gene che codifica per la pompa Na⁺/Ca²⁺ (Terracciano CM., et al 2007). Questi miglioramenti hanno, in alcuni casi, contribuito alla riacquisizione di una sufficiente capacità contrattile del cuore tale da permettere la rimozione del dispositivo (Terracciano CM., et al 2007).

1.7.2.4 Proteine del citoscheletro

Durante la progressione dello SC si assiste a modificazioni importanti a carico delle proteine dell'apparato citoscheletrico del cardiomiocita. Nel corso dello scompenso cambia l'espressione genica di alcune componenti del sarcomero ad esempio diminuisce la sintesi della β -miosina mentre viene favorita quella dell' α -miosina, con riduzione della capacità contrattile del miocita adulto.

In seguito all'impianto del LVAD, in corso di rimodellamento inverso, è stato possibile osservare importanti cambiamenti a carico delle proteine del citoscheletro, mediante analisi con *microarray* su campioni di ventricolo sinistro ottenuti da due gruppi di pazienti : gruppo 1 erano soggetti scompensati sottoposti a LVAD che hanno recuperato, dopo l'impianto del dispositivo, la funzione contrattile tale da essere sottoposti a espianto dello stesso; gruppo 2 soggetti sottoposti a impianto di LVAD che non raggiungono miglioramenti tali da permettere la rimozione del dispositivo (Hall JL., et al 2007; Birks EJ., et al 2005). Da questo studio emerge che i soggetti del gruppo uno presentano un' aumentata espressione di laminina A/C e della spectrina ed inoltre hanno una riduzione dei livelli di anchirina 1 e 3. Per quanto riguarda le proteine del sarcomero si nota un' aumentata espressione di β -actina, tropomiosina- α , α 1-actinina e filamenti α (Hall JL., et al 2007; Birks EJ., et al 2005).

1.7.2.5 Il sistema nervoso simpatico

I pazienti scompensati presentano un' aumentata attività simpatica che portano il miocardio ad essere esposto a elevati livelli di noradrenalina (Haider N., et al 2010). Il soggetto scompensato diviene progressivamente meno responsivo alla stimolazione adrenergica; questo rappresenta la conseguenza dell' internalizzazione dei recettori per le catecolammine e della riduzione della loro esposizione sulla superficie cellulare.

È stato ipotizzato che questa condizione possa essere dovuta principalmente alla fosforilazione dei recettori β -AR ad opera della protein chinasi accoppiata a recettori β -AR (GRK2) (Inglese J., et al 1993). In seguito alla fosforilazione, il recettore viene legato dalla β -arrestina e internalizzato. È stato dimostrato che nel soggetto scompensato il gene che codifica per GRK2 è sovraregolato (Ungerer M., et al 1993) è proprio tale condizione riduce la capacità dei cardiomiociti di rispondere alla stimolazione del SNS. In alcuni studi è stato messo in evidenza come in seguito a impianto del dispositivo LVAD (Pandalai PK., et al 2006; Akhter SA., et al 2010) ci sia una normalizzazione dei livelli circolanti di catecolammine, ma soprattutto, è stata registrata una riduzione dell'espressione di GRK2 nel miocardio. Dunque, l'uso del dispositivo di assistenza ventricolare, scaricando il ventricolo dalla sua funzione, favorisce il ripristino della captazione della noradrenalina con conseguente aumento della risposta del miocardio alla stimolazione simpatica e quindi recupero della funzione cardiaca (Birks EJ. 2013).

1.7.2.6 La Matrice Extracellulare

L'ECM (che costituisce circa il 2-4% del peso del miocardio normale) è composta da diversi elementi tra cui: fibronectina, elastina, laminina e collagene, in particolare di tipo I e III, che

rappresenta l'elemento più abbondante (circa il 90%) della matrice. Il collagene riveste diverse funzioni del miocardio: mantiene la composizione strutturale, trasmette forza e elasticità al sistema contrattile (Birks EJ. 2013). Come visto, in corso di rimodellamento diversi e importanti cambiamenti ricadono a carico della matrice tra cui processi fibrotici, che determinano la deposizione di nuova matrice, ma anche processi degradativi con l'attivazione delle MMPs. In seguito ad impianto del LVAD sono stati osservati ulteriori cambiamenti nella matrice e nel metabolismo del collagene e alle volte i risultati, ottenuti dai diversi gruppi, sono apparsi contrastanti tra di loro. Mentre alcuni gruppi hanno dimostrato un incremento della produzione di collagene, dopo l'impianto del LVAD (Bruckner BA., et al 2001; Akgul A., et al 2004; Thompson LO., et al 2005) altri hanno rilevato il contrario (Klotz S., et al 2005; Bruggink AH., et al 2006; Li YY., et al 2001). Le spiegazioni che motivano questa diversità possono essere correlate all' "evento indice" o danno originale del cuore che può sfociare in SC, ma anche alla durata del trattamento con il dispositivo (Bruggink AH., et al 2006; Madigan JD., et al 2001), all'uso contemporaneo di una terapia farmacologica e, se è riscontrato, dal recupero del miocardio (Birks EJ. 2013). Klotz e collaboratori hanno dimostrato come, in seguito all'impianto del LVAD, ci sia un aumento della produzione di collagene sia di tipo I che di tipo III contemporaneamente ad un aumento della rigidità del miocardio (Klotz S., et al 2005). Bruggink e collaboratori hanno trovato una risposta bifasica del cuore in seguito all'impianto del dispositivo con un aumento iniziale fibrosi, seguita da una successiva regressione della stessa con prolungarsi della terapia con il LVAD (dopo 200 giorni di supporto) (Bruggink AH., et al 2006).

In un successivo studio Klotz e collaborato hanno valutato i cambiamenti a cui la matrice può andare incontro in un soggetto scompensato al quale oltre all'impiantato un dispositivo LVAD si aggiunge il trattamento con ACE-inibitori (Klotz S., et al 2007). Klotz e collaboratori hanno esaminato campioni di tessuto cardiaco, pre- e post-LVAD, di pazienti che in seguito ad impianto del dispositivo sono stati divisi in due gruppi: gruppo 1, pazienti trattati con ACE-inibitori; gruppo 2 pazienti non trattati con ACE-inibitori.

Prima dell'impianto i livelli di angiotensina I, angiotensina II e collagene totale sono risultati simili tra i due gruppi, tuttavia in seguito impianto del dispositivo si è visto che i livelli di angiotensina II sono calati nel gruppo 1, mentre sono aumentati nel gruppo 2. Analogamente, si riducono i livelli di collagene nei soggetti del gruppo 1, condizione che riduce la rigidità del ventricolo e la massa ventricolare sinistra. Tali modificazioni invece non è rilevata per i pazienti del gruppo 2 (Klotz S., et al 2007). Inoltre è stato anche dimostrato come, sempre per i soggetti del gruppo 1, ci sia una normalizzazione dei livelli di MMPs e TIMP-1 tale da recuperare il loro rapporto fisiologico 1:1, migliorando in questo modo il *turnover* della matrice (Fig.26). Questi

dati dimostrano l'importante contributo dalle terapie farmacologiche nei pazienti in cui è stato impiantato un LVAD, al rimodellamento inverso ed al recupero della capacità contrattile del cuore (Birks EJ. 2013).

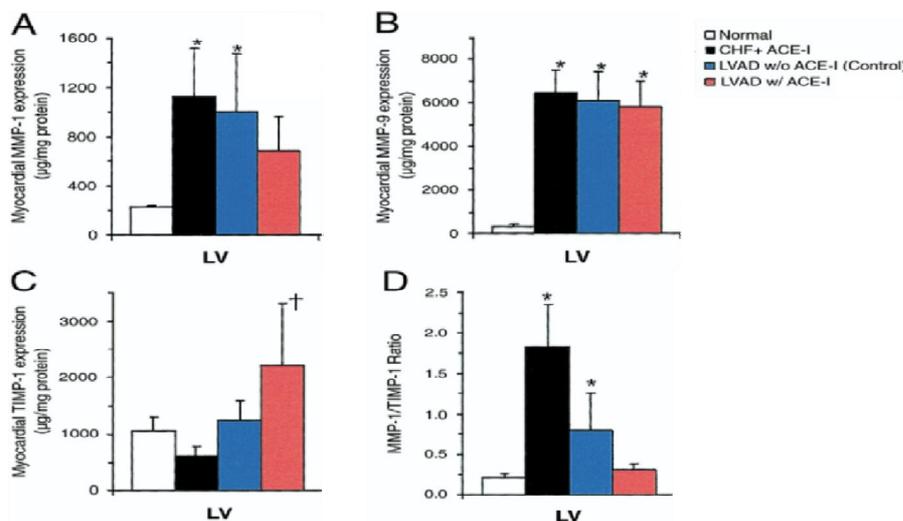


Figura 26: Misurazione dei livelli di proteine di MMPs e TIMP in frammenti di tessuto prelevati da cuore: normale (bianco), cuore di soggetto con SC cronico trattato con ACE-Inibitori (nero), cuore supportato da LVAD senza terapia farmacologica (blu), cuore supportato da LVAD con terapia farmacologica (rosso). A) Variazione dell'espressione della MMP-1 nelle 4 categorie si nota una riduzione della proteina MMP-1 nei pazienti che dopo l'impianto ricevono trattamento con ACE-inibitore; B) elevati livelli di MMP-9 si hanno nella categoria di soggetti SC pre-LVAD rispetto ai soggetti normali, questa elevata espressione non tende a diminuire dopo l'impianto del dispositivo sia nel gruppo che riceve trattamento farmacologico sia in quello senza trattamento; C) livelli di TIMP-1 risultano particolarmente elevati nel gruppo LVAD trattato con ACE-inibitori; D) normalizzazione del rapporto MMP-1/TIMP-1 si registra nel gruppo LVAD trattato con ACE-inibitori. Modificato da (Klotz S., et al 2007).

In uno studio del 2011, Caruso e collaboratori, hanno ricercato le variazioni, in termini di attività e di espressione genica, delle gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) e degli inibitori TIMP-1 e -4 nei soggetti con SC grave che vengono sottoposti all'impianto del LVAD come ponte al trapianto, confrontando i risultati con soggetti che invece arrivano direttamente al trapianto. Come risulta dalla Fig. 27, in seguito all'impianto del dispositivo si evidenziano dei livelli più bassi di espressione delle MMP-2 e -9 rispetto ai pazienti che arrivano direttamente al trapianto, ma non risulta significativa la differenza tra espressione di TIMP-1 e -4 tra i due gruppi (Caruso R., et al 2011).

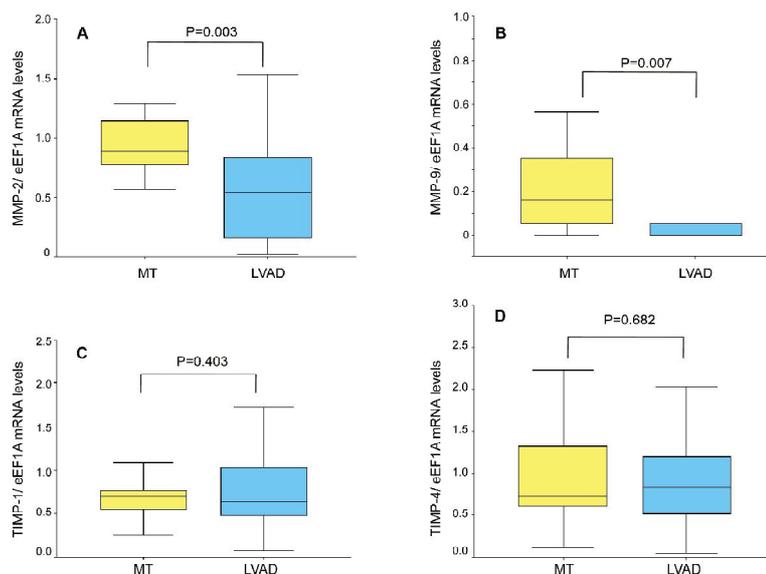


Figura 27: Confronto della variazioni di espressione: A) MMP-2; B) MMP-9; C) TIMP-1; D) TIMP-4 effettuata su campioni di cuore ottenuti da pazienti scompensati che vanno direttamente al trapianto MT (BOX giallo) e pazienti che arrivano al trapianto dopo trattamento con LVAD (BOX azzurro). Modificato da Caruso R., et al 2011.

Oltre ad una diminuita espressione delle MMPs si osserva, come detto, una ridotta attività di questi enzimi, queste variazioni possono essere spiegate dallo stato redox in cui si viene a trovare il miocardio nelle due diverse situazioni. È noto che il glutatione (GSH) modula l'attività di MMP-2 ricombinante e -1 modificando il residuo di cisteina (Cys) nel dominio auto-inibitorio dello zimogeno, una condizione che mantiene la MMPs in una forma inibita latente (Viappini S., et al 2009; Koch S., et al 2009). In saggi in vitro, composti di zolfo, come GSH, inibiscono le MMP-2 ricombinante umana e -9 (Emara M., et al 2006). Partendo da queste informazioni è stato dimostrato che i livelli di GDH sono molto più elevati nei pazienti con LVAD rispetto all'altro gruppo, e che questi valori correlano negativamente con l'attività delle MMPs.

1.7.2.7 *L'infiammazione*

Lo SC viene spesso definito come un processo caratterizzato da un persistente evento infiammatorio, con elevati livelli circolanti di citochine pro- e anti-infiammatorie. L'attivazione della risposta infiammatoria nello SC può essere la conseguenza della presenza di antigeni riconosciuti come possibili elementi nocivi (come in caso di miocarditi acute o reazioni di rigetto del trapianto), oppure l'infiammazione si può attivare come risposta ad eventi che danneggiano il miocardio (come nel caso di infarto).

Elevati livelli delle citochine pro-infiammatorie sono associate alla progressione dello SC e sono implicate nella riduzione della capacità contrattile del cuore, nell'attivazione dell'evento apoptotico ed ad altri effetti che sono stati precedentemente descritti. Queste citochine possono essere usate come biomarcatori per stabilire la gravità dei pazienti, in modo da capire

anche quando è il caso di intervenire con diverse terapie, compreso l'impianto di dispositivi di assistenza ventricolare come il LVAD (Birks EJ., et al 2004).

Mentre per altri meccanismi è stato compreso come l'impianto del LVAD possa influenzare, positivamente o negativamente, il decorso clinico del paziente, resta da chiarire l'effetto del LVAD sul processo infiammatorio.

Citochine pro-infiammatorie

TNF- α , IL-1 e IL-6 vengono comunemente catalogate come citochine pro-infiammatorie, mediano infatti effetti importanti nell'attivazione della risposta infiammatoria e immunitaria in caso di danno. Studi relativi alla valutazione dell'effetto dell'impianto di LVAD sul profilo citochinico, sia a livello circolante che nel miocardio, hanno dato risultati spesso contrastanti. Le discrepanze sono principalmente ascrivibili al piccolo numero di pazienti valutati nei singoli studi, ai diversi tempi e modalità di campionamento, alle diverse tecniche usate per valutare la presenza di citochine (tecniche di biologia molecolare e relative strategie di normalizzazione, tecniche di immunostochimica).

Elevati livelli di queste citochine risultano fattori di prognosi sfavorevole per il soggetto con SC, come dimostrato in uno studio del 2001 da Birks e collaboratori. Questi, quantificando i livelli di citochine sia a livello sierico che nel miocardio di soggetti con SC grave che necessitavano dell'impianto del dispositivo, hanno dimostrato come i livelli TNF- α , IL-1 e IL-6 siano marcatamente più elevati in tali soggetti rispetto a pazienti con SC in uno stadio avanzato, ma con un quadro clinico più "stabile", che sono stati sottoposti al trapianto d'organo senza aver usufruito prima della terapia con LVAD (Fig. 28 viene riportato il caso del TNF- α).

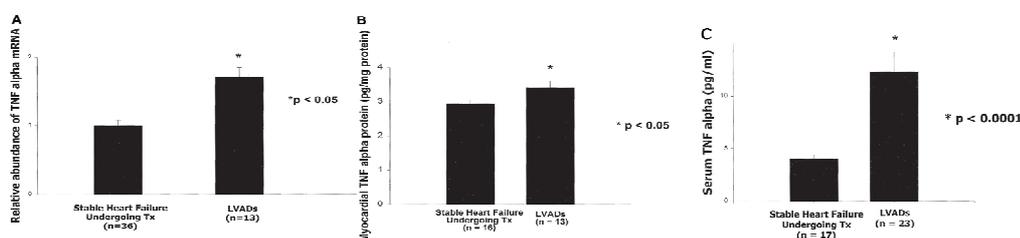


Figura 28: Variazione dei livelli di espressione del TNF- α . A) confronto tra i livelli del trascritto del TNF- α nel tessuto cardiaco dei soggetti con SC stabile sottoposti a trapianto e soggetti in cui è stato impianto il dispositivo ; B) confronto tra i livelli proteici del TNF- α nello stesso campione cardiaco; C) confronto dei livelli di citochina in circolo tra i due gruppi di pazienti. Modificato da Birks EJ., et al 2001.

In un recente studio, Caruso e collaboratori, hanno valutato l'impatto del LVAD sull'infiammazione e sullo stress ossidativo, valutando i livelli circolanti di IL-6, IL-8 e TNF- α ad una settimana e ad un mese dall'impianto del dispositivo e confrontandoli con i valori pre-impianto (Caruso R., et al 2012). Un miglioramento emodinamico ed una diminuzione di pressione di riempimento di LV sono osservati fin dalle prime ore dopo l'impianto di LVAD. Lo scarico meccanico dovuto al dispositivo, diminuendo le pressioni cavitari del LV, provoca la diminuzione dei segnali di parete legati allo stress che promuovono cambiamenti favorevoli sia a livello del miocardio che a livello periferico con un recupero della responsività ai fattori neurormonali (Burkhoff D., et al 2006). Tutte queste condizioni sembrano associate anche al recupero cardiaco (Klotz S., et al 2008). Scaricando il ventricolo dal lavoro meccanico a cui è sottoposto, si presuppone che si crei una situazione favorevole che determina una riduzione dei livelli delle citochine pro-infiammatorie e dei loro effetti avversi negativi sul cuore.

È emerso, quindi, che tutte le variabili infiammatorie sono aumentate durante la prima settimana dall'impianto del dispositivo, probabilmente come conseguenza dell'intervento chirurgico, con l'eccezione dei livelli di TNF- α che si riducono, ma a 1 mese, i loro livelli sono tornati paragonabili ai valori pre-impianto (Caruso R., et al 2012).

Dati ottenuti da un altro studio condotto sul tessuto cardiaco ottenuto da 8 pazienti, di cui 4 avevano ricevuto il dispositivo come ponte al recupero e 4 come ponte al trapianto rivelano una significativa riduzione del TNF- α dopo supporto con LVAD, maggiore nel primo gruppo rispetto al secondo (Torre-Amione G., et al 1999). Questi dati suggeriscono che la variazione dell'espressione di TNF- α possa essere utile per prevedere quali pazienti dopo l'uso di LVAD avranno una maggiore possibilità di recupero.

Inoltre, sebbene si osservi un'alta variabilità inter-individuale, i livelli di TNF- α sembrano correlare positivamente con i livelli di Fas sia in fase pre che post impianto del dispositivo (Bedi MS., et al 2008), sostenendo il processo apoptotico nel muscolo cardiaco e limitando la possibilità di ripresa della sua funzione (Fig.29).

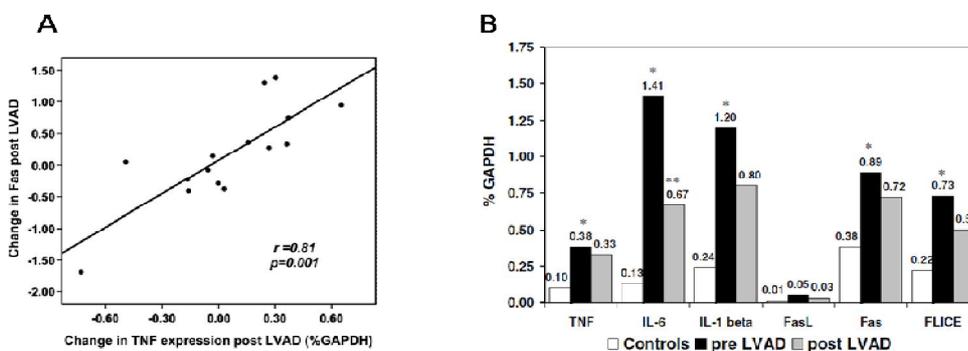


Figura 29: A) Scatter plot che mostra la relazione tra TNF- α e Fas post-LVAD; B) Valutazione delle variazioni dei livelli di espressione genica per le principali citochine pro-infiammatorie e fattori apoptotici in controlli, campioni pre e campioni post-LVAD. Modificato da Bedi MS. et al 2008.

Bedi e collaboratori hanno dimostrato in soggetti, che hanno subito l'impianto del dispositivo come ponte al trapianto, che tra le citochine valutate solo IL-6 appare significativamente ridotta al momento dell'espianto del dispositivo come si evince dalla Figura.. (Bedi MS., et al 2008), mentre rimangono alti i livelli di IL-1 β , TNF- α e Fas, i quali riducono la possibilità di recuperare la funzionalità (anche solo sufficiente) del ventricolo.

Questi dati suggeriscono che una terapia che sia in grado di ridurre l'espressione delle citochine e fattori apoptotici possa essere utile, se somministrata in concomitanza con il trattamento con il dispositivo, per aumentare il numero di pazienti che recuperano la funzione del LV dopo l'impianto del LVAD (Bedi MS., et al 2008). Più dirente un aumento significativo dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e IL-8 è stata osservata nel tessuto cardiaco di pazienti candidati all'impianto di LVAD rispetto a pazienti con SC di simile gravità (Caselli C., et al 2013).

GDF-15

Al GDF-15 viene comunemente attribuito un ruolo cardioprotettivo. La sua sintesi nei cardiomiociti in *vitro* aumenta in caso di stress meccanico e sembra inibire l'attivazione della via apoptotica ed eventi ipertrofici, svolgendo così una funzione protettiva.

Anche per questa citochina, come visto per l'altre appena descritte, si registrano aumentati livelli in circolo nei pazienti con SC, questi sono associati con la progressione della malattia ed un aumentato rischio di morte (Anand IS., et al 2010). Pertanto il GDF-15 può essere considerato come un utile biomarcatore per le malattie cardiovascolari.

