

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dottorato di Ricerca in

Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

XXVIII Ciclo

**EFFETTI DELLA RESTRIZIONE CALORICA SULLE ALTERAZIONI
DEL SISTEMA NERVOSO SIMPATICO E SULLA FIBROSI
IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI SCOMPENSO CARDIACO
POST-ISCHEMICO**

Relatore

Ch.mo Prof.

Nicola Ferrara

Candidata

Dr.ssa Gambino Giuseppina

Triennio Accademico 2013-2016

Indice

ABSTRACT	4
1.2 Innervazione cardiaca e scompenso	8
1.3 Rimodellamento cardiaco e fibrosi	10
1.4 Restrizione calorica	12
2. SCOPO DELLA TESI	13
3. MATERIALI E METODI	14
3.1 Disegno dello studio sperimentale	14
3.2 Infarto del miocardio	15
3.3 Protocollo dietetico utilizzato	15
3.4 Ecocardiografia	16
3.5 Emodinamica cardiaca	16
3.6 Western Blotting	17
3.7 Immunofluorescenza	18
3.8 Valutazione istologica della fibrosi	19
3.9 Analisi statistica	20
4. RISULTATI	21
4.1 Effetti della RC sul peso corporeo e sul peso del cuore.	21
4.2 Effetti della restrizione calorica sulla funzione cardiaca valutata con ecocardiografia	22
4.3 Effetti della RC sulla contrattilità cardiaca basale e dopo massima stimolazione adrenergica	23

4.4 Effetto della RC sull'espressione proteica dei recettori β 1-AR e della chinasi GRK2 nel cuore.	24
4.5 Effetto della RC sull'innervazione cardiaca	25
4.6 Effetto della RC sulla fibrosi cardiaca.	25
5. DISCUSSIONE	26
6. CONCLUSIONI	29
7. FIGURE E TABELLE	30
8. BIBLIOGRAFIA	41

ABSTRACT

Background: Lo scompenso cardiaco è caratterizzato dall'iperattività del sistema nervoso simpatico che rappresenta inizialmente un processo di adattamento rivolto a compensare la riduzione della performance cardiaca. Il cronico incremento delle catecolamine plasmatiche si associa ad una marcata disregolazione dei recettori β -adrenergici (β -AR) cardiaci e ad una progressiva perdita delle fibre nervose cardiache sia adrenergiche che colinergiche. La restrizione calorica (RC) è un intervento dietetico capace di migliorare la funzione del sistema cardiovascolare ed il profilo metabolico con conseguenze favorevoli sulla qualità della vita.

Scopo: Lo scopo del progetto è stato quello di valutare gli effetti di un trattamento dietetico con RC sulla funzione cardiaca e sullo stato di innervazione cardiaca in un modello di SC post-ischemico.

Materiali e metodi: Sono stati studiati 38 ratti, sottoposti all'operazione chirurgica di induzione dell'infarto del miocardio. Animali sham-operati sono stati inclusi come controllo. Dopo 4 settimane dall'induzione dell'infarto, i ratti sono stati studiati ecocardiograficamente e quindi randomizzati ad un regime di RC o dieta ad libitum per un periodo di 12 mesi.

Risultati: Come atteso un anno di dieta a regime calorico ristretto induceva una significativa diminuzione sia del peso corporeo che di quello cardiaco rispetto al gruppo di ratti a regime calorico normale. Nel gruppo di ratti scompensati la RC induceva un significativo miglioramento della funzione cardiaca sistolica, del rimodellamento ventricolare e della riserva inotropica rispetto al gruppo di ratti scompensati trattati con dieta normale. Inoltre, lo SC determinava una riduzione significativa della densità dei β -AR di membrana nel cuore rispetto agli animali sham-operati, mentre la RC era in grado di indurre un significativo aumento dei β -AR. Studi di microscopia confocale evidenziavano una marcata riduzione delle fibre nervose nei cuori dei ratti con SC rispetto ai sham-operati. Sorprendentemente, la RC era in grado di aumentare significativamente le fibre adrenergiche del cuore scompensato rispetto agli animali scompensati a dieta normale. **Conclusioni:** I nostri dati suggeriscono che in un modello sperimentale di SC la RC, iniziata dopo l'infarto del miocardio, determina un miglioramento della densità dei recettori beta-adrenergici cardiaci ed un aumento dell'innervazione simpatica del cuore.

1. INTRODUZIONE

1.1 Scompenso cardiaco

Lo scompenso cardiaco (SC) è una delle patologie croniche maggiormente diffuse nella popolazione anziana ed è caratterizzato dalla diminuzione della funzione ventricolare sinistra e da modificazioni bioumorali quali l'iperattivazione del sistema simpatico, del sistema renina-angiotensina-aldosterone e del sistema infiammatorio (1).

La prevalenza dello SC nella popolazione generale è stata stimata tra lo 0,4 e il 2%. In Italia circa 2 milioni di pazienti sono affetti da SC e più di un terzo di questi necessita in media di un ricovero ospedaliero annuale comportando un costo pari a circa l'1-2% della spesa sanitaria nazionale (2).

La Società Europea di Cardiologia ha mostrato che in Europa il numero di pazienti con SC è compreso tra 2 e oltre 10 milioni (3). In circa la metà dei pazienti in cui sia stata posta diagnosi di SC, il decesso si verifica entro 4 anni e nei soggetti affetti da SC grave il decesso avviene entro 1 anno (2,3).

In corso di SC, l'iperattività simpatica con il conseguente incremento dei livelli di catecolamine circolanti (CA) rappresenta inizialmente un processo di adattamento rivolto a compensare la riduzione della performance cardiaca; tuttavia, il cronico incremento delle CA plasmatiche si associa ad una marcata disregolazione dei recettori β -adrenergici (β -AR) cardiaci mediata dall'aumento dell'attività della chinasi tipo 2 dei recettori accoppiati a proteine G (G-Protein coupled Receptor Kinase 2 - GRK2) (4-7).

I recettori β 1 e β 2-adrenergici (β 1 e β 2-AR) sono recettori accoppiati a proteine G (GPCR) fisiologicamente espressi sulla membrana plasmatica dei cardiomiociti in un

rapporto di 4:1 con un ruolo fondamentale nella regolazione della funzione contrattile cardiaca (5,8,9).

Le GRK sono proteine citoplasmatiche ad attività serin-treonin-chinasica responsabili della fosforilazione e successiva desensibilizzazione dei GPCR attivati dall'agonista (9,10). La famiglia delle GRK è formata da 7 isoforme con similitudini strutturali e funzionali; tra queste GRK2, GRK3 e GRK5 sono ubiquitariamente espresse mentre GRK2 rappresenta l'isoforma maggiormente rappresentata nel cuore (8,11).

Studi preclinici e clinici hanno dimostrato che in corso di SC l'espressione e l'attività cardiaca di GRK2 sono aumentate e determinano l'attivazione di processi di desensibilizzazione e down-regulation dei β 1-AR (4,5). Tale meccanismo ha inizialmente lo scopo di proteggere i cardiomiociti dagli effetti tossici degli aumentati livelli di CA, ma a lungo termine è responsabile della disfunzione dei β -AR cardiaci, caratteristica peculiare dello SC cronico (4,5,8).

Negli ultimi anni è stato mostrato da numerose pubblicazioni scientifiche come l'inibizione di GRK2 possa essere considerata un importante target terapeutico per questa patologia (4,12,13).

Tale ipotesi è supportata dall'osservazione che l'inibizione di GRK2 sia attraverso terapia genica (tramite il peptide β ARKct) sia con l'utilizzo di topi transgenici (che esprimono selettivamente il peptide β ARKct nei cardiomiociti o con delezione negli stessi di GRK2) permette un miglioramento della funzione cardiaca in un modello di scompenso cardiaco post-ischemico (12-17).

Inoltre, un rilevante meccanismo molecolare dell'azione terapeutica dei β -bloccanti consiste nel bloccare la desensibilizzazione e down-regulation GRK2-mediata dei β -AR (8,13). Recentemente è stato dimostrato che la paroxetina, un farmaco da tempo approvato dall'FDA per le sindromi depressive, può essere utile nella terapia dello SC grazie all'inibizione di GRK2 a livello cardiaco (18).