Lok e collaboratori, in un recente studio del 2012, hanno valutato le variazioni di concentrazione del GDF-15 in pazienti con SC, appartenenti alla classe NYHA IV, che sono stati sottoposti ad impianto del dispositivo LVAD a flusso continuo. I dati ottenuti derivano da campioni plasmatici raccolti prima dell'impianto del dispositivo, al momento dell'impianto, dopo un mese, dopo sei mesi e dopo l'espianto del dispositivo (al momento del trapianto). È stato osservato è che: quasi tutti i pazienti mostravano elevati livelli plasmatici di GDF-15 prima dell'impianto di LVAD; questi valori diminuivano già ad un mese dal trattamento con il dispositivo e a sei mesi solo il 25% dei pazienti presentava livelli ancora elevati (Lok SI., et al 2012). I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di tessuto cardiaco, sia tramite immunostochimica che tramite analisi dell'espressione genica, hanno rivelato che i livelli di GDF-15 sia pre che post LVAD nel cuore sono minimi e non possono, da soli, influenzare il decorso clinico del paziente.

Da questi dati emerge che in caso di SC la principale fonte di GDF-15 non è il cuore ma GDF-15 è prodotto dai tessuti e organi che diventano malfunzionanti in seguito alla disfunzione

cardiaca. Infatti, nel momento in cui viene impiantato il dispositivo e viene stabilita una adeguata perfusione dei tessuti, i livelli della citochina diminuiscono sensibilmente e questi valori sembrano correlare con quelli della creatinina e dell'aspartato aminotrasferasi (AST) (LokSI.,etal2012).

SCOPO

L'infiammazione rappresenta un processo biologico fondamentale che è coinvolto in quasi tutti gli aspetti della malattia cardiovascolare, compreso lo scompenso cardiaco (SC) (Jiang B., et al 2010). Numerosi studi hanno sottolineato l'importanza di mediatori pro-infiammatori, come TNF- α , IL-6 e IL-8 nello sviluppo e nella progressione dello SC (Schultz Jel J., et al 2002; Kleinbongard P., et al 2011; Shimano M., et al 2012). Questi fattori possono indurre rimodellamento miocardico patologico, sia promuovendo il reclutamento di cellule infiammatorie sia producendo effetti negativi sulla funzione del ventricolo sinistro, quali il rimodellamento ventricolare sinistro e la disfunzione endoteliale, favorendo così la crescita ipertrofica e fibrosi (Ambardekar AV., et al 2011). Il riconoscimento dell'infiammazione come un elemento comune nei pazienti con SC cronico ha contribuito alla ricerca di una efficace terapia anti-infiammatoria per questa patologia. Tuttavia, gli approcci utilizzati finora sono stati in gran parte deludenti, determinando in alcuni casi risultati neutri, in altri addirittura un peggioramento dello SC. Questi risultati hanno sollevato importanti considerazioni, tra cui l'importanza della ricerca di nuovi target terapeutici, specialmente attraverso la ricerca di base (Heymans S., et al 2009).

Nuove molecole prodotte dal tessuto cardiaco (indicate complessivamente come cardiocchine) e regolate in condizioni di stress cardiaco sono state recentemente individuate attraverso tecniche di biologia molecolare come analisi di espressione genica, test di screening, tecniche di clonazione (Schultz Jel J., et al 2002). Con l'uso di modelli animali murini modificati geneticamente, molti di questi fattori recentemente identificati hanno dimostrato di svolgere un ruolo funzionale nel rimodellamento cardiaco. Ad esempio, il sistema IL-33/ST2 è risultato essere coinvolto in importanti meccanismi protettivi in varie malattie cardiache tra cui lo SC (Sanada S., et al 2007; Seki K., et al 2009; Abston ED., et al 2012).

Nonostante i significativi progressi nel trattamento dello SC, i pazienti con SC avanzato continuano a presentare una significativa morbilità e mortalità. Come lo SC giunge allo stadio terminale, le uniche opzioni valide attualmente disponibili sono il trapianto, l'assistenza con LVAD, o l'assistenza terapeutica in fase terminale (Rose EA., et al 2001; Simon MA., et al 2005; McMurray JJ., et al 2012). Il LVAD determina un profondo scarico di volume e pressione del ventricolo sinistro e normalizza la pressione arteriosa sistemica e il flusso, determinando inoltre, a lungo termine, una normalizzazione anche dei livelli neuroormonali, che contribuiscono al recupero miocardico (Simon MA., et al 2005; Birks EJ., et al 2006). LVAD fornisce un modello unico che permette di studiare i meccanismi molecolari sia del rimodellamento avverso sia di quello inverso (Jiang B., et al 2010).

L'ipotesi di questo studio è che il sistema IL-33/ST2 possa essere coinvolto nel danno emodinamico nei pazienti con SC in fase avanzata, candidati per l'impianto di LVAD, e possa

contribuire in maniera significativa alla loro prognosi. Per studiare questa ipotesi, è stato valutato il profilo fenotipico infiammatorio di pazienti sottoposti ad impianto di LVAD, tenendo conto sia del sistema IL-33/ST2 sia dei biomarcatori infiammatori tradizionali, come IL-6 , IL-8 e TNF- α . A completamento della valutazione del profilo infiammatorio negli stessi pazienti sono stati studiati anche due molecole con dimostrata azione anti-infiammatoria e cardioprotettiva, come l'ADN (Shibata R., et al 2009) e il GDF-15 (Shimano M., et al 2012). Una migliore caratterizzazione del profilo infiammatorio porterà ad una migliore comprensione di importanti meccanismi molecolari dello SC e permetterà di identificare nuovi bersagli diagnostici e terapeutici per questa patologia.

In particolare, gli obiettivi specifici di questo studio di tesi sono:

- 1) valutare il ruolo del processo infiammatorio in pazienti con SC sottoposti a impianto di LVAD (gruppo pre-LVAD) e confrontarlo con quello di pazienti con SC stabili sottoposti a trapianto di cuore (gruppo HT), considerati come gruppo di controllo;
- 2) valutare l'effetto del supporto LVAD sull'infiammazione, confrontando il gruppo di pazienti pre-LVAD con pazienti studiati al momento della rimozione del supporto LVAD (gruppo post-LVAD);
- 3) valutare il ruolo dei vari indici del processo infiammatorio nell'outcome precoce nel gruppo di pazienti pre-LVAD.

MATERIALI E METODI

3 Pazienti e protocollo sperimentale

Un totale di ventidue pazienti con SC allo stadio terminale (con età compresa tra i 48 e i 64 anni), sottoposti a impianto LVAD come ponte al trapianto cardiaco, sono stati arruolati nello studio (gruppo pre-LVAD).

Tutti i pazienti sono stati supportati da dispositivi assiali flusso continuo [16 con dispositivo *HeartMate II LVADs* (Thoratec, Pleasanton, CA), 4 con *Incor LVADs* (Berlin Heart AG), 1 con *De Bakey LVADs* (MicroMed Technology, Inc., Houston, TX), e 1 con *HeartWare LVAD* (HeartWare International Inc., Framingham, MA)].

Biopsie cardiache sono state ottenute al momento dell'impianto del dispositivo mentre i campioni ematici sono stati raccolti in fase pre-impianto, e successivamente a 1 mese dall'impianto del LVAD. La funzione multi-organo è stata monitorata in fase preoperatoria e fino a 2 settimane dopo l'impianto di LVAD, attraverso il calcolo del punteggio tSOFA (*total Sequential Organ Failure Assessment*). Il sistema SOFA è un punteggio da 0 a 4 che viene attribuito giornalmente, in proporzione alla gravità del deterioramento funzionale per ognuno dei sei sistemi monitorati (cardiovascolare, respiratorio, epatico, renale, neurologico, ed emocoagulativo) (Chen YS., et al 2001).

Il decorso clinico di questi pazienti è stato valutato sulla base dei seguenti end-point:

- punteggio tSOFA dopo 1 settimana dall'impianto,
- durata della degenza nell'unità di terapia intensiva (ICU),
- durata del ricovero in ospedale, e
- sopravvivenza a 3 mesi dall'impianto.

La combinazione tra punteggio tSOFA postoperatorio ≥ 11 e/o ICU-morte è stata presa in considerazione come il principale *end-point* integrato di prognosi.

Al fine di valutare la condizione infiammatoria nei pazienti con SC allo stadio terminale e l'effetto del supporto del LVAD, i mediatori infiammatori determinati nel gruppo pre-LVAD sono stati confrontati con altri due gruppi di pazienti, rispettivamente:

- 1) gruppo di controllo (HT): campioni cardiaci sono stati raccolti al momento del trapianto di cuore da sette pazienti con scompenso cardiaco cronico stabile sottoposti a terapia farmacologica, senza precedente supporto meccanico circolatorio;
- 2) gruppo post-LVAD: biopsie cardiache sono state ottenute da sei pazienti supportati da LVAD (impiantato come ponte al trapianto cardiaco) al momento dell'espianto del dispositivo. Cinque pazienti erano supportati da dispositivi assiali a flusso continuo [3 con *De Bakey LVAD* (MicroMed Technology Inc, Houston, MT, USA), e 2 con

HeartMate II LVAD (Thoratec, Pleasanton, CA, USA)], mentre 1 paziente era supportato da un dispositivo a flusso pulsatile (*NewCorTec*, Roma, Italia).

L'arruolamento dei pazienti, la loro caratterizzazione clinica e la raccolta dei campioni biologici è stata possibile grazie alla collaborazione con la sede di Milano dell'IFC-CNR e con l'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano.

Lo studio, conforme ai principi enunciati nella Dichiarazione di Helsinki, è stato approvato dal comitato etico locale.

Tutti i pazienti prima di essere coinvolti nello studio hanno dato il loro consenso informato.

3.1 Campioni biologici

Le biopsie cardiache del gruppo pre-LVAD sono state raccolte al momento dell'impianto del dispositivo di assistenza meccanica dalla porzione apicale del ventricolo sinistro, esciso durante la procedura chirurgica standard (necessaria per il posizionamento della cannula di afflusso).

Per i gruppi post-LVAD e HT cinque campioni di tessuto cardiaco sono stati prelevati al momento del trapianto da differenti aree sia del ventricolo sinistro (LV) che destro (RV), in particolare da apice, parete anteriore e laterale, come mostrato in Fig. 30. In totale i campioni di tessuto cardiaco ottenuti sono stati ventidue per il gruppo pre-LVAD, trenta per il gruppo post-LVAD e trentacinque per il gruppo HT .

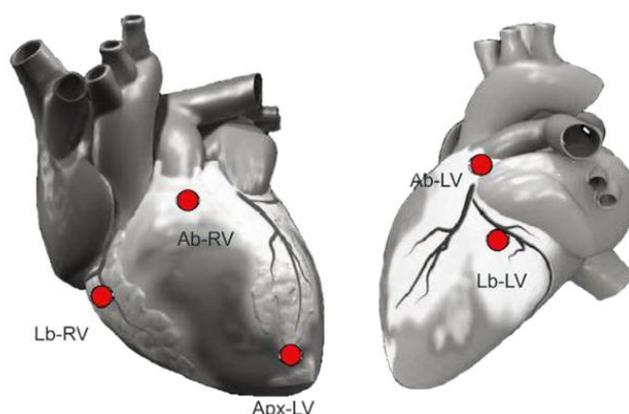


Figura 30: Biopsie di tessuto cardiaco prelevate al momento del trapianto (Ab-RV/LV= area basale anteriore destra e sinistra; Lb-RV/LV=area basale laterale destra e sinistra; Apx-LV= apice del ventricolo sinistro). Modificato da Caruso R., et al 2011.

Immediatamente dopo il prelievo, i campioni miocardici sono stati posti in RNAlater (RNA stabilization reagent, Qiagen GmbH, Hilden D) e conservati a -80°C fino al momento dell'uso. Un sottogruppo di campioni provenienti dal gruppo pre-LVAD è stato congelato in azoto liquido e conservato a -80°C. Tali campioni congelati, inseriti in una fiasca di Teflon preraffreddata, sono stati liofilizzati utilizzando un Mikro-Dismembrator II (BRAUN, Germania). Il tessuto liofilizzato è stato immediatamente conservato a -80°C fino alle procedure di estrazione.

I campioni ematici del gruppo pre-LVAD ottenuti basalmente e a un mese dall'impianto del LVAD, sono stati raccolti in provette contenenti EDTA come anticoagulante e quindi separati per centrifugazione per 15 min a 1000xg. Il plasma è stato conservato a -20°C e il saggio immunoenzimatico specifico è stato eseguito entro 2 mesi dalla raccolta.

3.2 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto da campioni tissutali cardiaci umani con il metodo della guanidina tiocianato-fenolo cloroformio (TRI-REAGENT: Molecular Research Center, Cincinnati USA), modificato al fine di ottenere buone rese di estrazione da piccole quantità di tessuto. Tale procedura permette l'isolamento simultaneo di RNA (RNeasy Fibrous tissue Mini kit, Qiagen S.p.A, Milano, Italia) DNA e proteine da uno stesso campione.

I campioni, conservati a -80°C, in RNAlater vengono scongelati in ghiaccio e pesati. La quantità ottimale, scelta per ogni campione, è compresa tra 80-100 mg.

I tessuti sono stati omogenizzati in TRI-REAGENT (500µL per i campioni conservati in RNAlater e 1mL per i campioni liofilizzati) utilizzando il Mixer Mill MM300 (Qiagen S.p.A, Milano, Italia).

L'alta concentrazione di guanidina tiocianato presente nel TRI-REAGENT provoca una rapida inattivazione dell'attività delle RNAsi endogene e completa la dissociazione delle componenti cellulari dal RNA; l'aggiunta di cloroformio (70µL), dopo l'omogenizzazione, e la centrifugazione del campione a 12000g per 16 minuti a +4°C, permettono la separazione della fase acquosa incolore contenente prevalentemente RNA, dalla fase organica contenente per la maggior parte proteine e lipidi. La fase acquosa è stata isolata dalla fase organica e quest'ultima verrà conservata in aliquote a -20°C, previa aggiunta di etanolo 96%, fino al momento dell'uso.

La fase acquosa, dopo aggiunta di etanolo, viene caricata su una colonna di gel di silice (Mini Spin Column RNeasy, Qiagen S.p.A, Milano, Italia) in grado di legare l'RNA presente nel campione. Dopo un primo lavaggio con una soluzione di guanidina tiocianato ed etanolo e successiva centrifugazione a 3000g per 5 minuti a +25°C, viene aggiunta una soluzione di DNasi (DNaseStock solution RNase free, Qiagen S.p.A, Milano, Italia) che permette di eliminare le

eventuali interferenze dovute al DNA e quindi di purificare il campione biologico. Seguono ulteriori lavaggi e successive centrifugazioni a +25°C e 3000g, l'RNA viene poi eluito con acqua RNasi free (50 µL) e dopo la prima eluizione, raccolto e caricato nuovamente sulla colonna, al fine di concentrare il campione, il quale viene conservato in aliquote a -80° fino al momento dell'utilizzo.

3.3 Determinazione dell'RNA totale

Per conoscere la concentrazione dell'RNA estratto dai campioni è stato utilizzato sia il metodo spettrofotometrico che l'analisi densitometrica su gel.

Il campione è stato diluito 1:100 con acqua *RNasi free*, caricato in cuvette (UVette, Eppendorf, Italy), e l'assorbanza è stata letta alle lunghezze d'onda di 260 nm e di 280 nm, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro (*Biophotometer, Eppendorf, Italy*).

Ogni lettura è stata normalizzata rispetto al valore di assorbanza del relativo bianco.

La concentrazione di RNA totale è stata valutata attraverso la misura dell'assorbanza a 260 nm (caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici), secondo la legge di Lambert-Beer:

$$A_{260} = \epsilon \times l \times C$$

dove "ε" è il coefficiente di estinzione molare, "l" il cammino ottico percorso dalla luce nel mezzo e "C" la concentrazione del campione. La concentrazione dello RNA è così calcolata:

$$[\text{RNA}]_{\text{campione}} = (A_{260\text{nm}})_{\text{campione}} \times D \times (40 \mu\text{g}/\mu\text{L})$$

Nella formula sopra riportata D è il fattore di diluizione e 40 µg/µL è il valore di concentrazione che è associato ad una soluzione standard di RNA che presenti un'assorbanza pari a 1 quando λ=260nm (ovvero $1/(\sum_{\text{RNA}(260\text{nm})} \times l) = 40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Il rapporto tra l'assorbanza del campione a 260 nm ($A_{260\text{nm}}$) e quella del campione a 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) fornisce un'indicazione della purezza dell'RNA, contenuto nel campione estratto, per quanto riguarda la contaminazione proteica. Si considera pura una soluzione di RNA il cui rapporto ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) sia compreso nell'intervallo 1,8-2,1; variazioni di 0,2-0,4 possono dipendere da oscillazioni del pH della soluzione contenente l'acido nucleico. Il rapporto di assorbanza 260nm/230nm individua sostanze contaminanti di natura non proteica, solitamente residui dei reagenti utilizzati per l'estrazione; in condizioni ottimali dovrebbe essere compreso tra 1,8 e 2,2.

L'integrità dell'RNA totale estratto è stata valutata attraverso una corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1,5% in tampone TBE (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*), in condizioni denaturanti e in presenza di un agente intercalante, quale il *GelStar Stain (Lonza, Rockland, ME, USA)*.

I campioni vengono prelevati da -80°C e mantenuti a +55°C, per eliminare l'eventuale presenza di RNasi endogene; in seguito viene aggiunta, in rapporto 1:3, una soluzione contenente formaldeide e blu di bromofenolo (*The NorthernMax Formaldehyde Load Dye, Ambion Inc. Austin, USA*), (1 µL di campione + 3 µL di Load Dye).

I campioni così preparati vengono incubati per 15 minuti a +65°C, per permettere la denaturazione delle strutture secondarie dell'RNA, poi centrifugati e caricati sul gel. L'elettroforesi viene effettuata a 50 Volt per 50 minuti e il gel analizzato al trans illuminatore ($\lambda = 260 \text{ nm}$, *UV Transilluminator 2000, Bio-Rad Laboratories Inc., CA*) per verificare la comparsa di due bande nette in corrispondenza delle subunità 18 e 28 Svedberg (S) dell'RNA ribosomiale. Per confermare la concentrazione del campione, valutata dalla lettura allo spettrofotometro, le bande, ottenute dalla corsa elettroforetica, sono state analizzate con un programma specifico per analisi densitometriche su gel (*Quantity One Software, Bio-Rad Laboratories Inc., CA*) in grado di determinare l'intensità della banda stessa. Il rapporto tra l'intensità ottenuta e quella di un campione standard di RNA totale di cellule umane (1 µg/µl) permette di determinare la concentrazione di RNA nel campione incognito.

3.4 Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA

La retrotrascrizione effettuata grazie all'azione della trascrittasi inversa, enzima isolato per la prima volta dai retrovirus eucariotici. Tale enzima è una *DNA polimerasi DNA/RNA dipendente* capace di sintetizzare una molecola di cDNA a partire da uno stampo di RNA, difatti in presenza di una coda di mRNA-poliA⁺ a singolo filamento e di un innesco di oligonucleotidi poli-dT, è in grado di retrotrascrivere tutti gli mRNA nei relativi filamenti di DNA complementari a doppia elica ed etero duplici, cDNA. Dopo denaturazione con calore, il frammento di cDNA rimanente è usato come template dalla polimerasi, nei successivi passaggi di amplificazione. La trascrizione inversa (RT) di mRNA a cDNA viene effettuata utilizzando l'*iSCRIPT cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories Inc., CA).

La reazione di retrotrascrizione è catalizzata dall'enzima retrotrascrittasi *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV), una DNA polimerasi RNA/DNA dipendente, modificata ed ottimizzata per la sintesi di cDNA, che agisce in presenza di uno stampo di mRNA-poliA⁺ a singolo filamento e di un innesco oligodT. Con questo metodo è possibile retrotrascrivere

efficientemente da 0,5/1 a 5µg di RNA totale rispettivamente in 20, 40, 100 µL di volume di reazione a seconda delle necessità.

Il protocollo della reazione, eseguita usando il termociclatore *MyCycler* (Bio-Rad Laboratories Inc., CA), consiste nelle seguenti fasi:

- 5 minuti a 25°C,
- 30 minuti a 42°C,
- 10 minuti a 45-48°C,
- 5 minuti a 85°C.

Quest'ultimo passaggio (85°C per 5 minuti) permette l'inattivazione della trascrittasi inversa. I campioni di cDNA ottenuti sono stati posti in ghiaccio e conservati a 4 ° C.

3.4.1 Real-time PCR

La reazione di Real-time PCR è stata effettuata in un termociclatore automatico (CFX-96 Real-Time System, *Bio-Rad Laboratories Inc., CA*) e per il monitoraggio della reazione di amplificazione del cDNA è stato utilizzato un fluoroforo di terza generazione, l'EvaGreen (*SsoFAST EvaGreen Supermix*, Bio-Rad Laboratories Inc., CA), agente intercalante del DNA a doppio filamento con fluorescenza migliorata rispetto al classico SybrGreen ed anche con una minor capacità di inibire la Taq polimerasi. *SsoFAST EvaGreen Supermix* è estratta dal *Sulfolobus Solfataricus* (*Sso7d*), batterio termostabile e resistente a temperature maggiori di +90°C, in grado di appaiarsi al doppio filamento di DNA mantenendo più stabile il legame tra la polimerasi e la doppia elica e permettendo così l'incorporazione di un maggior numero di nucleotidi che rendono la reazione più resistente agli inibitori e più efficiente. Le condizioni per la reazione di Real-Time PCR sono state ottimizzate nei campioni di tessuto cardiaco per ciascun marcatore analizzato. L'efficienza e la linearità dell'amplificazione sono state valutate variando temperatura di *annealing* (prova gradiente di temperatura) e concentrazione del campione (valutazione della linearità di risposta per diluizioni scalari del campione da 1:5 a 1:625, retta standard). L'efficienza di reazione è stata valutata in un *range* ottimale compreso tra 90-105% e un R² della retta standard ≥0.998. I primer di interesse sono stati disegnati attraverso il *software Primer Express Version 2.0* (Applied Biosystems), come riportato in Tabella 7.