L'iperattività del Sistema Nervoso Simpatico (SNS) che si osserva in corso di scompenso cardiaco rappresenta inizialmente un processo di adattamento rivolto a compensare la riduzione della performance cardiaca; tuttavia, il cronico incremento delle CA plasmatiche si associa ad una marcata disregolazione dei recettori β -adrenergici cardiaci sia a livello recettoriale che post-recettoriale, responsabile di un danno strutturale caratterizzato da: ipertrofia ventricolare, necrosi focale, infiammazione ed aumento della deposizione di collagene con conseguente fibrosi interstiziale miocardica. Inoltre, lo SC cronico si associa ad una progressiva perdita delle fibre nervose cardiache sia adrenergiche che colinergiche.

1.2 Innervazione cardiaca e scompenso

Il tessuto cardiaco è diffusamente innervato dal sistema nervoso autonomo, caratterizzato dalla presenza di fibre simpatiche e parasimpatiche.

I neuroni simpatici rilasciano norepinefrina che agisce a livello post-sinaptico sui recettori β_1 -AR e β_2 -AR, mentre le fibre parasimpatiche rilasciano acetilcolina che agisce sui recettori muscarinici. L'integrazione delle fibre simpatiche, parasimpatiche e dei rispettivi neurotrasmettitori è in grado di modulare la frequenza cardiaca (funzione cronotropa), la velocità di conduzione dell'impulso elettrico (funzione dromotropa), il rilassamento miocardico (funzione lusitropa) e la contrazione miocardica (funzione inotropa) (41).

Dati in letteratura riportano che la densità delle fibre nervose cardiache si riduce fino al 50% con l'età e risulta alterata in numerose condizioni patologiche (es. infarto del miocardio) (42), nelle quali in seguito a degenerazione Walleriana si ha proliferazione cellulare e rigenerazione assonale disorganizzate con conseguenti ripercussioni sulla funzionalità cardiaca.

Lo SC è caratterizzato dalla diminuzione della funzione ventricolare sinistra e da numerose modificazioni bioumorali, è noto che in corso di SC si assiste ad una diminuzione dell'innervazione del cuore che interessa principalmente ma non esclusivamente le fibre del sistema nervoso simpatico. Tale riduzione sembra predisporre ad un aumentato rischio aritmico con morte improvvisa dovuta a complicanze aritmiche.

Alla luce di tali evidenze, le più recenti linee guida per il trattamento dello SC raccomandano l'impianto di un dispositivo cardiovertore/defibrillatore (ICD) non solo nei pazienti che hanno già presentato un episodio di tachicardia/fibrillazione

ventricolare (prevenzione secondaria), ma anche in tutti i pazienti con SC ad alto rischio di eventi aritmici (prevenzione primaria).

Le alterazioni dell'innervazione simpatica del cuore scompensato possono essere valutate con scintigrafia con I^{123} MIBG (meta-iodo-benzilguanidina). L' I^{123} MIBG è un analogo della NE, che ha in comune sia i meccanismi di trasporto che di up-take, a differenza della NE però non lega i recettori post-sinaptici non venendo così metabolizzata. All'aumentare della disfunzione del cuore scompensato, l'upake di MIBG si riduce, portando ad una riduzione del rapporto cuore/mediastino di captazione (43). Un recente studio ha dimostrato che tale metodica è in grado di predire il rischio di aritmie e l'accuratezza dell'impianto in pazienti con ICD. Quindi, i pazienti con alterazione (riduzione) dell'innervazione simpatica del cuore sono quelli a maggior rischio di aritmie spesso fatali. Inoltre, terapie note per aumentare la sopravvivenza in corso di SC, quali la terapia con beta-bloccante, si sono dimostrate in grado di aumentare l'innervazione cardiaca.

1.3 Rimodellamento cardiaco e fibrosi

Con il termine fibrosi si indica l'eccessivo accumulo di tessuto connettivo che si verifica in un organo o in tessuto in risposta ad un danno. I fibroblasti sono dispersi nel tessuto connettivo e sono responsabili del turn-over della matrice extracellulare (ECM), la quale forma un network tra le cellule, fornendo così un supporto strutturale agli organi, garantendo la trasmissione dei segnali bio-chimici tra i componenti cellulari.