GENI	PRIMER	Gen-Bank, n° accesso
IL-8	F: CCAAGCTGGCCGTGGCTTCTC	NM_000584
	R: TGTGTTGGCGCAGTGTGGTCC	
TNF- α	F: TCCTCAGCCTCTTCTCCTTC	NM_000594.2
	R: CCAGCTGGTTATCTCTCA	
IL-6	F: AGCGCCTTCGGTCCAGTTGC	NM_000600
	R: GTGGCTGTCTGTGTGGGGCG	
ADN	F: AATAACATACGCACTCAACT	NM_001177800.1
	R: GAGGAAGGAAGGAAGGAA	
GDF-15	F: CCGGATACTCACGCCAGA	NM_004864.2
	R: AGAGATACGCAGGTGCAGGT	
IL-33	F: GGAGTGCTTTGCCTTTGGTA	NM_033439
	R: TCATTTGAGGGGTGTTGAGA	
ST2	F: CTCCAAGTTCATCCCCTCT	NM_000877.2
	R: GATCCAAAACCCATTCTGTT	

Tabella 7: Sequenza dei primer dei geni di interesse

Per la reazione di amplificazione del campione precedentemente retroscritto, ogni miscela di reazione conterrà:

- 200 mM di primer senso ed anti-senso,
- 10 μ L di SsoFAST EvaGreen PCR Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., CA),
- 7,2 μ L H₂O e
- cDNA [100 ng/ μ L],

in un volume totale di 20 μ L.

Le reazioni di Real-Time PCR sono state eseguite in duplicato e il template è stato amplificato secondo una reazione di PCR classica che ha previsto una prima fase di denaturazione a +98°C per 30", seguita da 40 cicli a +95°C per 5" con la separazione dei filamenti, una seconda fase di *annealing* ($T_m = +60^\circ\text{C}$ per 30") con l'appaiamento dei *primer* alle sequenze specifiche e il legame di poche molecole fluorescenti alla doppia elica. Durante l'elongazione l'aumento di fluorescenza osservato corrisponde all'incremento del numero di copie dell'amplicone. I valori di fluorescenza emessi sono stati rilevati in tempo reale da un opportuno dispositivo fluorimetrico collegato ad un computer che ha provveduto all'elaborazione dei dati.

Al fine di verificare la specificità dei prodotti amplificati, gli ampliconi sono stati testati attraverso l'analisi delle curve di *Melting*, generate a partire da +65°C a +95°C con un incremento di 0.5 gradi ad ogni ciclo.

3.4.2 Selezione dei geni di riferimento

Seguendo le recenti linee guida (MIQE Guidelines, Bustin SA., et al 2009; Martino A., et al 2011) al fine di ottenere un'accurata normalizzazione dei dati di Real-Time PCR, è importante effettuare un'attenta selezione dei geni di riferimento. In un recente studio, Caselli e collaboratori (Caselli C., et al 2013) partendo da un gruppo di 9 geni candidati di riferimento hanno selezionato quelli più stabili per l'analisi dell'espressione genica nel tessuto cardiaco in un protocollo sperimentale simile a quello di questo lavoro di tesi (Fig. 31).

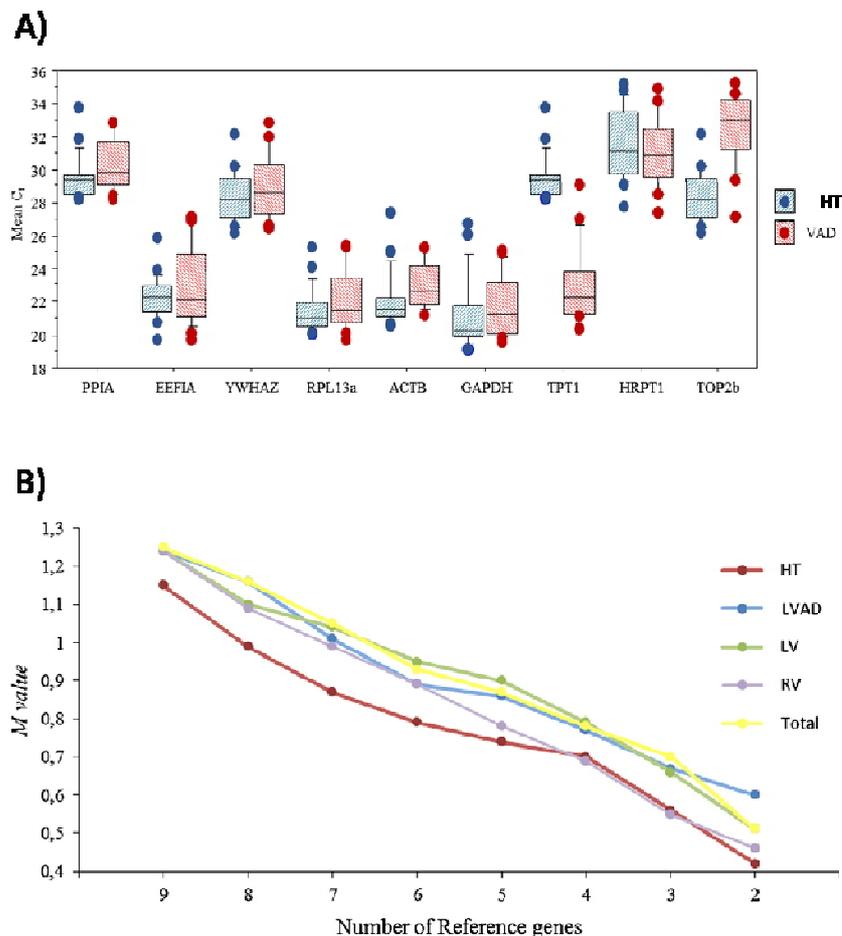


Figura 31: A) Espressione dei geni di riferimento candidati in campioni di tessuto cardiaco provenienti da un gruppo di pazienti con VAD rispetto a campioni provenienti da un gruppo controllo (HT). B) Valutazione della stabilità di espressione dei geni di riferimento (M value). I valori di M sono riportati in funzione del numero progressivo di geni selezionati per i gruppi HT, LVAD, per le diverse regioni cardiache, RV e LV; il valore di M è stato valutato durante la graduale esclusione dei geni meno stabili per ogni gruppo. Modificato da Caselli C., et al 2013.

Sulla base di questi risultati è stato scelto di usare PPIA (*Peptidylpropyl isomerae A*), YWHAZ (*Tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide*) e RPL13a (*Ribosomal protein L13a*) come geni di riferimento (Tabella 8) la cui stabilità è stata confermata nelle nostre condizioni.

GENI	PRIMER	Gen-Bank, n° accesso
PPIA	F: CTTGGGCCGCGTCTCCTTCG	NM_021130
	R: TTGGGAACCGTTTGTGTTTGGGGC	
YWHAZ	F: ATGCAACCAACACATCCTATC	NM_00113572
	R: GCATTATTAGCGTGCTGTCTT	
RPL13a	F: CGCCCTACGACAAGAAAAAG	NM_012423
	R: CCGTAGCCTCATGAGCTGTT	

Tabella 8: Geni di riferimento

3.4.2.1 Normalizzazione dei dati ottenuti in Real-Time PCR

L'espressione dell'mRNA dei geni di riferimento è stata misurata attraverso Real-Time PCR sia nei campioni ottenuti da pazienti pre-LVAD, sia post-LVAD che dai pazienti controllo HT. La stabilità di ogni gene di riferimento nei campioni di tessuto cardiaco, è stata stimata attraverso la combinazione della tecnologia software *GeNorm* e *qBase* (*Biogazelle, Bio-Rad, Laboratories Inc., CA*), al fine di determinare i geni più stabili. Tale algoritmo ha permesso di calcolare il fattore di normalizzazione individuale per ciascun campione analizzato, basandosi sui livelli di espressione dei geni di riferimento più stabili.

La stabilità genica è espressa dal valore M che è calcolato come la media geometrica della variazione di espressione del gene stesso e di tutti gli altri analizzati. I geni più stabili vengono selezionati attraverso l'esclusione selettiva di quelli meno stabili, fino al raggiungimento di un valore soglia di stabilità ($M \leq 0.7$).

La quantificazione relativa dei dati è stata effettuata con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ attraverso il *CFX Manager Software* (Bio-Rad, Laboratories Inc., CA).

3.5 Determinazione dei livelli circolanti di ST2 e IL-33

I livelli circolanti di sST2 e IL-33 sono stati misurati nei campioni di plasma tramite saggi immunometrici specifici (*R&D Systems*, Minneapolis, MN-USA).

Per entrambi gli analiti, il saggio immunoenzimatico è di tipo a sandwich, le cui fasi principali sono illustrate in Fig. 32. In breve, i micropozzetti della piastra sono rivestiti da un anticorpo specifico per l'antigene da misurare. Concentrazioni scalari di antigene standard, per la costruzione della curva dose-risposta, e campioni incogniti vengono aggiunti ai pozzetti e se l'antigene è presente nel campione verrà immobilizzato dall'anticorpo sulla piastra. Dopo due ore di incubazione e lavaggio della piastra, viene aggiunto un anticorpo secondario, specifico per l'antigene in esame coniugato con perossidasi. Dopo ulteriori due ore di incubazione e lavaggi, necessari per eliminare tutto ciò che non si è legato, si aggiunge il substrato cromogeno della perossidasi, in presenza di perossido di idrogeno. Dopo lo sviluppo della reazione colorimetrica, la lettura della densità ottica a 450nm permetterà di determinare la concentrazione dei campioni incogniti, grazie alla curva di calibrazione costruita in ogni esperimento.

Per la determinazione di sST2, la concentrazione minima misurabile è di circa 5.0 pg/mL e per IL-33 di 0.52 pg/mL. Per quanto riguarda il livello di precisione, il coefficiente di variazione (CV%), sia fra saggi che nel saggio è mediamente inferiore al 7% sia per sST2% che per IL-33.

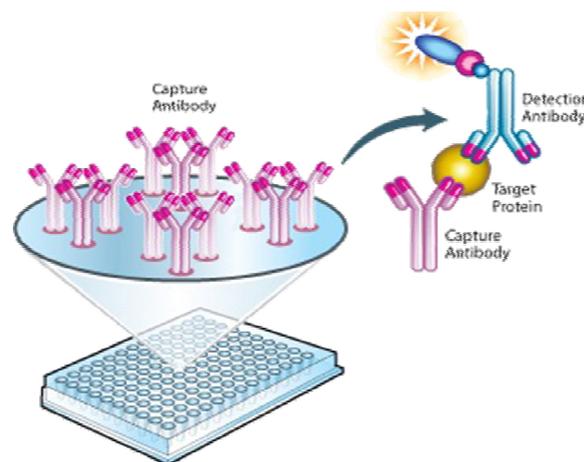


Figura 32: Rappresentazione di un classico test ELISA a sandwich

3.6 Analisi statistica

I dati sono espressi come media e intervallo interquartile (I, III). Per eseguire l'analisi dei dati sono state utilizzate statistiche non parametriche perché i valori dei parametri in oggetto non erano distribuiti normalmente. Le differenze di espressione tra gruppi di pazienti sono state valutate con il test-U di *Mann-Whitney*. Le differenze dei livelli plasmatici basali di citochine e a 1 mese dall'impianto del LVAD sono state valutate con il test *Wilcoxon Signed-Rank*.

Le variabili, non normalmente distribuite, sono state trasformate logaritmicamente per la normalizzazione prima dell'analisi di correlazione dei dati; è stato utilizzato il *test di correlazione di Pearson* per l'analisi di correlazione tra le variabili. Un $P < 0,05$, a due code, è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando *l'SPSS v19* (1989-2010, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RISULTATI

4 Risultati metodologici

4.1 Estrazione di RNA totale

La Fig. 33 riporta i valori della resa di estrazione di RNA totale, partendo sia da campioni di tessuto cardiaco conservati in RNA $later$ che da campioni liofilizzati.

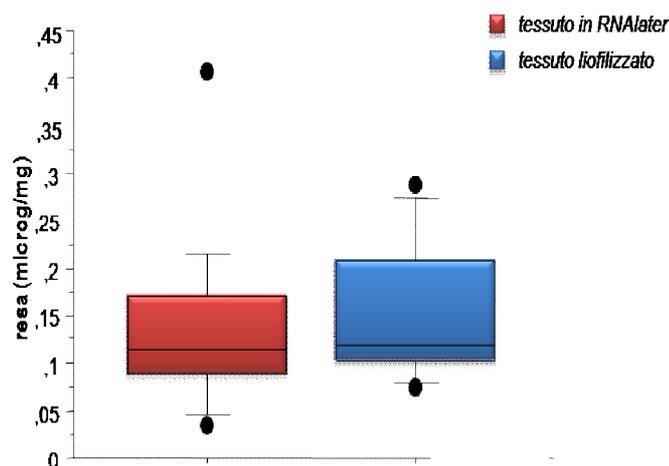


Figura 33: Resa di estrazione di RNA e modalità di conservazione: campioni conservati in RNA $later$ (box rosso) campioni liofilizzati (box blu).

La purezza dell'RNA, valutata attraverso la determinazione del rapporto fra le assorbanze del campione rispettivamente a 260 nm ed a 280 nm non varia in funzione della tecnica di conservazione e di estrazione dei campioni (Fig. 34) ed è risultata compresa nell'intervallo 1,8-2,1.

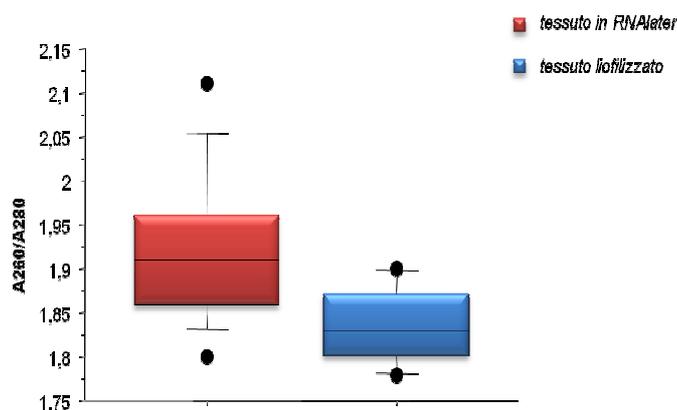


Figura 34: Purezza dell'RNA e modalità di conservazione dei campioni tissutali: campioni conservati in RNA $later$ (n=15; box rosso), campioni liofilizzati (n=7; box blu). Rapporto tra A₂₆₀/A₂₈₀ per verificare eventuale contaminazione da proteine.

Tutti i campioni sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio per valutare l'integrità dell'RNA; a seguito della corsa elettroforetica, per mezzo della luce ultravioletta a 260 nm, è stato possibile osservare le due bande corrispondenti alle subunità 18 S e 28 S di rRNA (Fig. 35).

L'integrità dell'RNA è un requisito fondamentale per l'analisi dell'espressione genica in quanto i pattern di espressione genica possono essere alterati sia da induzione o inibizione della trascrizione sia da eventi di degradazione specifica o aspecifica dell'RNA a seguito dell'estrazione. Infine, per confermare i valori di concentrazione ottenuti tramite lettura spettrofotometrica, la densità ottica è stata analizzata con il programma QuantityOne (Biorad) utilizzando, come riferimento, uno standard di RNA totale di cellule umane (1 µg/µl). I risultati ottenuti sono risultati pienamente comparabili.

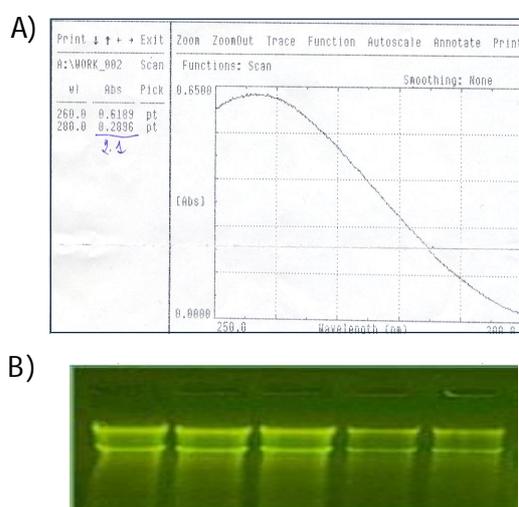


Figura 35: Integrità dell'RNA: A) quantizzazione; B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio relativa a 5 campioni del gruppo pre-LVAD (presi come esempio): risultano ben visibili le bande a 18S (in basso) e 28S (in alto).

4.2 Analisi Real-Time PCR: valutazione delle condizioni ottimali di reazione

Per valutare l'efficienza e la linearità dell'amplificazione di ciascun gene analizzato, sono state effettuate reazioni di Real-Time PCR variando la temperatura di annealing e la concentrazione di RNA.

In Fig. 36 è riportato un esempio relativo alla messa a punto delle condizioni ottimali di Real-time PCR per il gene di riferimento RPL13a. In Fig 36A) sono riportati i cicli-soglia ottenuti da diluizioni seriali 1:5 di un campione di tessuto cardiaco; la Fig 36B) rappresenta la retta standard dalla relativa alle precedenti diluizioni del campione che permette di valutare l'efficienza dei *primer* del gene in esame, mentre in Fig. 36C) e 36D) sono riportate

rispettivamente la curva di Melting ottenuta per il gene studiato in funzione della temperatura e la derivata negativa della curva di Melting in funzione della temperatura e della fluorescenza.

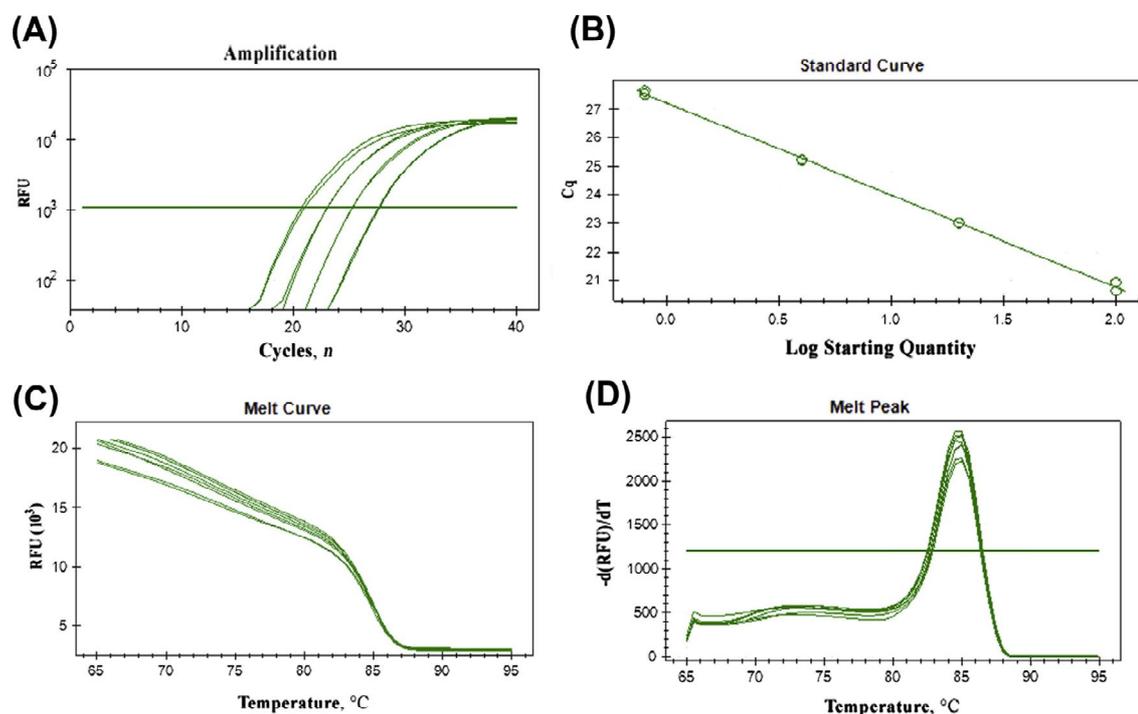


Figura 36: Analisi Real-Time PCR per il gene RPL13a nel tessuto cardiaco umano; A) cicli soglia (Ct) e curve di amplificazione; B) retta standard : pendenza = 3.23, efficienza = 104%, $R^2 = 0,999$; C) curva di Melting ottenuta in funzione della temperatura; D) derivata negativa (-d) della curva di Melting in funzione di Temperatura e fluorescenza (picco di Melting).

L'efficienza di ciascun gene analizzato è risultata nel *range* di 90-105%. Ciascun *primer* è stato utilizzato ad una concentrazione di 0,2 μ M, mentre la temperatura di Melting (T_m) così come il numero di cicli variava per ogni specifica coppia di *primer* (Vedi Tabella 9).

4.3 Selezione dei geni di riferimento

Nel gruppo di campioni utilizzati per questo studio, dalla combinazione della tecnologia software *GeNorm* e *qBase*, PPIA, RPL13a e YWHAZ sono risultati i tre geni di riferimento che presentavano una maggiore stabilità (valore $M < 0,7$), confermando i risultati dello studio di Caselli e collaboratori (Caselli C., et al 2013).

GENI	Tm°C	Cicli
ADN	58°	30
IL-6	64.5°	31
TNF- α	58°	33
GDF-15	64.5°	32
IL-33	60°	33
ST2	60°	31
IL-8	64.3°	34
PPIA	60°	29
YWHAZ	60°	32
RPL13a	60°	25

Tabella 9: Condizioni di analisi Real-time PCR scelte per ogni coppia di primer, sia per i geni in esame che per i geni di riferimento

5 Risultati sperimentali

5.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti

Le caratteristiche cliniche dei pazienti appartenenti ai gruppi sperimentali in esame (pre-LVAD, HT e post-LVAD) sono riportate in Tabella 10.

Gruppo pre-LVAD e gruppo HT

L'età media dei candidati al LVAD (gruppo pre-LVAD) è paragonabile a quella dei pazienti del gruppo HT. La causa clinica determinante che ha portato allo SC 12 dei 22 pazienti del gruppo pre-LVAD e 6 dei 7 pazienti del gruppo HT è risultata nella cardiomiopatia dilatativa idiopatica (IDC).

I parametri ecocardiografici e le terapie mediche non differiscono tra i pazienti pre-LVAD e HT; l'uso di agenti anti-piastrinici e anticoagulanti, è risultato prevalente nel gruppo pre-LVAD rispetto al gruppo HT, in quanto i pazienti in attesa di trapianti devono necessariamente assumere questo tipo di farmaci. I valori della bilirubina totale e della creatinina non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi.

Gruppo pre-LVAD e gruppo post-LVAD

L'età media dei pazienti del gruppo post-LVAD è inferiore rispetto ai pazienti del gruppo pre-LVAD. Nel gruppo post-LVAD, il tempo medio di supporto prima del trapianto di cuore era 367 (152-483) giorni. Al momento del trapianto cardiaco, nei pazienti del gruppo post-LVAD, i livelli dell'indice cardiaco, di pressione atriale destra, di pressione polmonare capillare, così come i livelli di NT-proBNP erano inferiori a quelli del gruppo pre-LVAD, e paragonabili a quelli dei pazienti del gruppo HT.

Condizioni cliniche dopo l'impianto del LVAD

Dopo impianto LVAD, tutti i pazienti del gruppo pre-LVAD hanno avuto un miglioramento emodinamico postoperatorio rispetto alla condizione pre-impianto (dati non mostrati).

A 3 mesi dall'operazione, 4 dei 22 pazienti (18%) del gruppo pre-LVAD erano morti, in genere durante la degenza in terapia intensiva (seconda e terza settimana postoperatoria), con sindrome da insufficienza multiorgano (MOFS) come principale causa di morte. Tra i sopravvissuti, la durata media della degenza in terapia intensiva è stata di 14 (9-23) giorni, mentre l'ospedalizzazione era di 45 (30-67) giorni.

In tutti i pazienti, il tSOFA score a 1 settimana postoperatoria è risultato superiore a quello pre-impianto [9 (4-10) e 4 (2-5), rispettivamente, $p = 0.001$]. Tuttavia, otto pazienti hanno manifestato una grave insufficienza multiorgano evidenziata da un punteggio tSOFA postoperatorio ≥ 11 . Complessivamente, 9 dei 22 pazienti (41%) hanno manifestato un punteggio tSOFA postoperatorio ≥ 11 e/o morte durante la degenza in terapia intensiva, questo due eventi vengono considerati insieme come *end-point* integrato di prognosi.

	Gruppo Pre-LVAD (n=22)	Gruppo HT (n=7)	p-Value*	Gruppo Post-LVAD (n=6)	p-Value [#]
Età	58 (48-64)	55 (46-62)	0.459	44 (41-51)	0.031
Maschi, n (%)	19 (86)	5 (71)	0.569	6 (100)	1.000
Etiologia, n (%)			0.202		0.673
IDC	12 (55)	6 (86)		4 (67)	
IHD	10 (46)	1 (14)		2 (33)	
Trattamenti, n (%)					
ACE-I e/o ARB	13 (59)	5 (71)	0.677	3 (50)	1.000
Beta-bloccanti	16 (80)	5 (71)	0.633	4 (67)	0.596
Statine	6 (27)	2 (29)	1.000	-	0.284
Fattori antiaggreganti	12 (54)	2 (29)	0.390	6 (100) [§]	0.062
Inotropi	11 (50)	1 (14)	0.187	2 (33)	0.655
Creatinina, mg/dL	1.08 (0.90-1.53)	1.32 (1.00-1.78)	0.313	0.95 (0.83-1.48)	0.599
t-Bil, mg/dL	1.43 (0.55-1.90)	0.76 (0.48-1.14)	0.212	0.73 (0.31-1.34)	0.199
NT-proBNP, ng/L	2838 (1371-6042)	2389 (840-5762)	0.522	599 (158-1036)	0.007
LVEF, %	23 (19-25)	28 (20-29)	0.220	32 (20-33)	0.104
LVEDV, mL	202 (173-291)	228 (206-300)	0.185	239 (197-259)	0.820
LVEDD, mm	67 (57-71)	70 (68-79)	0.132	68 (60-75)	0.633
RAP, mmHg	5 (3-10)	3 (2-5)	0.074	5 (2-10)	0.969
PCWP, mmHg	25 (17-31)	11 (4-20)	0.019	10 (7-21)	0.023
CI, L/min/m ²	1.7 (1.4-2.2)	2.0 (1.5-2.7)	0.362	2.3 (1.9-2.8)	0.085
PAPs, mmHg	55 (42-63)	28 (19-42)	0.012	29 (21-33)	0.006

Tabella 10: Caratteristiche cliniche dei pazienti. Dati espressi come mediana (I-III interquartile) e come frequenza (percentuale). ACE:enzima che converte angiotensina; ARB:bloccante del recettore per l'angiotensina; CI: indice cardiaco; IDC: cardiomiopatia dilatativa idiopatica; IHD: cardiopatia ischemica; LVEDD: diametro tele diastolico del ventricolo sinistro; LVEDV: volume tele diastolico del ventricolo sinistro; LVEF: frazione d'iezione del ventricolo sinistro; PAPs: pressione arteriosa polmonare sistolica; PCWP: pressione polmonare capillare; RAP: pressione atriale destra; t-Bil: bilirubina totale; P value* pre-LVAD vs. HT; P value[#] pre-LVAD vs. post-LVAD; [§]P < 0.05 vs. HT.

5.2 Valutazione della condizione infiammatoria

La valutazione della condizione infiammatoria del muscolo cardiaco è stata effettuata misurando l'espressione a livello di mRNA tramite real-time PCR, di classici mediatori infiammatori (IL-8, IL-6 e TNF- α) e di nuovi indici coinvolti nel processo di flogosi (IL-33, ST2, GDF-15 e ADN) nei tre gruppi di pazienti analizzati. I risultati ottenuti sono riportati nelle Fig. 37; 38; 41.

Condizione infiammatoria basale nei pazienti con SC grave

I risultati relativi ai biomarcatori del processo infiammatorio ottenuti nei pazienti con SC grave al momento dell'impianto del LVAD (gruppo pre-LVAD) sono stati confrontati con quelli ottenuti nel gruppo di pazienti con SC stabile sottoposti direttamente al trapianto (gruppo HT). Come si può osservare in Fig. 37, i livelli di espressione di IL-8 risultano significativamente più bassi nel gruppo pre-LVAD rispetto al gruppo HT (Fig. 37A); diversamente accade per l'IL-6 che ha mostrato livelli significativamente più alti nel gruppo pre-LVAD rispetto ad HT (Fig. 37C). Non si hanno differenze significative nei due gruppi per il TNF- α (Fig. 37B).

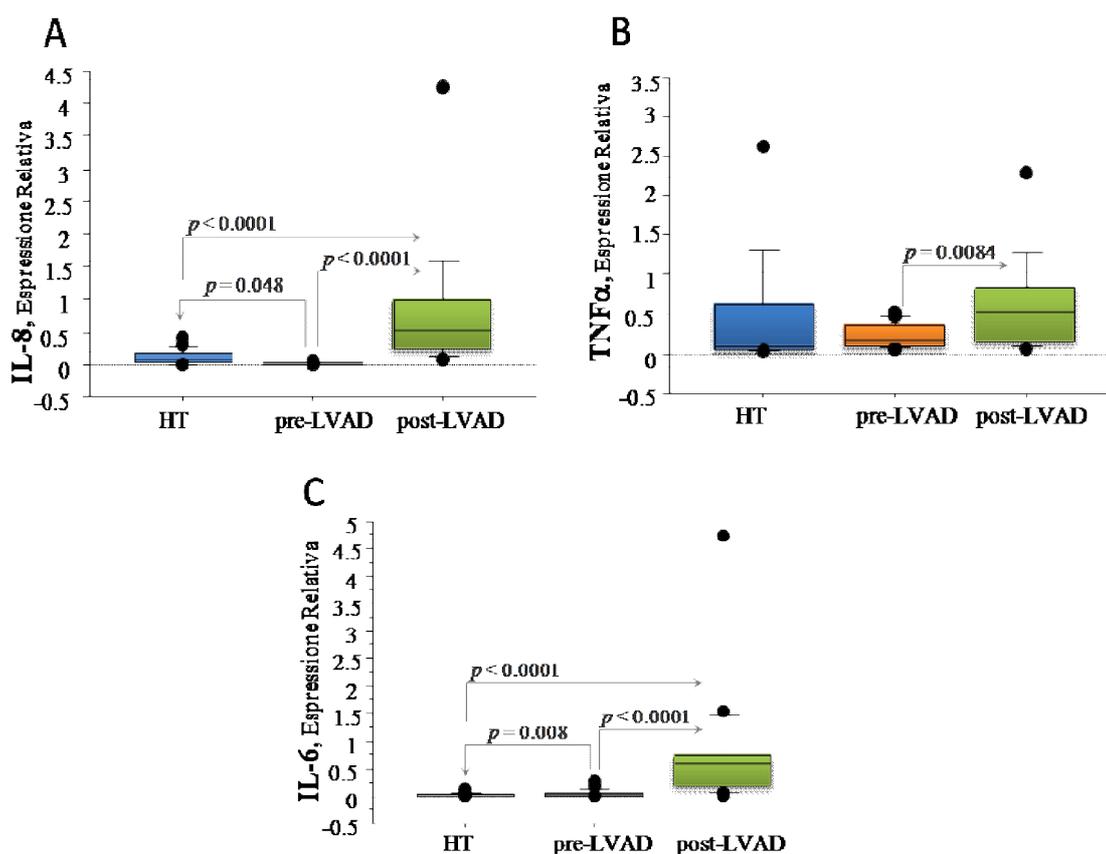


Figura 37: Livelli di espressione di A)IL-8, B)TNF- α , C)IL-6, nei campioni di tessuto cardiaco dei pazienti rispettivamente dei gruppi HT(pazienti=7, campioni=35), pre-LVAD (campioni=22) e post-LVAD (pazienti=6, campioni=30). Ogni box è costituito da 5 linee orizzontali che mostrano il: 10°, 25°, 50°, 75°, 90° percentile della variabile. Tutti i valori sopra il 90° percentile e sotto il 10° percentile sono riportati separatamente.

Per quanto riguarda l'espressione cardiaca di IL-33 e ST2, questa nuova via infiammatoria, si è ottenuto che sia per il ligando che per il suo recettore l'espressione dei rispettivi trascritti risulta significativamente inferiore nel gruppo pre-LVAD rispetto al gruppo di controllo (HT) (Fig. 38A,B).

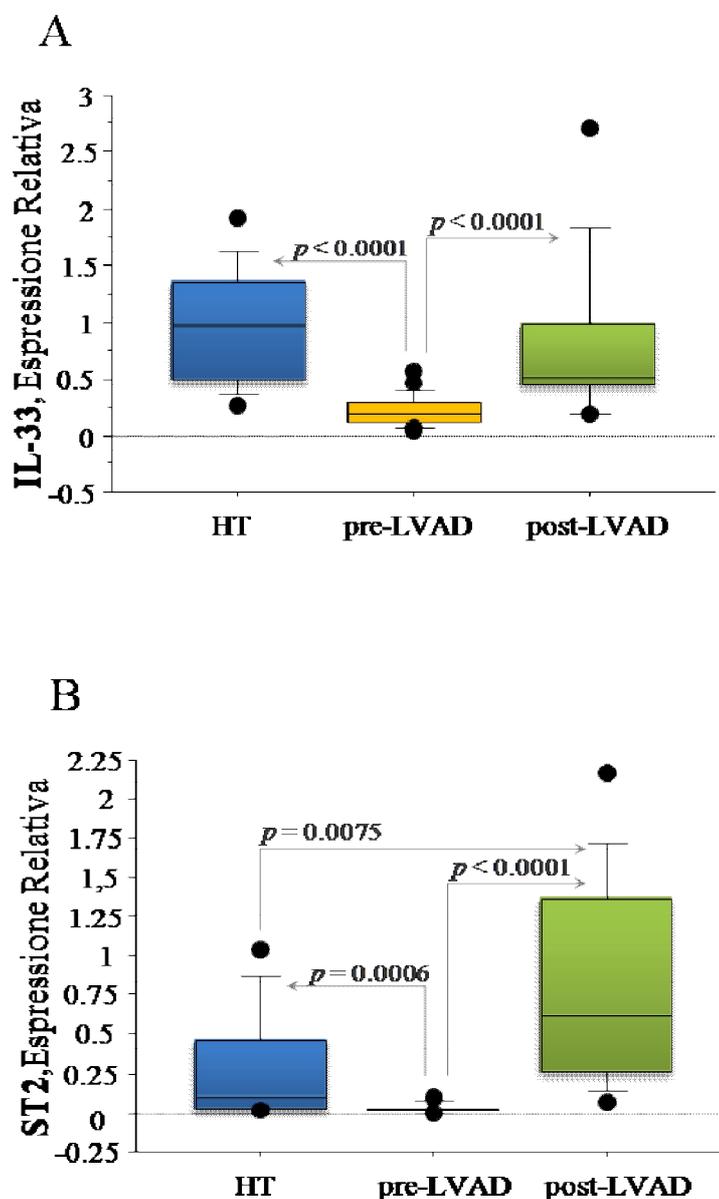


Figura 38: Livelli di espressione di A) IL-33 e B) ST2 rispettivamente nei gruppi HT (pazienti=7, campioni=35), pre-LVAD (campioni=22) e post-LVAD (pazienti=6, campioni=30). Ogni box è costituito da 5 linee orizzontali che mostrano il: 10°, 25°, 50°, 75°, 90° percentile della variabile. Tutti i valori sopra il 90° percentile e sotto il 10° percentile sono riportati separatamente.

È interessante osservare che nel gruppo pre-LVAD, i livelli d'espressione cardiaca di ST2 sono associati all'eziologia dello SC, essendo significativamente più alta l'espressione del gene per questo recettore nei pazienti IDC che nei pazienti IHD, come riportato in Fig. 39.

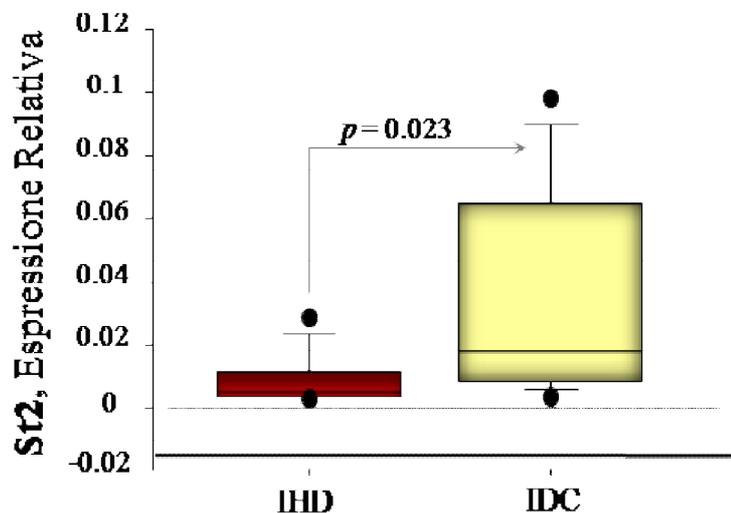


Figura 39: Livelli di espressione cardiaca di ST2 in soggetti con SC con origine eziologica diversa, pazienti IHD(cardiopatia ischemica)=10; pazienti IDC(cardiomiopatia dilatativa)=12.

Inoltre, per ST2 è stata trovata una correlazione positiva fra il punteggio tSOFA perioperatorio, e i livelli di espressione di mRNA nel cuore (Fig. 40).

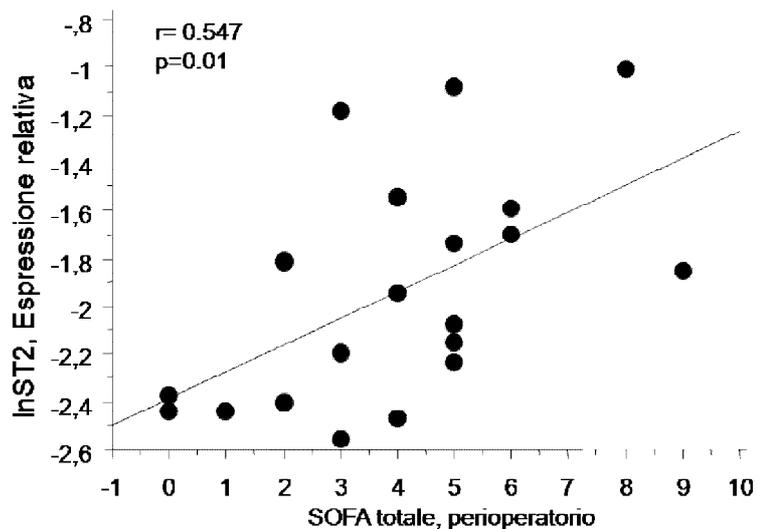


Figura 40: Correlazione tra i livelli di espressione di ST2 e il punteggio tSOFA perioperatorio

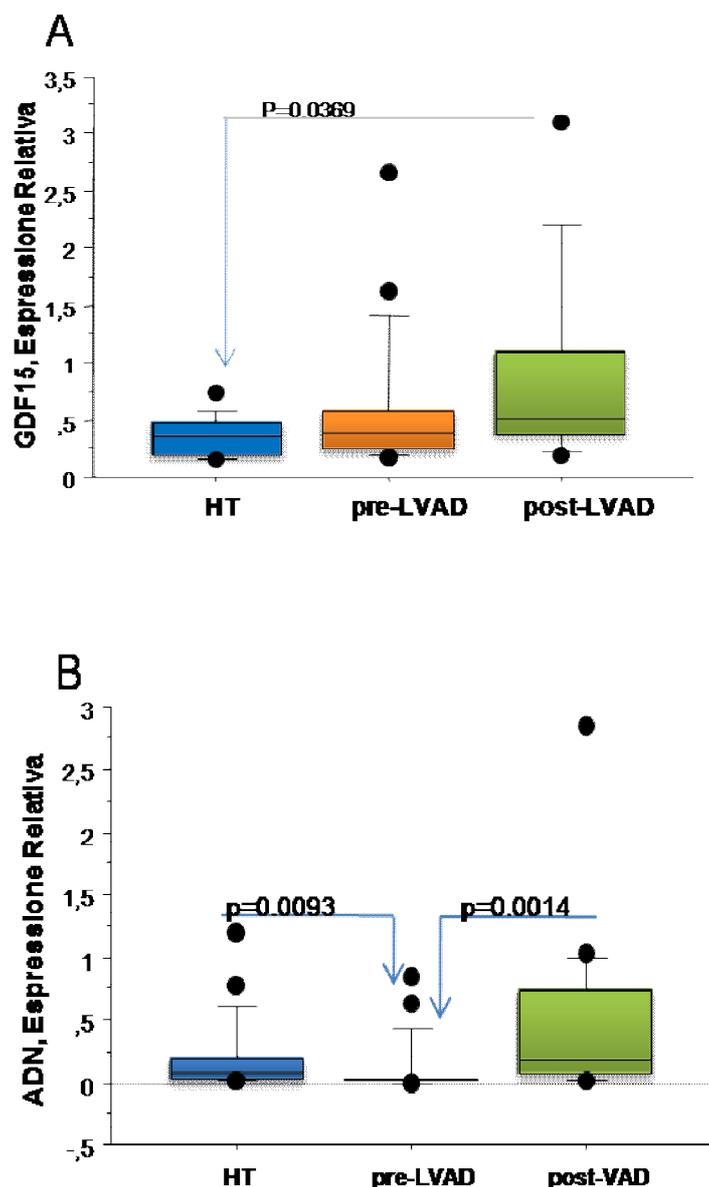


Figura 41: Variazione dei livelli di espressione di A) GDF-15, B) ADN, nei gruppi controllo HT (pazienti=7, campioni=35), pre-LVAD (campioni=22) e post-LVAD (pazienti=6, campioni=30). Ogni box è costituito da 5 linee orizzontali che mostrano il: 10°, 25°, 50°, 75°, 90° percentile della variabile. Tutti i valori sopra il 90° percentile e sotto il 10° percentile sono riportati separatamente.

Non si osservano differenze significative nei livelli di espressione del GDF-15 tra il gruppo controllo HT e il gruppo pre-LVAD (Fig. 41A). Diversamente per l'ADN i livelli di espressione risultano significativamente più alti (Fig. 41B) nel gruppo HT rispetto al pre-LVAD.

Cambiamenti nel profilo infiammatorio dopo l'impianto del dispositivo LVAD

L'effetto del supporto LVAD sulla condizione infiammatoria è stato valutato comparando i livelli di espressione genica tissutale del gruppo pre-LVAD con quelli di un gruppo di pazienti al momento dello svezzamento dal dispositivo di supporto meccanico (gruppo post-LVAD).

Sia i mediatori infiammatori tradizionali (Fig. 37A,B,C) che IL33/ST2 (Fig. 38A,B) risultano significativamente più elevati nel gruppo post-LVAD rispetto al gruppo pre-LVAD.

Anche i livelli di ADN risultano significativamente più alti nel gruppo post-LVAD rispetto al pre-LVAD (Fig. 41B).

I livelli cardiaci di TNF- α e IL-33 nel gruppo post-LVAD risultano comparabili con i loro rispettivi livelli nel gruppo HT (Fig. 37B; 38A), mentre i livelli cardiaci di IL-8, IL-6, ST2 e GDF-15 sono significativamente più alti nel gruppo post-LVAD rispetto al gruppo HT (Fig. 37A,C; 38B; 41A).

Inoltre, i livelli di espressione di ST2 correlano con i livelli di espressione di: IL-33 (Pearson $r=0.520$, $p=0.001$), IL-6 (Pearson $r=0.688$, $p<0,0001$) e IL-8 (Pearson $r=0.799$, $p<0.0001$).

5.3 Misura dei livelli circolanti di IL-33 e sST2

La determinazione IL-33 e sST2 è stata effettuata su campioni plasmatici ottenuti dai pazienti del gruppo pre-LVAD a tempo zero (prima dell'impianto) e dopo un mese dall'impianto del dispositivo di assistenza ventricolare. Per sST2 non si osservano modificazioni significative (Fig. 42A) fra le concentrazioni ematiche ai due tempi di campionamento, mentre i livelli di IL-33 risultano significativamente diminuiti ad un mese dall'impianto del dispositivo rispetto ai valori al pre-impianto (Fig. 42B).