La fibrosi cardiaca, è un processo fisio-patologico innescato da diverse patologie cardiovascolari quali: infarto del miocardio, sovraccarico pressorio (ipertensione arteriosa, stenosi aortica), sovraccarico di volume (insufficienze valvolari), infiammazione del muscolo cardiaco (miocardite) o cardiopatia dilatativa primitiva; è influenzato dal carico emodinamico e dall'attivazione neuro-ormonale che si verifica in seguito ad un danno (44). Nonostante tutte queste patologie abbiano diversi fattori eziologici i meccanismi patologici e molecolari alla base sono comuni.

Quando si verifica un danno, i fibroblasti, si attivano, migrano e proliferano nella sede dell'insulto in risposta alle chemochine, alle chitochine e ai fattori di crescita rilasciati dalle cellule infiammatorie nell'area colpita. Il fibroblasto così "attivato" prenderà il nome di miofibroblasto, presenterà delle caratteristiche fenotipiche, secretorie e contrattili differenti dal fibroblasto quiescente.

Il miofibroblasto, svolge un ruolo fondamentale nel periodo immediatamente successivo all'evento acuto, la sua attivazione con la conseguente iper-produzione di ECM è necessaria per la sostituzione dei cardiomiociti danneggiati, garantendo così l'integrità del muscolo cardiaco. Questo iniziale processo di guarigione prende il nome di fibrosi ripartiva ed è nelle prime fasi un meccanismo benefico per il cuore. Tuttavia, la continua attivazione e proliferazione dei fibroblasti, fibrosi reattiva, è un

processo maladattativo, che conduce ad uno sbilanciamento tra deposizione della ECM e degradazione della stessa, con conseguente inspessimento delle pareti muscolari e disfunzione diastolica. Questa aumentata deposizione di ECM tra i cardiomiociti può alterare l'accoppiamento elettrico e favorire lo sviluppo di scompenso cardiaco.

Il rimodellamento cardiaco, può essere definito come un insieme di variazioni che interessano il profilo di espressione genomico, molecolare e cellulare, che conducono a cambiamenti nella “geometria” cardiaca, in termini di dimensioni e forma con conseguenze significative sulla funzionalità dell'organo.

I pathway coinvolti sono differenti, in letteratura viene descritto il ruolo del TNF-alfa, MMT (matrix metalloproteinase), galattina, IL-1b, S1P, e del sistema RAA. (45, 46). Recenti studi (47) hanno evidenziato una up-regolazione dei livelli di espressione della chinasi GRK2 nei fibroblasti cardiaci nella fibrosi reattiva, facendo ipotizzare un coinvolgimento di tale chinasi nella regolazione della sintesi del collagene in corso di scompenso cardiaco. Ad avvalorare tale dato vi è l'evidenza di una riduzione della fibrosi dopo trattamento con beta-bloccanti (46).

1.4 Restrizione calorica

La restrizione calorica (RC) è un intervento dietetico capace di aumentare la sopravvivenza oltre che svolgere un ruolo protettivo contro obesità, malattie metaboliche e malattie cardiovascolari (19,20). Si definisce RC, la riduzione dell'apporto calorico, senza malnutrizione, mantenendo adeguati livelli di nutrienti(19-21). È ormai noto che la RC su modelli animali contribuisce alla riduzione del rischio di malattie croniche legate all'età, ed esercita effetti favorevoli su ipertensione, aterosclerosi, infarto del miocardio (IM), e SC(19-22). Non sono tuttora completamente conosciuti i meccanismi molecolari attraverso i quali agisce la RC, tuttavia alcuni studi hanno confermato che i pathway cellulari (come ad esempio SIRT-1) comunemente attivati dalla RC sono altresì innescati da un polifenolo presente in diverse fonti di cibo vegetale come le uve rosse, conosciuto con il nome di resveratrolo(23-25). E' inoltre stato dimostrato in un modello sperimentale che la RC se iniziata 3 mesi prima dell'induzione dell'IM ha un ruolo cardioprotettivo in quanto capace ridurre il rimodellamento del ventricolo sinistro e l'espansione dell'infarto (48). Recentemente Kitzman et al. (49) hanno mostrato che la restrizione calorica, così come l'esercizio fisico, è in grado di migliorare il picco di VO₂ in pazienti anziani obesi con scompenso cardiaco a frazione di eiezione conservata. Tale studio ha ulteriormente confermato l'effetto favorevole di una dieta ristretta non solo in modelli sperimentali animali ma anche nell'uomo. Tuttavia non è noto se un protocollo dietetico ipocalorico, iniziato dopo che lo SC si è instaurato, è in grado di ritardare la progressione dello SC e quali possano essere i meccanismi molecolari coinvolti.