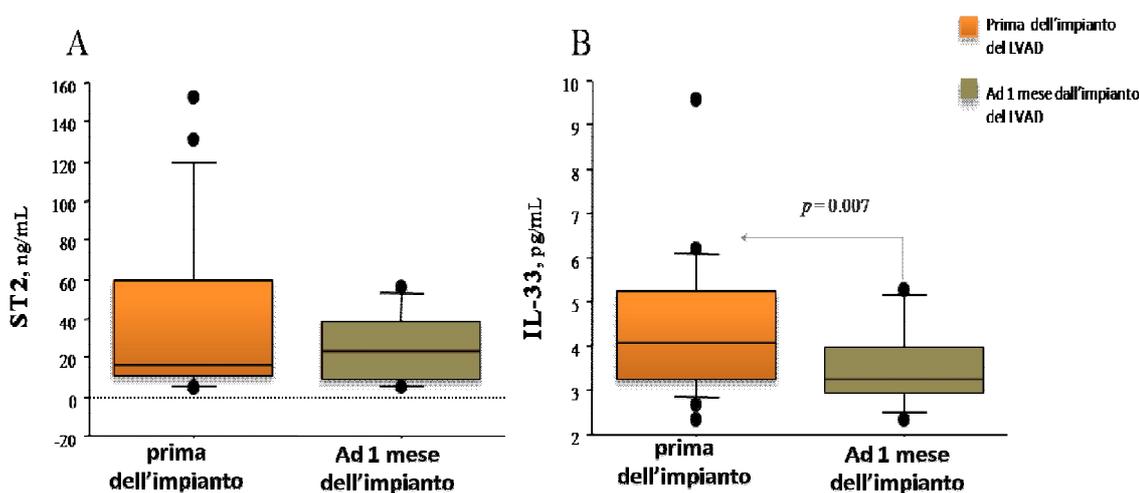


Figura 42: Concentrazioni plasmatiche di A) sST2, B) IL-33 nei pazienti pre-LVAD basalmente ed ad un mese dall'impianto.

Per questa nuova via di segnalazione IL-33/ST2, è stata trovata una correlazione significativa tra livelli plasmatici dei due target e i loro rispettivi livelli di espressione a livello cardiaco.

I livelli di espressione genica di ST2 nel tessuto cardiaco correlano positivamente con i livelli circolanti di sST2 (Pearson $r=0.771$, $p=0.003$) mentre i livelli di IL-33 cardiaca correlano negativamente con i livelli circolanti di IL-33 (Pearson $r= -0,613$, $p=0.034$). Inoltre, per ST2 è stata trovata una correlazione positiva fra i suoi livelli plasmatici, sST2, e il tSOFA score (Pearson $r = 0.449$, $p= 0.107$).

5.4 Relazione con gli indici di prognosi

Il decorso clinico dei pazienti con SC allo stadio avanzato (gruppo pre-LVAD) è stato valutato considerando gli indici di prognosi.

L'espressione cardiaca di ST2 valutata a livello di pre-impianto, ha mostrato una correlazione positiva con la lunghezza della degenza della terapia intensiva, l'ospedalizzazione e il punteggio tSOFA a 1 settimana (Fig. 43A,B,C).

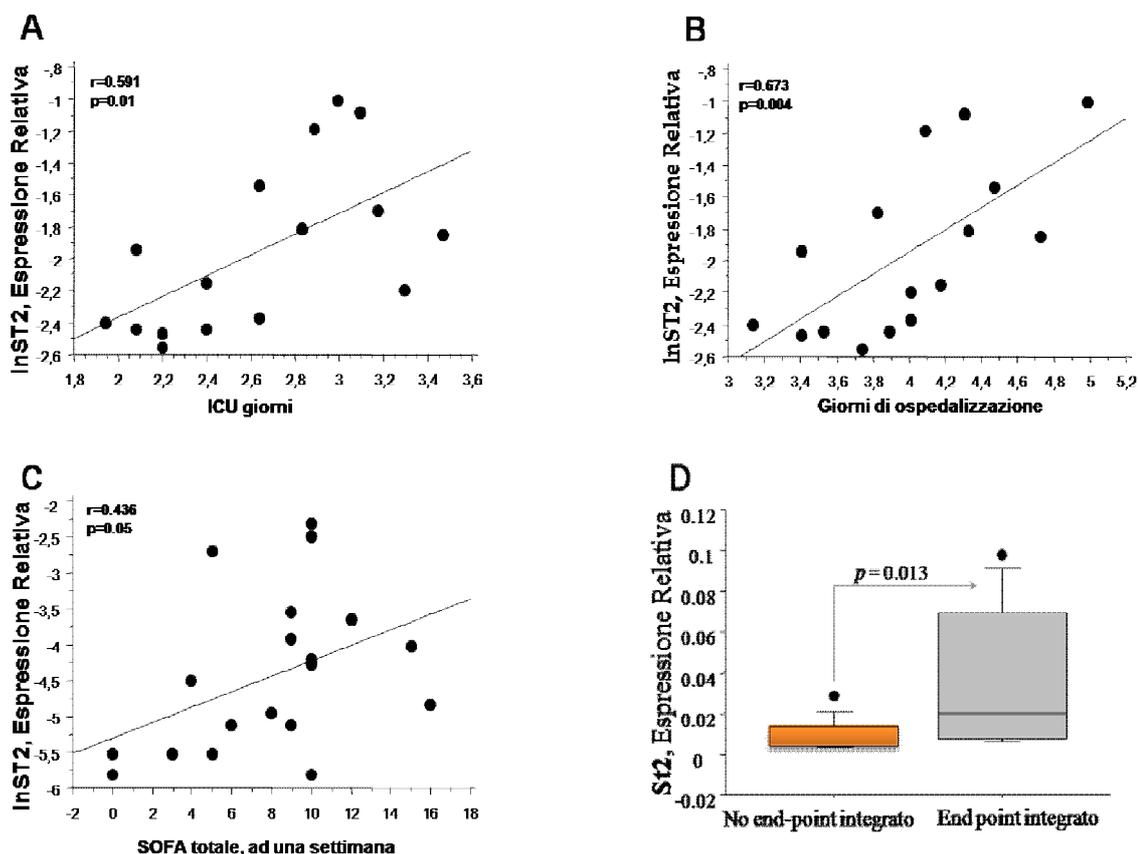


Figura 43: Correlazione tra i livelli di espressione di ST2, nei pazienti del gruppo pre-LVAD, e: A) permanenza in ICU, B) ospedalizzazione, C) punteggio tSOFA ad una settimana dall'impianto. D) livelli di espressione di ST2 tra pazienti con indice *end-point integrato* e non integrato di prognosi.

Inoltre, l'espressione cardiaca di ST2 era più alta nei pazienti con *end-point* integrato di prognosi (Fig. 43D).

I livelli di espressione GDF-15 valutati al pre-impianto correlano positivamente con la durata della degenza in terapia intensiva (Fig. 44).

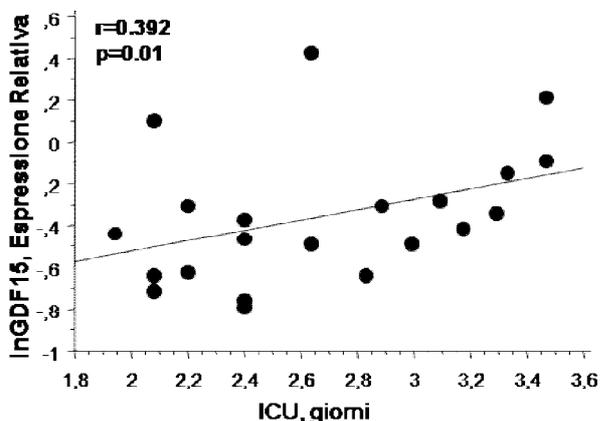


Figura 44: Correlazione tra i livelli di espressione di GDF-15 e il tempo di degenza in terapia intensiva.

Analizzando i dati ottenuti dal circolante e gli indici di prognosi, si nota che i livelli plasmatici di sST2 tendono ad essere correlati con la lunghezza dell'ospedalizzazione (Pearson $r=0.453$, $p=0.104$) mentre i livelli di IL-33 non mostravano correlazioni significative con i parametri clinici.

Infine, nessuno dei biomarcatori studiati ha mostrato differenze, sia a livello di espressione che di concentrazione plasmatica, tra i pazienti deceduti entro il primo mese dopo l'impianto di LVAD rispetto a coloro che sono sopravvissuti per più di 1 mese.

La principale limitazione di questo studio è rappresentata dal basso numero di pazienti. Tuttavia, per il gruppo controllo HT e per il gruppo post-LVAD è stato possibile raccogliere, dallo stesso paziente, tessuto miocardico al momento del trapianto d'organo sia dal ventricolo sinistro che dal ventricolo destro permettendo una migliore interpretazione dei risultati. Inoltre, questa ridotta dimensione del campione ha reso difficile la valutazione dell'impatto delle diverse variabili cliniche (ad esempio terapie, fattori di rischio ecc.) sulla modulazione della via IL-33/ST2.

CONCLUSIONI

Studi recenti suggeriscono che l'infiammazione riveste un ruolo importante nella progressione dello SC (Schultz Jel J., et al 2002; Heymans S., et al 2009; Jiang B., et al 2010; Ambardekar AV., et al 2011; Kleinbongard P., et al 2011); tuttavia l'introduzione di terapie anti-infiammatorie nella sperimentazione clinica, come l'uso di farmaci che inibiscono l'azione del TNF- α , non ha dato i risultati sperati nei pazienti scompensati (Heymans S., et al 2009). Questo ha reso necessaria una migliore comprensione del ruolo dell'infiammazione nello SC e di tutti i processi in cui essa è coinvolta in modo da individuare nuovi possibili bersagli terapeutici.

L'argomento di questo lavoro di tesi si colloca in questo contesto, in quanto si propone di determinare nello SC nuovi indici legati al processo infiammatorio e di confrontarli con le classiche citochine infiammatorie, sia a livello d'organo che nella circolazione periferica, con lo scopo sia di valutarne la possibile modulazione che di correlarli con la prognosi a breve termine dopo impianto di LVAD.

I risultati di questo lavoro di tesi hanno mostrato che i pazienti con SC in stadio avanzato presentano alterazioni dei livelli dei mediatori dell'infiammazione, sia a livello plasmatico che nel tessuto cardiaco, e che queste alterazioni possono essere corrette grazie al supporto meccanico dato dal LVAD.

I mediatori infiammatori classici come IL-8 e TNF- α risultano più bassi nei pazienti con SC meno stabili (gruppo pre-LVAD) rispetto al gruppo dei pazienti sottoposti direttamente a trapianto di cuore con la sola terapia medica (gruppo HT); tali livelli sono più alti dopo il supporto con LVAD, raggiungendo un livello paragonabile a quello dei pazienti del gruppo HT.

Per quanto riguarda i nuovi indici di flogosi, un dato di particolare rilevanza è quello relativo alla modulazione del sistema IL-33/ST2 osservata in questo studio. Una espressione significativamente più bassa di ST2 e IL-33 è stata trovata nei campioni di tessuto cardiaco ottenuti dai pazienti candidati al supporto con LVAD (gruppo pre-LVAD) rispetto ai pazienti più stabili che rispondono meglio alla terapia farmacologica, gruppo HT, sottoposti direttamente al trapianto cardiaco. Questa ridotta espressione di entrambi gli indici potrebbe essere coinvolta nel peggioramento della funzione cardiaca dei pazienti del gruppo pre-LVAD (Schultz Jel J., et al 2002; Heymans S., et al 2009; Jiang B., et al 2010; Kleinbongard P., et al 2011; Ambardekar AV., et al 2011). Questa osservazione è in linea con precedenti studi che indicano come il meccanismo di segnale mediato da IL-33/ST2 abbia effetti protettivi nella regolazione della risposta miocardica al sovraccarico di pressione (Weinberg EO., et al 2002; Sanada S. 2007; Seki K 2009). Infatti è stato dimostrato che l'espressione a livello di mRNA di ST2 è fortemente indotta nei cardiomiociti in seguito a sforzo meccanico o a trattamento con IL-1 β mentre i suoi livelli sierici risultano transitoriamente aumentati nei topi sottoposti a legatura dell'arteria coronarica (Weinberg EO., et al 2002). Per quanto riguarda l'IL-33, questa è una

proteina biomeccanicamente indotta nel cuore, sintetizzata dai fibroblasti cardiaci e in grado di antagonizzare l'ipertrofia dei cardiomiociti indotta da angiotensina II e fenilefrina (Sanada S., et al 2007). IL-33 può anche ridurre l'apoptosi dei cardiomiociti, diminuire infarto e fibrosi, e migliorare la funzione ventricolare *in vivo* attraverso la soppressione dell'attività della caspasi-3 e incrementando l'espressione della famiglia di proteine di inibizione dell'apoptosi (IAP) (Seki K., et al 2009).

Il coinvolgimento della via IL-33/ST2 nella protezione cardiaca è confermato dall'aumento dei loro livelli con lo scarico meccanico dopo il supporto con LVAD, che è in grado di rendere i livelli di IL-33/ST2 comparabili a quelli osservati per il gruppo di pazienti controllo, suggerendo che la variazione dell'espressione di IL-33/ST2 potrebbe essere correlata al processo di rimodellamento inverso indotto da scarico meccanico. Ciò è supportato anche dall'associazione positiva tra ST2 con i classici marcatori molecolari dell'infiammazione e con il punteggio tSOFA, un indicatore clinico di condizione infiammatoria sistemica (Chen YS., et al 2001).

I trascritti per ADN e GDF-15, per la loro azione cardioprotettiva, confermano quanto suggerito dagli indici più specifici di flogosi; infatti l'espressione cardiaca di entrambi risulta significativamente più alta dopo supporto meccanico rispetto agli altri due gruppi studiati mentre i livelli più bassi di espressione si ritrovano nel gruppo pre-LVAD.

Dato il ruolo rilevante di IL-33/ST2, le concentrazioni plasmatiche di entrambi gli indici sono state misurate nella circolazione periferica di pazienti sottoposti a supporto meccanico, sia basalmente che dopo un mese dall'impianto. I livelli circolanti di sST2 ad un mese dall'impianto del LVAD non risultano modificati rispetto a quelli osservati basalmente. E' interessante notare come questi ultimi correlino positivamente con i livelli di espressione di ST2 nel tessuto cardiaco, confermando il contributo del cuore nella produzione di sST2, precedentemente dimostrata *in vitro* da un diverso tipo di cellule cardiache (Miller AM., et al 2008; Demyanets S., et al 2013). Su questo esistono, tuttavia, dati discordanti e questo rimane un punto importante che deve essere ulteriormente chiarito (Bartunek J., et al 2008).

In modelli animali, è stato osservato che sST2 funziona come recettore *decoy* solubile bloccando gli effetti anti-ipertrofici di IL-33 (Seki K., et al 2009) e questa azione, insieme alla produzione cardiaca di sST2, potrebbe spiegare il valore prognostico negativo di questo biomarcatore nei soggetti con SC. Diversi studi hanno dimostrato il valore prognostico della misurazione di sST2 sierico in varie malattie cardiovascolari, mostrando che i livelli basali di sST2 erano un predittore significativo di mortalità cardiovascolare e di SC (Boisot S., et al 2008; Wang TJ., et al 2012). In questo lavoro di tesi è stato dimostrato che l'espressione di ST2 cardiaco è correlata positivamente con indici di prognosi e che sST2 tendeva ad essere

positivamente correlata con la durata del ricovero. Questi risultati potrebbero suggerire che la forma solubile di ST2, prodotto dal muscolo cardiaco, potrebbe anche agire nella circolazione periferica come recettore *decoy* per IL-33 riducendo così il suo effetto protettivo (Seki K., et al 2009). Di conseguenza, questa azione di ST2 potrebbe spiegare il suo ruolo prognostico negativo nello SC, come confermato dai nostri risultati.

Per l'IL-33, non ci sono dati disponibili in letteratura relativi alle sue concentrazioni sieriche o plasmatiche nella malattia cardiovascolare. Mentre è noto che i livelli di IL-33 sono elevati in alcune malattie reumatiche (Miller AM., et al 2011) dal nostro studio emerge che i suoi livelli, nelle malattie cardiovascolari, sono bassi probabilmente proprio a causa degli elevati livelli di sST2. Inoltre, al contrario di sST2, prima dell'impianto del LVAD l'IL-33 cardiaca è correlata negativamente con la sua concentrazione plasmatica ed è risultata significativamente diminuita dopo 1 mese rispetto ai suoi valori prima del supporto LVAD, suggerendo un meccanismo di regolazione diverso per IL-33. IL-33 è una citochina con una doppia funzione, agendo sia come una citochina tradizionale attraverso l'attivazione del complesso recettoriale ST2L e sia come fattore nucleare intracellulare con proprietà di regolazione trascrizionale. È in grado di attivare le cellule sia del sistema dell'immunità innata che adattativa, agendo come un allarme per allertare il sistema immunitario in caso di necrosi, ed a seconda della malattia può sia promuovere la risoluzione di infiammazione o sostenere la condizione patologica (Haraldsen G., et al 2009).

Un ulteriore importante risultato emerso da questo studio è che i livelli di espressione cardiaca di ST2 sono significativamente più bassi nei pazienti con ischemia (IHD) rispetto a pazienti con eziologia idiopatica dilatativa (IDC). Dati precedenti indicano chiaramente che gli effetti benefici dell'LVAD sono in parte relativi all'eziologia dello SC. Infatti, lo SC allo stadio avanzato correlato ad infarto del miocardio ha dimostrato dare risposte meno soddisfacenti alla terapia LVAD rispetto allo SC di origine non ischemica (Butler CR., et al 2012). La risposta dell'IDC alla terapia LVAD è di particolare interesse perché il miocardio, pur essendo disfunzionante, risulta essere ancora vitale. Pertanto, in questo studio ST2 è risultata un'importante molecola coinvolta nella regolazione dello SC, che ci permette di distinguere le differenti eziologie dello SC. Quindi, gli elevati livelli di ST2 cardiaca nei pazienti IDC hanno evidenziato e confermato la sua partecipazione al meccanismo di recupero del cuore.

In conclusione, i risultati di questo studio indicano che i mediatori nuovi e tradizionali dell'infiammazione sono coinvolti sia nel declino della funzione cardiaca in pazienti con SC in stadio avanzato sia nel processo di rimodellamento inverso indotto dal supporto LVAD. In accordo con questa osservazione, recentemente è stato ipotizzato che l'attivazione e la soppressione dell'infiammazione, opportunamente modulate, possano rappresentare fasi

critiche per ottenere un efficace rigenerazione cardiaca, suggerendo un ruolo-paradosso dell'infiammazione nella rigenerazione cardiaca (Jiang B., et al 2010). Inoltre, questi dati sottolineano la complessità dei processi biochimici associati alle molecole infiammatorie e contribuiscono a spiegare la conseguente difficoltà di sviluppare terapie volte a modularle.

La modulazione del sistema IL-33/ST2 potrebbe costituire un nuovo promettente target terapeutico per il trattamento o la prevenzione di varie patologie in cui l'infiammazione è un processo critico, tuttavia, a causa del coinvolgimento del sistema IL-33/ST2 in una varietà di processi, sono necessari ulteriori studi per definire il suo potenziale clinico.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino, et al. «Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction.» *Circulation*, 2008: 117, 2670–2683.

Abston ED, Barin JG, Cihakova D, Bucek A, Coronado MJ, Brandt JE, Bedja D, Kim JB, Georgakopoulos D, Gabrielson KL, Mitzner W, Fairweather D. «IL-33 independently induces eosinophilic pericarditis and cardiac dilation: ST2 improves cardiac function.» *Circ Heart Fail*, 2012: 5:366-375.

Ago T, Sadoshima J. «GDF15, a Cardioprotective TGF- β Superfamily Protein.» *Circ Res*, 2006: 98:294-297.

Ai M, Otokozawa S, Asztalos B F, White C C, Cupples LA, Nakajima K, Lamon-Fava S, Wilson PW, Matsuzawa Y, Schaefer E. «Adiponectin: an independent risk factor for coronary heart disease in men in the Framingham offspring Study.» *Atherosclerosis*, 2011: 217, 543-8.

Akgul A, Skrabal CA, Thompson LO, Loebe M, Lafuente JA, Noon GP, Youker KA. «Role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support.» *J Heart Lung Transplant.*, 2004: 23:709–715.

Akhter SA, D'Souza KM, Malhotra R, Staron ML, et al. «Reversal of Impaired Myocardial β -Adrenergic Receptor Signaling By Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Support.» *J Heart Lung Transplant*, 2010: 29(6): 603–609. doi:10.1016.

Allen BG, Phuong LL, Farhat H, Chevalier D. «Both endothelin-A and endothelin-B receptors are present on adult rat cardiac ventricular myocytes.» *Can J Physiol Pharmacol*, 2003: 81:95-104.

Ambardekar AV, Buttrick PM. «Reverse remodeling with left ventricular assist devices: a review of clinical, cellular, and molecular effects.» *Circ Heart Fail*, 2011: 4(2):224-33.

Ambardekar AV, Walker JS, Walker LA, Cleveland JC Jr., Lowes BD, Buttrick PM. «Incomplete recovery of myocyte contractile function despite improvement of myocardial architecture with left ventricular assist device support.» *Circ Heart Fail*, 2011: 4:425–432.

Anand IS, Kempf T, Rector TS, Tapken H, Allhoff T, Jantzen F, Kuskowski M, Cohn JN, Drexler H, Wollert KC. «Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial.» *Circulation*, 2010: 122:1387-95.

Ando K, Hirata Y, Shichiri M, Emori T, Marumo F. «Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. .» *FEBS Lett*, 1989: 245:164(Letter).

Anversa P, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B. «Myocyte growth and cardiac repair.» *J Mol Cell Cardiol*, 2002: 34:91-105.

Aram V, Chobanian GL, Bakris HR., Black WC., Cushman LA. Green JL. Izzo Jr, Jones DW, Barry J. Materson SO, Wright Jr, Roccella EJ. *Hypertension. JNC 7 Complete Report*. American Heart Association, 2003.

Arora RB, Somari P. «Ectopic arrhythmia provoking action of aldosterone.» *Life Sci*, 1962: 5:215.

Aspromonte N, Di Tano G, Latini R, Masson S, Valle R, Emdin M. «Ruolo dei biomarcatori per la stratificazione prognostica e la personalizzazione del follow-up nel paziente con scompenso cardiaco.» *G Ital Cardiol*, 2010: 11(5 Suppl 2):175-235.

Baba HA, Stypmann J, Grabellus F, Kirchhof P, Sokoll A, Schäfers M, Takeda A, Wilhelm MJ, Scheld HH, Takeda N, Breithardt G, Levkau B. «Dynamic regulation of MEK/Erks and Akt/GSK-3beta in human end-stage heart failure after left ventricular mechanical support: myocardial mechanotransduction-sensitivity as a possible molecular mechanism. .» *Cardiovasc Res.*, 2003: 59:390–399.

Baichwal VR, Baeuerle PA. «Activate NF-kappa B or die?» *Curr Biol*, 1997: 7:R94–R96.

Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. «Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage conditioned medium.» *J Clin Invest.*, 1993: 91:2314–2319.

Baltogiannis GG, Tsalikakis DG, Mitsi AC, Hatzistergos KE, Elaiopoulos D, Fotiadis DI, et al. «Endothelin receptor blockade decreases ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats.» *Cardiovasc Res*, 2005: 67:647-654.

Banerjee I., Fuseler JW., Intwala AR., Baudino TA., «IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart.» *American Journal of Physiology . Heart and Circulatory Physiology*, 2009: 296, H1694–H1704.

Barger MP., Kelly DP., «PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism.» *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:238-45., 2000: 10:238-45.

Barrett AJ, Kirschke H. «Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L.» *Methods Enzymol*, 1981: 80:535-561.

Bartling B, Milting H, Schumann H, Darmer D, Arusoglu L, Koerner MM, El-Banayasy A, Koerfer R, Holtz J, Zerkowski HR. «Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure.» *Circulation.*, 1999: 100:II216–II223.

Bedi MS, Alvarez RJ, Kubota T, Sheppard R, Kormos RL, et al. «Myocardial Fas and Cytokine Expression in End-Stage Heart Failure: Impact of LVAD Support.» In *CTS, Volume 1* : 245-248. 2008.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. «Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction.» *N Engl J Med*, 2001: 344:1750-7.

Birks EJ, Felkin LE, Banner NR, Khaghani A, Barton PJ, Yacoub MH. «Increased toll-like receptor 4 in the myocardium of patients requiring left ventricular assist devices.» *J Heart Lung Transplant.*, 2004: 23:228–235.

Birks EJ, Hall JL, Barton PJ, Grindle S, Latif N, Hardy JP, Rider JE, Banner NR, Khaghani A, Miller LW, Yacoub MH. «Gene profiling changes in cytoskeletal proteins during clinical recovery after left ventricular-assist device support.» *Circulation.* , 2005: 112:157–164.

Birks EJ, Latif N, Owen V, Bowles C, Felkin LE, Mullen AJ, Khaghani A, Barton PJ, Polak JM, Pepper JR, Banner NR, Yacoub MH. «Quantitative myocardial cytokine expression and activation of the apoptotic pathway in patients who require left ventricular assist devices.» *Circulation.*, 2001: 104(12 Suppl): I233–I240.

Birks EJ, Tansley PD, Hardy J, George RS, Bowles CT, Burke M, Banner NR, Khaghani A, Yacoub MH. Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. «Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure.» *N Engl J Med*, 2006: 355:1873-1884.

Birks EJ. «Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure.» *Circ Res*, 2013: 113:777-791.

Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ. «Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice.» *J Mol Cell Cardiol.*, 2000: 32:817-830.

Boagev RC., Delgado RM III., Taegtmeier HT., Frazier OH., «Circulatory Assist devices in Heart Failure.» Cap. Capitolo 56 in *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*.

Bonaca MP, Morrow DA, Braunwald E, Cannon CP, Jiang S, Breher S, Sabatine MS, Kempf T, Wallentin L, Wollert KC. «Growth differentiation factor-15 and risk of recurrent events in patients stabilized after acute coronary syndrome: observations from PROVE IT-TIMI 22.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2011: 31:203–210.

Bonetti A., Marchini M., Ortolani F. «Immunolocalization of interleukin-1 receptor antagonist in healthy and infarcted myocardium.» *Histology and Histopathology* , 2008: 3, 1093–1102.

Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN. «MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1997: 94:11514 –11519.

Borgeson DD, Grantham JA, Williamson EE, Luchner A, et al. «Chronic oral endothelin type A receptor antagonism in experimental heart failure.» *Hypertension* , 1998: 31: 766–70.

Boyle AJ., Ascheim DD., Russo MJ., et al. «Clinical outcomes for continuous-flow left ventricular assist device patients stratified by pre-operative INTERMACS classification.» *J Heart Lung Transplant* , 2011: 30(4):402-7.

- Bozkurt B, Kribbs S, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. «Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats.» *Circulation.*, 1998: 97:1382–1391.
- Bozkurt B, Kribbs S, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. «Pathophysiologically relevant concentration of tumor necrosis factor α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats.» *Circulation*, 1998: 97:1382-1391.
- Braunwald E, Kasper D.L, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, MC Graw-Hill. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Sedicesima edizione. Vol. 2. Ambrosina, 2005.
- Braunwald E. «Biomarkers in heart failure.» *N Engl J Med*, 2008: 358:2148-59.
- Braunwald E. «Heart failure.» *J Am Coll Cardiol Heart Failure*, 2013: 1:1-20.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al. «Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts.» *N Engl J Med*, 1982: 311:819-23.
- Bristow MR. «Beta-Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure.» *Circulation*, 2000: 101:558-569.
- Brown JR, O'Connor GT. «Coronary heart disease and prevention in the United States.» *N Engl J Med*. (N Engl J Med), 2010: 362(23):2150–2153.
- Brown N, et al. «Aldosterone modulates plasminogen activator-1 and glomerulosclerosis in vivo.» *Kidney Int*, 2000: 58:1219.
- Bruckner BA, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Youker KA, Radovancevic B, Connelly JH, Koerner MM, Entman ME, Frazier OH, Noon GP, Torre-Amione G. «Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support.» *J Heart Lung Transplant.*, 2001: 20:457–464.
- Bruggink AH, van Oosterhout MF, de Jonge N, Ivangh B, van Kuik J, Voorbij RH, Cleutjens JP, Gmelig-Meyling FH, de Weger RA. «Reverse remodeling of the myocardial extracellular matrix after prolonged left ventricular assist device support follows a biphasic pattern.» *J Heart Lung Transplant.*, 2006: 25:1091–1098.
- Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, Medeiros A. «Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors.» *An Acad Bras Cienc*, 2006;: 78:485-503.
- Brutsaert DL, De Keulenaer GW. «Diastolic heart failure: a myth.» *Curr Opin Cardiology*, 2006: 21: 240-8.
- Burkhoff D, Klotz S, Mancini DM.,. «LVAD-induced reverse remodeling: basic and clinical implications for myocardial recovery.» *J Card Fail*, 2006: 12:227–39.

Bustin SA., Benes V., Garson JA., Hellemans J., Kubista M., Muller R., Nolan T., Pfaffi MW., Shipley GL., Vandesompele J., Wittwer CT. «The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.» *Clin Chem*, 2009; 55(4):611–622.

Caruso R, Caselli C, Boroni C, Campolo J, Milazzo F, Cabiati M, Russo C, Parolini M, Giannessi D, Frigerio M, Parodi O. «Relationship Between Myocardial Redox State and Matrix Metalloproteinase Activity in Patients on Left Ventricular Assist Device Support.» *Circulation Journal*, 2011; 75: 2387 – 2396.

Caruso R, Verde A, Campolo J, Milazzo F, Russo C, Boroni C, Parolini M, Trunfio S, Paino R, Martinelli L, Frigerio M, Parodi O. «Severity of oxidative stress and inflammatory activation in end-stage heart failure patients are unaltered after 1 month of left ventricular mechanical assistance.» *Cytokine*, 2012; 59:138-144.

Caruso R., Caselli C., Boroni C., Campolo J., Milazzo F., Cabiati M., Russo C., Parolini M., Giannessi D., Frigerio M., Parodi O., «Relationship Between Myocardial Redox State and Matrix Metalloproteinase Activity in Patients on Left Ventricular Assist Device Support.» *Circulation Journal*, 2011; 75: 2387 – 2396.

Caselli C, D'Amico A, Caruso R, Cabiati M, Prescimone T, Cozzi L, Cannata A, Parodi O, Del Ry S, Giannessi D. «Impact of normalization strategy on cardiac expression of pro-inflammatory cytokines: evaluation of reference genes in different human myocardial regions after Left Ventricular Assist Device support.» *Cytokine*, 2013; 63(2):113-22.

Caselli C., D'Amico A., Caruso R., Cabiati M., Prescimone T., Cozzi L., Cannata A., Parodi O., Del Ry S., Giannessi D. «Impact of normalization strategy on cardiac expression of pro-inflammatory cytokines: evaluation of reference genes in different human myocardial regions after Left Ventricular Assist Device support.» *Cytokine*, 2013; 63(2):113-22.

Cayrol C, Girard JP. «The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106:9021-6.

Charron P, Komajda M. «Genes and their polymorphisms in mono-and multifactorial cardiomyopathies: towards pharmacogenomics in heart failure.» 3:367-378. *Pharmacogenomics*, 2002.

Chaudhary KW, Rossman EI, Piacentino V 3rd., Kenessey A, Weber C, Gaughan JP, Ojamaa K, Klein I, Bers DM, Houser SR, Margulies KB. «Altered myocardial Ca²⁺ cycling after left ventricular assist device support in the failing human heart.» *J Am Coll Cardiol.*, 2004; 44:837–845.

Chen YS, Ko WJ, Lin FY, Huang SC, Chou TF, Chou NK, Hsu RB, Wang SS, Chu SH. «Preliminary result of an algorithm to select proper ventricular assist devices for high-risk patients with extracorporeal membrane oxygenation support. J Heart Lung Transplant.» *J Heart Lung Transplant*, 2001; 20(8):850-7.

Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Wang DL, Chen JJ. «Reactive oxygen species modulate endothelin-I-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes.» *Cardiovasc Res*, 1999; 41:654-662.

Cheng XW, Murohara T, Kuzuya M, Izawa H, Sasaki T, Obata K, Nagata K, Nishizawa T, Kobayashi M, Yamada T, Kim W, Sato K, Shi GP, Okumura K, Yokota M. «Superoxide-dependent cathepsin activation is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for angiotensin II type 1 receptor blocker treatment.» *Am J Pathol*, 2008: 173:358-369.

Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, Nagasaka T, Saka M, Kimata T, Noda A, Nagata K, Jin H, Shi GP, Iguchi A, Murohara T, Yokota M. «Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure.» *Hypertension*, 2006: 48:979-987.

Cheng XW, Shi GP, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K, Murohara T. «Role for Cysteine Protease Cathepsins in Heart Disease : Focus on Biology and Mechanisms With Clinical Implication.» *Circulation*, 2012: 125:1551-1562.

Cingolani H, Ennis I, Aiello E, Pèrez N. «Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain.» *Pflugers Arch*, 2011: 462:29-38.

Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. «Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006: 290:H17-H29.

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. «Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure.» *N Engl J Med*, 1984: 311:819-23.

Cohn JN. «Structural basis for heart failure: ventricular remodeling and its pharmacological inhibition.» *Circulation*, 1995: 91:2504-2507.

Colantuoni A. «regolazione della pressione arteriosa.» In *Fisiologia medica*, di Conti F., 673-675. edi-ermes, 2008.

Corrado D, Migliore F, Basso C, Thiene G. «Exercise and the risk of sudden death.» *Herz (Herz)*, 2006: 31:533-538.

Coura JR, Borges Pereira J. «Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review.» *Acta Trop* 115: 5–13., 2010: 115: 5–13.

Coura JR, Viñas PA. «Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 465: S6–S7.» *Nature*, 2010: 465: S6–S7.

Cowburn PJ, Cleland JG, McArthur JD, MacLean MR, McMurray JJ, Dargie HJ. «Short-term haemodynamic effects of BQ-123 a selective endothelin ET(A)-receptor antagonist, in chronic heart failure.» *Lancet*, 1998: 352: 201–2.

Creemers EE, Pinto YM. «Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart.» *Cardiovasc Res*, 2011: 89:265-72.

Cullingford TE, Markou T, Fuller SJ, Giraldo A, Pikkarainen S, Zoumpoulidou G, et al., «Temporal regulation of expression of immediate early and second phase transcripts by endothelin-1 in cardiomyocytes.» *Genome Biol*, 2008: 9: R32.

Daliento L, Turrini A, Nava G, Rizzoli A, Angelini G, Buja G, Scognamiglio R, Thiene G. «Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in young versus adult patients: similarities and differences.» *J Am Coll Cardiol.* (J Am Coll Cardiol), 1995: 25(3):655-664.

D'ANGELO, PERES. Vol. II, in *Fisiologia molecole, cellule e sistemi*, 437-439. edi-ermes, 2007.

Dash R, Kadambi V, Schmidt AG, Tepe NM, Biniakiewicz D, Gerst MJ, Canning AM, Abraham WT, Hoit BD, Liggett SB, Lorenz JN, Dorn GW, Kranias EG. «Interactions between phospholamban and beta-adrenergic drive may lead to cardiomyopathy and early mortality.» *Circulation*, 2001: 103:889-896.

Davenport AP, Maguire JJ. «Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ET-A receptors in humans?» *Trends Pharmacol Sci*, 1994: 15:9-11.

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. «Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content.» *Br Heart J* (Br Heart J), 1993: 69:377-381.

Davies MJ, Woolf N, P Rowles, Richardson PD. «Lipid and cellular constituents of unstable human aortic plaques. Basic Res Cardiol.» *Basic Res Cardiol.*, 1994: 89 Suppl 1:33-9.

Dawber TR, Meadors GF, Moore FEJ. «Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. » *Am J Public Health*, 1951: 41:279-286.

De Boer RA, Pinto YM, Van Veldhuisen DJ. «The imbalance between oxygen demand and supply as a potential mechanism in the pathophysiology of heart failure: the role of microvascular growth and abnormalities.» *Microcirculation*, 2003: 10:113-26.

De Giusti VC, Correr MV, Villa-Abrille MC, Beltrano C, Yeves AM, De Cingolani GEC, et al. «The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species.» *Life Sci*, 2008: 83:264-271.

De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Wanner TD, Vane JR. «Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988: 85: 9797-800.

Delafontaine P., Akao M., «Angiotensin II as candidate of cardiac cachexia.» *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, 2006: 9:220-224.

Delaigle AM, Senou M, Guiot Y, Many MC, Brichard SM. «Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: in vivo and in vitro studies.» *Diabetologia* 2006;49:1311-23., 2006: 49:1311-23.

Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. «T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice.» *J Clin Invest.*, 2010: 120, 4342-52.

Derynck R, Zhang YE. «Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.» *Nature*, 2003: 425:577-584.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, Dirk J. van Veldhuisen, Atar D, Hoes A, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. «Linee guida ESC per la diagnosi e il trattamento dello scompenso cardiaco acuto e cronico 2008.» *G Ital Cardiol*, 2009: 141.198.

Dipla K, Mattiello JA, Jeevanandam V, Houser SR, Margulies KB. «Myocyte recovery after mechanical support in humans with end-stage heart failure.» *Circulation*, 1998: 97:2316–2322.

Drakos SG, Kfoury AG, Hammond EH, Reid BB, Revelo MP, Rasmusson BY, Whitehead KJ, Salama ME, Selzman CH, Stehlik J, Clayson SE, Bristow MR, Renlund DG, Li DY. «Impact of mechanical unloading on microvasculature and associated central remodeling features of the failing human heart.» *J Am Coll Cardiol*, 2010: 56:382–391.

Drawnel FM, Archer CR, Roderic HL. «The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth.» *British Journal of Pharmacology*, 2013: 168:296–317.

Dubin G. «Proteinaceous cysteine protease inhibitors. Cell Mol Life Sci.» *Cell Mol Life Sci.*, 2005: 62:653-669.

Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, et al. «Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. » *Circulation*, 2002 : 105:685-690.

Eggers KM, Kempf T, Lagerqvist B, Lindahl B, Olofsson S, et al. «Growth differentiation factor-15 for long-term risk prediction in patients stabilized after an episode of non ST-segment-elevation acute coronary syndrome.» *Circ Cardiovasc Genet*, 2010: 3:88-96.

Eichorn EJ, Bristow M. «Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart: a new era in the treatment of heart failure.» *Circulation*, 1997: 94:2285-2296.

Eisemberg MJ. «Magnesium deficiency and sudden death. Am Heart.» *Am heart J*, 1992: 124:544.

Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD. «Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure.» *Circulation* , 1996: 93:1677-1676.

Emara M, Cheung PY. « Inhibition of sulfur compounds and antioxidants on MMP-2 and -9 at the activity level found during neonatal hypoxia–reoxygenation.» *Eur J Pharm*, 2006: 544: 168 – 173.

Emdin M, Clerico A, Clemenza F, Galvani M, Latini R, Masson S, Mulè P, Panteghini M, Valle R, Zaninotto M, Ganau A, Mariotti R, Volpe M, Aspromonte N, Cacciatore G, Cappelletti P, L'Abbate A, Miglio F, Ottani F, Pagani F, Passino C, et al. «Raccomandazioni sull'impiego clinico dei peptidi natriuretici cardiaci.» *Ital Heart J Suppl*, 2005: 308-325.

- Emdin M, Vergaro G, Giannoni A, Passino C. «Attivazione adrenergica nello scompenso cardiaco: Blocco o riequilibrio?» 2010: 11 (3):229-232.
- Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A. «Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration.» *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009: 20, 517–527.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. «Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999: 96:7059-7064.
- Fagundes CT, Amaral FA, Souza AL, et al. «ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion.» *J Leukoc Biol* 2007;81:492-9., 2007: 81:492-9.
- Fujioka Y, Kawabata KI, Saito Y, Kobayashi T, Nakamura T, Kodama Y, et al. «Role of adiponectin receptors in endothelin-induced cellular hypertrophy in cultured cardiomyocytes and their expression in infarcted heart.» *Am. J. Physiol.*, 2006: 290, H2409-16.
- Foody JM, Farrell MH, Krumholz HM. «Beta-blocker therapy in heart failure: scientific review.» *JAMA*, 2002: 287:883–9.
- Fracarollo D, Hu K, Galuppo P, Gaudron P, Ertl G. «Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarct .» *Circulation* , 1997: 96:3963–73.
- Francis G, Benedict C, Johnstone D, Kirlin P, Nicklas J, Liang C, et al. «Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure.A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD).» *Circulation*, 1990: 82:1724-1729.
- Francs GS, McDonald KM, Cohn JN. «Neurohumoral activation in preclinical heart failure:remodeling and the potential for intervention.» *Circulation*, 1993: 87(5suppl):IV90-IV96.
- Freund C, et al. «Requirement of nuclear factor kappaB in angiotensin II- and isoproterenolinduced cardiac hypertrophy in vivo.» *Circulation.*, 2005: 111:2319–2325.
- Gajarsa JJ, Kloner RA. «Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities.» *Heart Fail Rev.*, 2011: 16:13-21.
- Gensini GF, Rostagno C. *Scompenso cardiaco*. SEE Firenze, 1998.
- Genth-Zotz S., Bolger AP., Kalra PR., «Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation to disease severity and survival.» *nt J Cardiol*, 2004: 96(3):397-401.
- George J, Patal S, Wexler D, Sharabi Y, Peleg E, Kamari Y, Grossman E, Sheps D, Keren G, Roth A. «Circulating adiponectin concentrations in patients with congestive heart failure.» *Heart*, 2006: 92:1420-4.
- Giannessi D, Colotti C, Maltinti M., «Circulating heat shock proteins and inflammatory markers in patients with idiopathic left ventricular dysfunction: their relationships with myocardial and microvascular impairment.» *Cell Stress Chaperones*, 2007: 12(3): 265–274.

Giannessi D, Del Ry S, Andreassi MG, Nardini V, Pelosi G, Colombo MG, Biagini A. «High density of endothelin binding sites in the hearts of infants and children.» *Life Sci*, 1999: 64: 697–705.

Giannessi D, Del Ry S, Vitale L. «The role of endothelins and their receptors in heart failure.» *Pharmacological Research*, 2001: 2:111-126.

Giannessi D, Maltinti M, Del Ry S. «Adiponectin circulating levels: A new emerging biomarker of cardiovascular risk.» *Pharmacological Research*, 2007: 56:459–467.

Giannessi D. «Multimarker approach for heart failure management: Perspectives and Limitations.» *Elsevier: Pharmacological research*, 2011: 64:11-24.

Ginecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. «Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy.» *Circ Res*, 2008: 103:1204-1219.

Giordano C., D'Amati G.,. «Cardiomyopathies due to defective energy metabolism:morphological and functional features.» *Pathologica*, 2005: 97:361-368.

Giusti G. *Trattato di medicina legale e scienze affini*. Vol. II, 182-183. Cedam, 2009.

GOULD KL. *La stenosi coronarica*. Vol. volume I. 1991.

Grassi C, Seravalle G, Cattaneo BM, et al. «Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure.» *Circulation*, 1995: 93:940-52.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. «NAD(P)H oxidase:role in cardiovascular biology and disease.» *Circ Res*, 2000: 17:86(5):494-501.

Grigioni M., Daniele C., Romanelli C., Morbiducci U., Del Gaudio C., Barbaro V.,. «Caratterizzazione dei dispositivi di assistenza meccanica ventricolare.» Rapporto ISTISAN 04/3 - ISSN 1123-3117, 2004.

Gulick TS, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. «Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989: 86:6753–6757.

Ha T, et al. «Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload.» *Cardiovasc. Res*, 2005: 68:224–234.

Haider N, Arbustini E, Gupta S, Liu H, Narula N, Hajjar R, Moorjani N, Westaby S, Semigran MJ, Dec GW, Chandrashekar Y, Narula J. « Concurrent upregulation of endogenous proapoptotic and antiapoptotic factors in failing human hearts.» *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*, 2009: 6:250–261.

Haider N, Baliga RR, Chandrashekar Y, Narula J.,. «Adrenergic excess, hNET1 down-regulation, and compromised mIBG uptake in heart failure patients in the presence of plenty. .» *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging.*, 2010: 3:71–75.

Hall JL, Birks EJ, Grindle S, et al.. «Molecular signature of recovery following combination left ventricular assist device (LVAD) support and pharmacologic therapy.» *Eur Heart J.*, 2007: 28:613–627.

Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. «Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes.» *J Biol Chem*, 2006: 281: 29776–29787.

Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA et al. «Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy.I.» *Cell Death Differ* 2007; 14: 146–157., 2007: 14: 146–157.

Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Korner PI. «Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity.» *Circulation*, 1986: 73:615-621.

Haurani MJ, Pagano PJ. «Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease?» *Cardiovasc Res*, 2007: 75(4):679-89.

Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, et al. «Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation.» *J Biol Chem* , 2007: 282:26369-80.

Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rezaei Rose NR. «Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords.» *Heart Fail Rev*, 2010: 15:543-62.

Heerdt PM, Klotz S, Burkhoff D. «Cardiomyopathic etiology and SERCA2a reverse remodeling during mechanical support of the failing human heart. .» *Anesth Analg.* , 2006: 102:32–37. .

Heineke J., Auger-Messier M., Xu J., Oka T., Sargent MA., York A., et al.. «Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart.» *J Clin Invest*, 2007: 117:3198–210.

Heymans S, Hirsch E, Anker SD, Aukrust P, Balligand JL, Cohen-Tervaert JW, Drexler H, Filippatos G, Felix SB, Gullestad L, Hilfiker-Kleiner D, Janssens S, Latini R, Neubauer G, Paulus WJ, Pieske B, Ponikowski P, Schroen B, Schultheiss HP, et al. «Inflammation as therapeutic target in HF? A scientific statement from the translational research committee of the HF Association of the European Society of Cardiology.» *Eur J Heart Fail*, 2009: 11:119-129.

Hilgers KF, Veelken R, Rupperecht G, Reeh PW, Luft FC, Mann JF. «Angiotensin II facilitates sympathetic transmission in rat hind limb circulation.» *Hypertension*, 1993: 21:322-8.

Hirata Y, Fukuda Y, Yoshimi H, Emori T, Shichiri M, Marumo F. «Specific receptor for endothelin in cultured rat cardiocytes.» *Biochem Biophys Res Commun* , 1989: 160: 1438–44.

Hirota S, et al. «Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy.» *Circulation*, 2002: 105:509–515.

Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, et al. «Multiple polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor

metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease.» *American heart journal*, 2007: 154(4):751–8.

Hosoda K, Nakao K, Arai H, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H. «Cloning and expression of human endothelin-1 receptor c-DNA.» *FEBS Lett* , 1991: 287: 23–6.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. «AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.» *J. Biol. Chem.*, 1996: 271, 10697-703.

Hughes S. *Infliximab harmful in CHF - final results of ATTACH. HeartWire News*. 12 Giugno 2002. <http://www.theheart.org> (consultato il giorno Agosto 15, 2002).

Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, et al. «Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x.» *Circ Res* , 1999: 84:21-33.

Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, et al. «Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases.» *J Biol Chem* , 1993: 268:23735–23738.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, et al. «The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989: 86:2863-2867.

Investigatores, The SOLVD. «Effect of Enalapril on Survival in Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions and Congestive Heart Failure.» *N Engl J Med* , 1991: 325:293-302.

Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al. «Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study (EPH).» *Circulation*, 2009: 119(18):2471–2479.

Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F. «Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes.» *Circ Res*, 1991: 69: 209-15.

Jaffer FA, Kim DE, Quinti L, Tung CH, Aikawa E, Pande AN, Kohler RH, Shi GP, Libby P, Weissleder R. «Optical visualization of cathepsin K activity in atherosclerosis with a novel, protease-activatable fluorescence sensor.» *Circulation*, 2007: 115:2292–2298.

Jennings RB, Steenbergen C Jr, Reimer KA. «Myocardial ischemia and reperfusion.» *Monographs in Pathology*, 1995: 37, 47–80.

Jiang B, Ronglih L. «The Paradoxical Role of Inflammation in Cardiac Repair and Regeneration.» *J. of Cardiovasc. Trans. Res*, 2010: 3:410–416.

Jugdutt BI. «Preventing Adverse Remodeling and Rupture During Healing After Myocardial Infarction in Mice and Humans.» *Circulation*, 2010: 122:103-105.

Kaczorowski DJ, Nakao A, Vallabhaneni R, Mollen KP, Sugimoto R, Kohmoto J, et al. «Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart.» *Transplantation*, 2009: 87, 1455–1463.

Kakkar R, Lee RT. «intramyocardial fibroblast myocyte communication.» *Circ Res*, 2010: 106:47-57.

Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ijeda D, Itoh N, Ishimaru S, Ohtuka Y, Nishimura M. «Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes.» *Biochem Biophys Res Commun*, 2006: 339:624–632.

Kamimura D., Ishihara K., Hirano T.,. «IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model.» *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* , 2003: 149, 1–38.

Kelly D, Khan SQ, Thompson M, Cockerill G, Ng LL, Samani N, et al. «Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodelling and prognosis after acute myocardial infarction.» *Eur Heart J* , 2008: 29(17):2116–24.

Kempf T, Eden M, Strelau J, Neguib M, Willenbockel C, Tongers J, Heineke T, et al. «The transforming growth factor-beta superfamily member growth differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury.» *Circ Res*, 2006: 98:351-360.

Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O. «Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. .» *Lancet* , 1995: 346: 732–6.

Kirklin JK, Naftel DC, Kormos RL, et al. «Third INTERMACS Annual Report: the evolution of destination therapy in the United States.» *J Heart Lung Transplant* , 2011: 30(2):115-23.

Kirklin JK, Naftel DC., Stevenson LW et al.,. «INTERMACS database for durable devices for circulatory support: first annual report.» *J Heart Lung Transplant*, 2008: 27:1065-1072.

Kistorp C, Faber J, Galatius S, Gustafsson F, Frystyk J, Flyvbjerg A, Hildebrandt P. «Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure.» *Circulation*, 2005: 112 , 1756-62.

Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. «TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure.» *Heart Fail Rev*, 2011: 16:49-69.

Klotz S, Danser AH, Foronjy RF, Oz MC, Wang J, Mancini D, D'Armiento J, Burkhoff D. « The impact of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on the extracellular collagen matrix during left ventricular assist device support in patients with end-stage heart failure.» *J Am Coll Cardiol*, 2007: 49:1166–1174.

Klotz S, Foronjy RF, Dickstein ML, Gu A, Garrelds IM, Danser AH, Oz MC, D'Armiento J, Burkhoff D. «Mechanical unloading during left ventricular assist device support increases left ventricular collagen cross-linking and myocardial stiffness.» *Circulation.*, 2005: 112:364–374.

Klotz S, Jan Danser AH, Burkhoff D. «Impact of left ventricular assist device (LVAD) support on the cardiac reverse remodeling process.» *Progr Bioph Mol Biol*, 2008: 97:479–96.

Koch S, Volkmar CM, Kolb-Bachofen V, Korth HG, Kirsch M, Horn AHC, et al. «A new redox-dependent mechanism of MMP-1 activity control comprising reduced low-molecular-weight thiols and oxidizing radicals.» *J Mol Med*, 2009: 87: 261 – 272.

Koller KJ, Goeddel DV. «Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors.» *Circulation*, 1992: 86:1081-88.

Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E et al. « Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts.» *Circ Res*, 2003: 92: 715–724.

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJE, Sabbadini RA. «Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death.» *J Clin Invest*, 1996: 98:2854-65.

Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, et al. « Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo.» *J Clin Invest*, 1995: 1:89-103.

Lefkowitz RJ. «Seven transmembrane receptors: something old, something new.» *Acta Physiol (Oxf)*, 2007: 190:9-19.

Lehman JJ., Barger PM., Kovacs A., Saffitz JE., Medeiros DM., Kelly DP.,. «Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis.» *J Clin Invest*, 2000: 106:847-56.

Lehman JJ., Kelly DP.,. «Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth.» *Heart Fail Rev*, 2002: 7:175-85.

Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. «Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart.» *Heart Fail Rev*, 2009: 14(4):213-224.

Leibovich SJ, Ross R. «A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro.» *The American Journal of Pathology*, 1976: 84, 501–514.

Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. «Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl2-to Bax protein ratio in the cell.» *J Clin Invest.*, 1998: 101:1326-1342.

Leri A, Quaimi F, Kajstura J, Anversa P. «Myocyte death and myocyte regeneration in the failing human heart.» *Ital Heart J*, 2001: 2(Suppl3):12S-14S.

Levin ER. «Endothelins.» *N Engl J Med*, 1995: 333: 356–62.

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. «Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure.» *N Engl J Med*, 1990: 323: 236-241.

Levine B, Klionsky DJ. «Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.» *Dev Cell*, 2004; 6: 463–477.

Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. «Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure.» *N Engl J Med*, 2002; 347:1397-402.

Li YY, Feng Y, McTiernan CF, Pei W, Moravec CS, Wang P, Rosenblum W, Kormos RL, Feldman AM. «Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices.» *Circulation*, 2001; 104:1147–1152.

Li Z, Song Y, Xing R, Yu H, Zhang Y, et al. «Heat Shock Protein 70 Acts as a Potential Biomarker for Early Diagnosis of Heart Failure.» *PLoS ONE*, 2013; 8(7):e67964. doi:10.1371/journal.pone.0067964.

Liao Y, Takashima S, Maeda N, Ouchi N, Komamura K, Shimomura I, Hori M, Matsuzawa Y, Funahashi T, Kitakaze M. «Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism.» *Cardiovasc. Res.*, 2005; 67, 705-13.

Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, et al. «Matrix-Dependent Mechanism of Neutrophil-Mediated Release and Activation of Matrix Metalloproteinase 9 in Myocardial Ischemia/Reperfusion.» *Circulation*, 2001; 103:2181–7.

Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, Goshorn DK, Bouges S, Mingoia JT, et al. «Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 290(1):H232–9.

Linzbach AJ. «Heart failure from the point of view of quantitative anatomy.» *Am J Cardiol*, 1960; 5:370-82.

Liu J, Sukhova GK, Yang JT, Sun J, Ma L, Ren A, Xu WH, Fu H, Dolganov GM, Hu C, Libby P, Shi GP. «Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells.» *Atherosclerosis*, 2006; 184:302–311.

Liu P. «The Path to cardiomyopathy: cycles of injury, repair and maladaptation.» *Curr Opin Cardiol*, 1996; 99-1942.

Lok SI, Winkens B, Goldschmeding R, van Geffen AJP, Noss FMA, van Kuik J, van der Weide P, Klopping C, Kirkels JH, Lahpor JR, Doevendans PA, de Jonge N, de Weger RA. «Circulating growth differentiation factor-15 correlates with myocardial fibrosis in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy decreases rapidly after left ventricular assist device support.» *Eur J Heart Fail*, 2012; 14:1249–1256.

Lotrionte M, Galiuto L, Biondi-Zoccai GGL, Abbate A. «Ruolo fisiopatologico dell'ipertrofia miocardica, della disfunzione microcircolatoria e dell'apoptosi miocardiocitaria nella stenosi valvolare aortica.» *G Ital Cardiol*, 2006; 7(7):437-444.

Love MP, Haynes WG, Gray GA, Webb DJ, McMurray JJ. «Vasodilator effects of endothelin-converting enzyme inhibition and endothelin ET-A receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors.» *Circulation*, 1996: 94:2131-7.

Lower BD., et al. «Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with with beta-blocking agents.» *N Engl J Med*, 2002: 346:1357-1365.

Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohimeyer TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR. «Changes in gene expression in the intact human heart:downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium.» *J Clin Invest.*, 1997: 100:2315-2324.

Lund LH, Matthews J, and Aaronson K. «Patient selection for left ventricular assist devices. .» *Eur J of Heart Fail*, 2010: 12, 434–443.

Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, et al. «Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases.» *Immunity*, 2009: 31:84-98.

Madigan JD, Barbone A, Choudhri AF, Morales DL, Cai B, Oz MC, Burkhoff D. «Time course of reverse remodeling of the left ventricle during support with a left ventricular assist device. .» *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 2001: 121:902–908.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. «cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose most abundant gene transcript 1).» *Biochem Biophys Res Commun.*, 1996: 221:286–9.

Maisel AS. « Beneficial effects of metoprolol treatment in congestive heart failure: reversal of sympathetic-induced alterations of immunologic function.» *Circulation*, 1994: 90:1774-80.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. «Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.» *Nat Rev Mol Cell Biol* , 2007: 8: 741–752.

Mann DL, Bristow MR. «Mechanisms and Models in Heart Failure. The Biomechanical Model and Beyond.» *Circulation*, 2005: 111:2837-2849.

Mann DL, Bristow MR. «Mechanisms and Models in Heart Failure. The Biomechanical Model and Beyond.» *Circulation*, 2005: 111:2837-2849.

Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G IV. «Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte.» *circulation*, 1992: 85:790-804.

Mann DL. «Inflammatory Mediators and the Failing Heart: Past, Present, and the Foreseeable Future.» *Circ Res* , 2002: 91:988-998.

MARCHEGANI F, PROVINCIALI M, LATTANZIO F. «Cardiovascular risk biomarkers.» (G.Gerontol) 2009: 57:240-244.

Maron BJ, Anan TJ, Roberts WC. «Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the left ventricular wall of patients with hypertrophic cardiomyopathy.» *Circulation (Circulation)*, 1981: 63:882-894.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. «Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee.» *Circulation* (Circulation), 2006: 113(14):1807-1816.

Marron BJ, Roberts WC. «Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy.» *Circulation* (Circulation), 1979: 59:689-706.

Martino A., Cabiati M., Campan M., Prescimone T., Minocci D., Caselli C., Rossi AM., Giannessi D., Del Ry S. «Selection of reference genes for normalization of real-time PCR data in minipig heart failure model and evaluation of TNF- α mRNA expression.» *J Biotechnol* , 2011: 153(3-4):92-99.

Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, Ohashi T, Daida H, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. «Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism.» *J. Biol. Chem*, 2011: 286, 32790-800.

Massie BM. «15 years of heart-failure trials: what have we learned?» *Lancet*, 1998: 352(suppl 1):29-33.

Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T et al. «Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy.» *Circ Res*, 2007: 100: 914-922.

Matzinger P. «Tolerance, danger, and the extended family.» *Annual Review of Immunology*, 1994: 12, 991-1045.

McAlister FA, Lawson FM, Teo KK, Armstrong PW. «A systematic review of randomized trials of disease management programs in heart failure.» *Am J Med*, 2001: 110:378-84.

McLennan SV, Fisher E, Martell SY, Death AK, Williams PF, Lyons JG, Yue DK. «Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy.» *Kidney International. Supplement*, 2000: 77, 81-87.

McMullen JR, Jennings GL. «Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure.» *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007: 34:255-262.

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P. «ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. .» *Eur Heart J*, 2012: 33(14):1787-847.

McMurray JJV. «Systolic Heart Failure.» *N Engl J Med*, 2010: 362:228-38.

- Meng X, Brown JM, Ao L, Banerjee A, Harken AH.,. «Norepinephrine induced cardiac heat shock protein 70 and delayed cardioprotection in the rat through α_1 adrenoceptors.» *Cardiovasc Res*, 1996; 32: 374–383.
- Mill JG, Stefanon I, Dos Santos L, Baldo MP. «Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure.» *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2011; 44:890-898.
- MINISTERO DELLA SALUTE. «Malattie.» 2013, 47-53.
- Missov E, Calzolari C, Pau B. «Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure.» *Circulation*, 1997; 96:2953–2958.
- Miyagi H, Yasne H, Okamura K, et al. «Effect of magnesium on angina attack induced by hyperventilation in patients with variant angina.» *Circulation*, 1989; 79:597.
- Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li Y, Okada H, Maruyama R et al. «Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor.» *Am J Pathol*, 2006; 168: 386–397.
- Moalic JM, Bauters C, Himbert D, Bercovici J, Mouas C, et al. «Phenylephrine vasopressin and angiotensin as determinants of heat shock protein gene expression in adult heart and aorta.» *J Hypertens*, 1989; 7: 195–201.
- Modesti PA, Vanni S, Paniccia R, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Sani G, Neri Serneri GG. «Characterization of endothelin-1 receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes.» *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999; 34: 333–9.
- Moe GW, Albernaz A, Naik GO, Kirchengast M, Stewart DJ. «Beneficial effects of long-term selective endothelin type A receptorblockade in canine experimental heart failure. *Cardiovasc.*» *Cardiovasc Res*, 1998; 39: 571–9.
- Mohamed MM, Sloane BF. «Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:764 –775.» *Nat Rev Cancer*, 2006; 6:764 –775.
- Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C, et al. «Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium.» *Circ Res*, 1993; 72:526-38.
- MolissoC, Molisso V. «La cardiomiopatia dilatativa in ambito valutativo medico-legale.» *G Ital Cardiol* (AIM Publishing Srl), 2007; 8 (5): 299-305.
- Molkentin JD., Lu JR., Antos CL., Markham B., Richardson J., Robbins J., et al.,. «A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy.» *Cell*, 1998; 93:215-28.
- Motte S, van Beneden R, Mottet J, Rondelet B, Mathieu M, Havaux X, et al. «Early activation of cardiac and renal endothelin systems in experimental heart failure.» *Am J Physiol*, 2003; 285:H2482-H2491.

Mudd JO., Kass DA., « Tackling heart failure in the twenty-first century. .» *Nature*, 2008: 118:2252–8.

Mulder P, et al. «Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling.» *Circulation*, 1997: 96:1976-82.

Nag AC, Zak R. «Dissociation of adult mammalian heart into single cell suspension: an ultrastructural study.» *J Anat.*, 1979: 129:541–559.

Nagase H, Woessner JFJr. «Matrix metalloproteinases.» *The Journal of biological chemistry*, 1999: 274(31), 21491-21494.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M et al. «the role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress.» *Nat Med*, 2007: 13: 619–624.

Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA. «myosin heavy chain gene expression in human heart failure.» *J Clin Invest*, 1997: 100:2362–2370.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. «Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.» *N Engl J Med.* , 1996: 335:1182–1189.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw B-A. «Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.» *N Engl J Med*, 1996: 335:1182-1189.

Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker W, Hoffman D, Kuo SM, Banks TJ, MacViottie TJ, Parrillo JE. «Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock.» *J Exp Med.*, 1989: 169:823–832.

Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME. «Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta 1 and collagen gene expression.» *Kidney Int*, 1998: 53(2):367-81.

Neri S, et al. «Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy.» *Circ Res* , 2000: 86: 377–85.

Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, Hasin Y, Lopez-Sendon J, Mebazaa A, Metra M, Rhodes A, Swedberg K, Priori SG, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie MR, Dean V, Deckers J, Burgos EF. «Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology.» *Eur Heart J*, 2005: 26: 384-416.

Nishida K., Kyoi S., Yamaguchi O., Sadoshima J., Otsu K. «The role of autophagy in the heart.» *Cell Death and Differentiation* , 2009: 16, 31–38; doi:10.1038/cdd.2008.163.

Nishikimi T, Maeda N, Matsouka H. «The role of natriuretic peptides in cardioprotection.» *Cardiovascular Res.*, 2006: 69:318-328.

Nishimura Y, Kawabata T, Kato K. «Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro.» *Arch Biochem Biophys*, 1988: 261:64–71.

Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. «Molecular cloning of a non-isopeptidase-selective human endothelin receptor.» *Biochem Biophys Res Commun*, 1991: 178: 248–55.

Ohara T, Hashimura K, Asakura M, Ogai A, Amaki M, Hasegawa T, Kanzaki H, Sonoda M, Nishizawa H, Funahashi T, Kitakaze M. «Dynamic changes in plasma total and high molecular weight adiponectin levels in acute heart failure.» *J. Cardiol.*, 2011: 58, 181-90.

Ohnishi M, Wada A, Tsutamoto T, Fukai D, Kinoshita M. «Comparison of the acute effects of a selective endothelin ET-A and a mixed ET-A/ET-B receptor antagonist in heart failure.» *Cardiovasc Res*, 1998: 39: 617–24.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. «Apoptosis in the failing human heart.» *N Engl J Med*, 1997: 336:1131-1141.

Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. «Myocyte nuclear and possible cellular hyperplasia contribute to ventricular remodeling in the hypertrophic senescent heart in humans.» *J Am Coll Cardiol*, 1994: 24:140-9.

Olson EN. «A decade of discoveries in cardiac biology. .» *Nat Med*, 2004: 10:467-74.

OMS. «System, World Health Organization Statistical Information.» 2008.

Oorni K, Sneek M, Bromme D, Pentikainen MO, Lindstedt KA, Mayranpaa M, Aitio H, Kovanen PT. «Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro.» *J Biol Chem.*, 2004: 279:34776 –34784.

Oral H, Dorn GW II, Mann DL. «Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte.» *J Biol Chem*, 1997: 272:4836–4842.

Packer M. «The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure.» *J Am Coll Cardiol.*, 1992: 20:248-254.

Pagani ED., Miller LW., Russell SD., et al. «Extended mechanical circulatory support with a continuous-flow rotary left ventricular assist device.» *Journal of American College of Cardiology*, 2009: 54: 312-321.

Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS. «Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs.» *J Clin Invest.* , 1992: 90:389–398.

Palazzuoli A, Galderisi M, Gallotta M, Sciomer S, Nistri S, Agricola E, Ballo P, Buralli S, D'Andrea A, D'Errico A, Losi MA, Mele D, Mondillo S, Nuti R. «Peptide natriuretico di tipo B ed

ecocardiografia Doppler nella diagnosi di scompenso cardiaco: metodiche alternative o complementari?» *G Ital Cardiol*, 2009; 10 (8): 545-552.

Pandalai PK, Bulcao CF, Merrill WH, et al. «Restoration of myocardial β -adrenergic receptor signaling following left ventricular assist device support.» *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006; 131:975-980.

Pasini E., Aquilani R., Gheorghiade M., Dioguardi FS. «Malnutrition, muscle wasting and cachexia in chronic heart failure: the nutritional approach.» *Ital Heart*, 2003; 4:232-235.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N et al. «Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. .» *Cell*, 2005; 122: 927-939.

Pavone, Fioranelli. «Malattia coronarica, Fisiopatologia e diagnostica non invasiva.» 66-67. Springer, 2008.

Piepoli M, Clark AL, Volterrani M, Adamopoulos S, Sleight P, Coats AJ. «Contribution of muscle afferents to the hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in patients with chronic heart failure: effects of physical training.» *Circulation*, 1996; 93:940-52.

Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, et al. «Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium.» *Circulation*, 1999; 99:1802-9.

Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ilves M, Mäkinen M, Orzechowski HD, et al. «Inverse regulation of preproendothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1beta genes in cardiac cells by mechanical load.» *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006; 290: R1639-R1645.

Pineiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, et al. «Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes.» *FEBS Lett*, 2005; 579:5163-9.

Pontieri. Vol. II, cap. 55 in *Patologia generale*, 1339-1345;1377;1409-1420. Piccin, 2010.

Pontieri. Vol. I;II, in *Patologia generale*, 1339-1345;1377;1409-1420;311-12. Piccin, 2010.

Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, Weiss SJ. «Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages.» *J Exp Med.*, 2000; 192:789-799.

Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. «Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages.» *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92:3849-3853.

Reiser J, Adair B, Reinheckel T. «Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease.» *J Clin Invest.*, 2010; 120:3421-3431.

Reiss K, Kajstura J, Zhang X, et al. «Acute myocardial infarction leads to the upregulation of the IGF-1 autocrine system, DNA replication, and nuclear mitotic division in the remaining viable cardiac myocytes.» *Exp Cell Res*, 1994; 213:463-72.

Ritossa FM., Vonborstel RC., «Chromosome puffs in *Drosophila* induced by ribonuclease.» *Science*, 1964: 145(3631): 513–14.

Rodriguez J. «Caspase phosphorylation, cell death, and species variability.» *Science*, 2000: 287:1363a, doi:10.1126/science.287.5457.1363a.

Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, et al. «Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice.» *Circulation*, 1999: 15(23):3063–70.

Rohr S. «Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions.» *Circ Arrhythm Electrophysiol.*, 2012: 5:442-452.

Rose AG, Park SJ. « Pathology in patients with ventricular assist devices: a study of 21 autopsies, 24 ventricular apical core biopsies and 24 explanted hearts.» *Cardiovasc Pathol*, 2005: 14:19–23.

Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, et al. «Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure.» *N Engl J Med*, 2001: 345:1435– 43.

Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, Long JW, Ascheim DD, Tierney AR, Levitan RG, Watson JT, Meier P, et al. «Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure.» *N Engl J Med*, 2001: 345:1435-1443.

Roux S, Breu V, Ertel SI, Clozel M. «Endothelin antagonism with bosentan: a review of potential applications.» *J Mol Med*, 1999: 77:364–76.

Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzon M, et al. «HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells.» *EMBO Reports*, 2004: 5, 825–830.

Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort JS. «Rat procathepsin B: proteolytic processing to the mature form in vitro.» *J Biol Chem.*, 1992: 267: 15993–15999.

RS., Vasan. «Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations.» *Circulation*, 2006: 113(19):2335–2362.

Rugarli. «Medicina interna sistematica.» 89;103-105; 177-182. Elsevier srl, 2010.

Rugarli. «Medicina interna sistematica.» 89;103-105; 399-417. Elsevier srl, 2010.

Russell FD, Molenaar P. «The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect.» *Trends Pharmacol Sci*, 2000: 353-359.

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. «Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro.» *Cell*, 1993: 75:977-984.

Sakai S, Miyauchi T, Kobayash M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. «Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure.» *Nature*, 1996: 384:353–5.

- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi T, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. «Altered expression of isoforms of myosin heavy chain mRNA in the failing rat heart is ameliorated by chronic treatment with an endothelin receptor antagonist.» *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998; 31: S302–5.
- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. «IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system.» *J Clinical Invest*, 2007; 117:1538-49.
- Santese G, Stefano C, Schipani A, Sorbello S, Fontanesi L, Di Muro FM, Zacà F. «L'aldosterone nella fisiopatologia dell'insufficienza cardiaca. Implicazioni terapeutiche.» *CARDIOLOGY SCIENCE*, Novembre-Dicembre 2005: 272-276.
- Sasaki T, Kuzuya M, Nakamura K, Cheng XW, Hayashi T, Song H, Hu L, Okumura K, Murohara T, Iguchi A, Sato K. «AT1 blockade attenuates atherosclerotic plaque destabilization accompanied by the suppression of cathepsin S activity in apoE-deficient mice..» *Atherosclerosis*, 2010: 210:430–437.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H F. «A novel serum protein similar to C1q produced exclusively in adipocytes.» *J. Biol Chem.*, 1995: 270, 26746-9.
- Schmitz D, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, et al.,. «IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via IL-1 receptor-related protein T helper type 2 associated cytokine.» *Immunity*, 2005: 23:479-90.
- Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. «TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II.» *J Clin Invest.*, 2002: 109:787–796.
- Schultz JJ., Witt SA., Glascock BJ., Nieman ML., Reiser PJ., Nix SL., Kimball TR., Doetschman T. «TGFbeta 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II.» *J Clin Invest.*, 2002: 109:787-796.
- Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhilber ML, Handa V, Gannon J, Lee RT. «Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling.» *Circ Heart Fail*, 2009; 2:684-691.
- Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, McKenna WJ. «Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression.» *Circulation (Circulation)*, 2007; 115:1710-1720.
- Setoguchi M, Leri A, Wang S, et al. «Activation of cyclins and cyclin-dependent kinases, DNA synthesis, and myocyte mitotic division in pacing-induced heart failure in dogs.» *Lab Invest*, 1999; 79:1545-58.
- Shi Y, Massague J. «Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.» *Cell.*, 2003: 113:685–700.

Shibata R, Murohara T, Ouchi R. «Protective Role of Adiponectin in Cardiovascular Disease.» *Current Medicinal Chemistry*, 2012: Vol 19; No1.

Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel D R, Kumada M, Sato K, Schiekofer S, Ohashi K, Funahashi T, Colucci WS, Walsh K. «Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart.» *Nat. Med.*, 2004: 10, 1384-9.

Shibata R, Ouchi N, Murohara T. «Adiponectin and cardiovascular disease.» *Circ J.*, 2009: 73, 608-14.

Shibata R, Sato K, Kumada M, Izumiya Y, Sonoda M, et al. «Adiponectin accumulates in myocardial tissue that has been damaged by ischemia-reperfusion injury via leakage from the vascular compartment.» *Cardiovascular Research*, 2007: 74:471–479.

Shimano M, Ouchi N, Shibata R, Ohashi K, Pimentel DR, Murohara T, Walsh K,. «Adiponectin deficiency exacerbates cardiac dysfunction following pressure overload through disruption of an AMPK-dependent angiogenic response.» *J. Mol. Cell. Cardiol*, 2010: 49, 210-20.

Shimano M, Ouchi N, Walsh K. «Cardiokines. Recent Progress in Elucidating the Cardiac Secretome.» *Circulation*, 2012: 126:e327-32.

Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, Kitauro Y, Isomura T, Suma H. «Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy.» *Jpn Circ J*, 2001: 65: 965–968.

Shimpo M, et al. «Serum levels of the interleukin-1receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction.» *Circulation*, 2004: 109:2186–2190.

Shiojima I., Sato K., Izumiya Y., Schiekofer S., Ito M., Liao R., et al.,. « Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure .» *J Clin Invest*, 2005: 115:2108–18.

Siegel RJ, Shah PK, Fishbein MC. «Idiopathic restrictive cardiomyopathy.» *Circulation (Circulation)*, 1984: 70:165-169.

SILVERTHORN. «Fisiologia un approccio integrato.» 458-460. Ambrosina, 2005.

Simon MA, Kormos RL, Murali S, Nair P, Heffernan M, Gorcsan J, Winowich S, McNamara DM. «Myocardial recovery using ventricular assist device: prevalence, clinical characteristics and outcomes.» *Circulation*, 2005: 30(Suppl. 9): I32-6.

Simpson F, Whitehead JP. «Adiponectin – It’s all about the modifications.» *Int J Biochem Cell Biol*, 2010: 42(6):785–788.

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. « Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblast in vitro.» *Circ Res*, 2000: 86:1259-65.

Siwik DA, Colucci WS. «Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium.» *Heart Fail Rev*, 2004: 9:43-51.

Slaughter MS, Meyer AL and Birk EJ. «Destination therapy with left ventricular assist devices: patient selection and outcomes.» *Curr Opin Cardiol*, 2011: 26(3):232-6.

Slaughter MS., Tsui SS, El-Banayosy A, Sun BC, Kormos RL, Mueller DK, Massey HT, Icenogle TB., Farrar DJ, Hill JD. «Results of a multicenter clinical trial with the Thoratec Implantable Ventricular Assist Device .» *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007: 133(6):1573-80.

Soppa GK, Barton PJ, Terracciano CM, Yacoub MH.,. « Left ventricular assist device-induced molecular changes in the failing myocardium.» *Curr Opin Cardiol.*, 2008: 23:206–218.

Spinale FG, Walker JD, Mukherjee R, Iannini JP, Keever AT, Gallagher KP. «Concomitant endothelin receptor subtype-A blockade during the progression of pacing-induced congestive heart failure in rabbits. Beneficial effects on left ventricular and myocyte function.» *Circulation*, 1997: 95: 1918–29.

Spira D, Stypmann J, Tobin DJ, Petermann I, Mayer C, Hagemann S, Vasiljeva O, Gunther T, Schule R, Peters C, Reinheckel T. «Cell typespecific functions of the lysosomal protease cathepsin L in the heart.» *J Biol Chem*, 2007: 282:37045–37052.

Sternlicht MD, Werb Z. «How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.» *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2001: 17, 463-516.

Stevenson LW., Pagani FD., Young JB., et al.,. «INTERMACS profiles of advanced heart failure: the current practice.» *J Heart Lung Transplant*, 2009: 28:535-41.

Sugden PH. «An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte.» *J Mol Cell Cardiol*, 2003: 35:871-886.

Sukhanov S., Semprun-Prieto L., Yoshida T., Michael Tabony A., Higashi Y., Galvez S., Delafontaine P. «Agiotensin III, oxidative stress and skeletal muscle wasting.» *Am J Med Sci*, 2011: 342:143-147.

Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. «Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells.» *J Clin Invest.*, 1998: 102:576–583.

Sun J, Sukhova GK, Zhang J, Chen H, Sjoberg S, Libby P, Xia M, Xiong N, Gelb BD, Shi GP. «Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice.» *Arterioscler Thromb Vasc*, 2012: 32:15–23.

Sun M, Chen M, Liu Y, Fukuoka M, Zhou K, Li G, Dawood F, Gramolini A, Liu PP. «Cathepsin-L contributes to cardiac repair and remodelling post-infarction.» *Cardiovascular Research*, 2011: 89:374-383.

Sutsch G, Bertel O, Kiowski W. «Acute and short-term effects of the nonpeptide endothelin-1 receptor antagonist bosentan in humans.» *Cardiovasc Drugs Ther*, 1997: 10: 717–25.

- Swedberg K, Eneroth P, Kjekshts J, Wilhelmsen L. «Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group.» *Circulation*, 1990: 82:1720.
- Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber MT, Summer RS, Kihara S, Walsh K. «Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies.» *J. Clin. Invest.*, 2007: 117, 375-86.
- Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, et al.,. «Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage.» *J Biol Chem*, 2009: 284:19420-6.
- Taleb S, Canello R, Poitou C, Rouault C, Sellam P, Levy P, Bouillot JL, Coussieu C, Basdevant A, Guerre-Millo M, Lacasa D, Clement K. «Weight loss reduces adipose tissue cathepsin S and its circulating levels in morbidly obese women.» *J Clin Endocrinol Metab.*, 2006: 91:1042–1047.
- Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. «PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000: 97:109 –114.
- Tanaka T., Nakata T., Oka T., Ogawa T., Okamoto F., Kusaka Y., et al.,. «Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations.» *J Lipid Res*, 2001: 42:751-9.
- Tanonaka K, Toga W, Takeo S. «Induction of heat shock protein 70 in failing heart.» *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2004: 123(2): 71–76.
- Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loredó ML, Weiss LM, et al. «Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease.» *Infect Immun*, 2005: 73:2496-2503.
- Tanwar V, Sachdeva J, Golechha M, Kumari S, Arya DS. «Curcumin protects rat myocardium against isoproterenol-induced ischemic injury: attenuation of ventricular dysfunction through increased expression of HSP27 along with strengthening antioxidant defense system.» *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010: 55(4): 377–384.
- Taylor RW., Giordano C., Davidson MD., d'Amati G., Hayes CM., Barron MJ., et al.,. «Homoplasmic mitochondrial tRNA mutation as a cause of maternally-inherited hypertrophic cardiomyopathy.» *J Am Coll Cardiol*, 2000: 34:1786-96.
- Terracciano CM, Koban MU, Soppa GK, Siedlecka U, Lee J, Stagg MA, Yacoub MH. «The role of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reverse remodeling: relevance for LVAD-recovery.» *Ann N Y Acad Sci.*, 2007: 1099:349–360.
- Thaik CM, Calderone A, Takahashi N, Colucci WS. «Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes.» *J Clin Invest.*, 1995: 96:1093–1099.
- Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. «Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people.» (*N Engl J Med*) 1988: 318(3):129-33.

Thompson LO, Skrabal CA, Loebe M, Lafuente JA, Roberts RR, Akgul A, Jones V, Bruckner BA, Thohan V, Noon GP, Youker KA. «Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients.» *J Surg Res*, 2005: 123:25–32.

Tian Y, Morrisey EE. «Importance of myocyte-nonmyocyte interactions in cardiac development and disease.» *Circ Res*, 2012: 110:1023-1034.

Tirziu D, Giordano FJ, Simons M. «Cell communications in the heart.» *Circulation*, 2010: 122:928-937.

Torre-Amione G, Stetson S, Youker K, Durand J, Radovancevic B, Delgado RM, Frazier OH, Entman ML, Noon G. «Decreased expression of tumor necrosis factor- α in failing human myocardium after mechanical circulatory support: a potential mechanism for cardiac recovery.» *Circulation*, 1999: 100(11): 1189–1193.

Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ III, Zentella A, Albert JD, Shires GT. «Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.» *Science.*, 1986: 234:470–474.

Trost SU, Omens JH, Karlon WJ, Meyer M, Mestril R, et al. «Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70 .» *J Clin Invest*, 1998: 101: 855–862.

Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, Yamazaki S, Asano Y, Ogai A, Okazaki H, Asai M, Nagamachi Y, Maeda N, Shintani Y, Minamino T, Asakura M, Kishimoto I, Funahashi T, Tomoike H, Kitakaze M. «Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure.» *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2009: 286, 32790-800.

Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink M P, Lotze MT, et al.,. «The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia–reperfusion.» *The Journal of Experimental Medicine*, 2005: 201, 1135–1143.

Ungerer M, Bohm M, Elce JS, et al. «Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart.» *Circulation* , 1993: 87:454–463.

Valente M, Calabrese F, Thiene G, Angelini A, Basso C, Nava A, Rossi L. «In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricularcardiomyopathy.» *Am J Pathol* (The American journal of Pathology), 1998: 152:479-484.

Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D. «Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease.» *N Engl J Med*, 2001: 345 : 1291 – 1297.

Vasan RS., Larson MG., Benjamin EJ., Evans JC., Levy D.,. « Left ventricular dilation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. .» *N Engl J Med.*, 1997: 336:1350-1355.

- Viappini S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, León H., et al. «Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione.» *Biochem Pharm*, 2009: 77: 826-834.
- Villarreal FJ, Griffin M, Omens J, Dillmann W, Nguyen J, Covell J. «Early Short-Term Treatment With Doxycycline Modulates Postinfarction Left Ventricular Remodeling.» *Circulation*, 2003: 108(12):1487–92.
- Vittorini S, Prontera C, Clerico A. «Citochine come biomarcatori di scompenso cardiaco.» *LigandAssay*, 2011: 10-17.
- Wang J, Xu N, Feng X, Hou N, Zhang J, Cheng X, Chen Y, Zhang Y, Yang X. «Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure.» *Circ Res.*, 2005: 97:821– 828.
- Wang TJ, Wollert KC, Larson MG, Coglianese E, McCabe EL, Cheng S, Ho JE, Fradley MG, Ghorbani A, Xanthakis V, Kempf T, Benjamin EJ, Levy D, Vasan RS, Januzzi JL. «Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study.» *Circulation*, 2012: 126(13):1596-604.
- Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. «Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications.» *Biochem J*, 2008: 409(3):623–633.
- Wanner TD, Mitchell JA, De Nucci G, Vane JR. «Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit.» *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989: 13:S85–8.
- Weber KT. «Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network.» *J Am Coll Cardiol*, 1989: 13:1637–1652.
- Weber KT. «Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation.» *Circulation*, 1997: 96:4065-4082.
- Weinberg EO, et al. «Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction.» *Circulation*, 2002: 106:2961–2966.
- Weinberg EO, et al. «Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker.» *Circulation*, 2003: 107:721–726.
- Weiss RG., Gerstenblith G., Bottomley PA.,. «ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005: 102:808-13.
- Welch WJ. « How cells respond to stress.» *Sci Am* , 1993: 268: 56–64.
- Wilson SR., Givertz MM., Stewart GC., Mudge GH.,. «Ventricular Assist Devices. The Challenges of Outpatient Management.» *Journal of the American College of Cardiology* , 2009: 1647-1660.
- Wohlschlaeger J, Schmitz KJ, Schmid C, Schmid KW, Keul P, Takeda A, Weis S, Levkau B, Baba HA. « Reverse remodeling following insertion of left ventricular assist devices (LVAD): a review of the morphological and molecular changes.» *Cardiovasc Res.*, 2005: 68:376–386.

Wolleret KC, Kempf T, Peter T, Olofsson S, James S, Johnston N, et al.. «Prognostic value of growth -differentiation factor-15 in patients with non ST-elevation acute coronary syndrome.» *Circulation*, 2007: 115:962-71.

Wollert KC, Kempf T. «GDF-15 in heart failure: providing insight into end-organ dysfunction and its recovery?» *European Journal of Heart Failure*, 2012: 14, 1191–1193.

Wood IS, Wang B, Trayhurn P. «IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes.» *Biochem Biophys Res Commun*, 2009: 384:105-9.

Wood S. *RENEWAL trial: no improvement in CHF with etanercept HeartWire News.*, 11 Giugno 2002. <http://www.theheart.org> (consultato il giorno Agosto 15, 2002).

Xie L, Terrand J, Xu B, Tsapralis G, Boyer J, Chen QM. «Cystatin C increases in cardiac injury: a role in extracellular matrix protein modulation.» *Cardiovasc Res.*, 2010: 87:628–635.

Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, Hewett TE, Breit SN, Molkenin JD. «GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation.» *Circ Res*, 2006: 98:342–350.

Yamamoto Y, Watari Y, Brydun A, Yoshizumi M, Akishita M, Horiuchi M, Chayama K, Oshima T, Ozono R. «Role of the angiotensin II type 2 receptor in arterial remodeling after wire injury in mice.» *Hypertens Res*, 2008: 32(6):1241-9.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. «Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.» *Nature*, 2003: 423, 762-9.

Yamauchi-Kohno R, Miyauchi T, Hoshino T, Kobayashi T, et al. «Role of endothelin in deterioration of heart failure due to cardiomyopathy in hamsters: increase in endothelin-1 production in the heart and beneficial effect of endothelin-A receptor antagonist on survival and cardiac function.» *Circulation*, 1999: 99:2171–6.

Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, et al. «Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy.» *J Biol Chem*, 1996: 271:3221-3228.

Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, et al. «Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. .» *FEBS Lett*, 1993: 318:83-7.

Yanagisawa M, Kurohawa H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. «A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.» *Nature*, 1988: 332: 411–5.

Yang M, Sun J, Zhang T, Liu J, Zhang J, Shi MA, Darakhshan F, Guerre-Millo M, Clement K, Gelb BD, Dolgiov G, Shi GP. «Deficiency and inhibition of cathepsin K reduce body weight gain and increase glucose metabolism in mice.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2008: 28:2202–2208.

Yang M, Zhang Y, Pan J, Sun J, Liu J, Libby P, Sukhova GK, Doria A, Katunuma N, Peroni OD, Guerre-Millo M, Kahn BB, Clement K, Shi GP. «Clement K, Shi GP. Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance.» *Nat Cell Biol*, 2007: 9:970 –977.

Yin H, Huang BJ, Yang H, et al. «Pretreatment with soluble ST2 reduces warm hepatic ischemia/reperfusion injury.» *Biochem Biophys Res Commun* , 2006: 351:940-6.

Yoda-Murakami M, Taniguchi M, Takahashi K, Kawamata S, Saito K, Choi-Miura NH, et al. «Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver.» *Biochem Biophys Res Commun* , 2001: 285:372–7.

Yorikane R, Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Sugishita Y, Goto K. «Increased production of endothelin-1 in the hypertrophied rat heart due to pressure overload.» *FEBS Lett*, 1993: 332:31-34.

Zafeiridis A, Jeevanandam V, Houser SR, Margulies KB. «Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support.» *Circulation*, 1998: 98:656–662.

Zampila R, Lindsey ML. «Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences.» *J Mol Cell Cardiol*, 2010: 48(3): 558–563. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.06.012.

Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA et al. «Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. J Clin Invest 2007; 117:.» *J Clin Invest* , 2007: 117:1782–1793.

GLOSSARIO

- ACC/AHA:** American College of Cardiology/American Heart Association
- ADN:** Adiponectina
- Akt:** Proteina chinasi B
- AMPK:** proteina chinasi attivata dall'AMP
- ANP:** Peptide Natriuretico Atriale
- ATG:** Autophagy-related genes
- β -AR:** Recettore beta adrenergico
- BNP:** Peptide Natriuretico Cerebrale
- CNP:** Peptide Natriuretico C
- CVD:** Malattie Cardiovascolari
- ECM:** Matrice Extracellulare
- ESC:** European Society of Cardiology
- ESH:** European Society of Hypertension
- ET:** Endotelina
- FADD:** Fas Associata con i Domini di Morte
- GDF-15:** Growth Differentiation Factor-15
- ICE:** Enzima di Conversione dell'interleuchina 1
- ICU:** Tempo di degenza in terapia intensiva
- IDC:** Cardiomiopatia Dilatativa Idiopatica
- IHD:** Cardiopatia Ischemica
- IL:** Interleuchina
- INTERMACS:** The Interagency Registry for Mechanical Assisted Circulatory Support
- JAK/STAT:** Janus kinase/Signal Transducers and Activator of Transcription
- LVEF:** Frazione di Eiezione del Ventricolo Sinistro
- NF- κ B:** Fattore di trascrizione Nucleare- κ B
- NO:** Monossido d'Azoto
- NYHA:** New York Heart Association
- OPN:** Osteopontina
- PI-3K:** Fosfatidil-inositolo 3 chinasi
- PPIA:** Peptidilpropyl isomerase A
- RAAS:** Sistema Renina Angiotensina Aldosterone
- RPL13a:** Proteina Ribosomiale 13a
- RyR:** Recettore della Rianodina
- SC:** Scompenso Cardiaco

SERCA: Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase

TACE: Tumor necrosis factor- α Converting Enzyme

TNF: Tumor Necrosis Factor

TOR: Target Of Rapamycin

LVAD: Dispositivo di Assistenza Ventricolare Sinistra

YWHAZ: Tryptophan 5-monooxygenase protein, zeta polypeptide