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente studio è stato condotto per valutare gli effetti terapeutici di un trattamento dietetico con restrizione calorica, sulla funzionalità cardiaca e sul signaling adrenergico in un modello sperimentale di scompenso cardiaco post-ischemico.

3. MATERIALI E METODI

Il protocollo sperimentale è stato sviluppato in accordo con “*The Guide for Care and Use of Laboratory Animals*” del “*National Institutes of Health*” (NIH Publication No. 85–23, Revised 1996) ed è stato approvato dal “Comitato Etico per utilizzo degli animali nella Ricerca” dell’Università degli Studi di Napoli Federico II.

3.1 Disegno dello studio sperimentale

Sono stati studiati 38 ratti Wistar-Kyoto di circa 3 mesi. Dopo una settimana di acclimatazione gli animali sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali: un gruppo veniva sottoposto ad infarto del miocardio (MI) mentre l’altro gruppo andava incontro ad un’operazione sham (Fig 1). Dopo 4 settimane dall’infarto, un adeguato time-point per l’istaurarsi dello SC, i ratti sono stati sottoposti ad ecocardiografia per confermare negli animali precedentemente infartuati un’uniforme disfunzione ventricolare e un sovrapponibile livello di SC. A questo punto gli animali di ciascun gruppo di studio sono stati ulteriormente randomizzati in 2 differenti sottogruppi con un diverso trattamento dietetico (dieta normale oppure restrizione calorica) (Fig 1).

La popolazione di studio consisteva quindi di tre gruppi sperimentali: ratti sham a dieta normale, ratti scompensati a dieta normale e ratti scompensati a RC. Dopo 12 mesi dall’inizio del regime dietetico sono state effettuate le seguenti procedure: valutazione ecocardiografica, emodinamica cardiaca, eutanasia, espianto degli organi ed analisi di laboratorio.

3.2 Infarto del miocardio

I ratti anestetizzati, sono stati intubati e ventilati meccanicamente; l'anestesia è stata mantenuta utilizzando una miscela di isoflurano al 2% (v/v) e ossigeno. L'infarto del miocardio è stato ottenuto mediante la legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore, come descritto in precedenza (26). Il tasso globale di mortalità (precoce e tardiva) per tale procedura era circa del 35%, come riportato precedentemente (26). Negli animali sham operati non è stata effettuata alcuna legatura, il ratto è stato semplicemente esposto ad apertura del torace per creare in esso una situazione di stress chirurgico in modo tale da normalizzare i risultati.

3.3 Protocollo dietetico utilizzato

Quattro settimane dopo l'intervento chirurgico, i ratti scompensati sono stati ulteriormente randomizzati in 2 differenti sottogruppi, destinati ad diverso trattamento dietetico, gli scompensati a dieta normale (HF N) e gli scompensati a dieta ristretta (HF RC). Il trattamento dietetico, iniziato un mese dopo l'infarto del miocardio è durato 12 mesi.

Il protocollo di restrizione calorica utilizzato è conosciuto come Intermittent fasting e consisteva nel fornire il cibo a giorni alterni con una dieta standard. I ratti assegnati al gruppo "dieta normale" o "*ad libitum*" sono stati invece nutriti tutti i giorni con una dieta standard. L'acqua era sempre a disposizione di tutti i sottogruppi.

3.4 Ecocardiografia

La valutazione ecocardiografica è stata eseguita in M-mode a 4 settimane dall'operazione chirurgica (eco basale) e ripetuta alla fine dello studio (eco finale) usando un ecocardiografo per piccolo animale (*VisualSONICS VeVo 770 imaging system*) con una sonda 716. I ratti sono stati anestetizzati con infusione di isofluorano al 2% durante la procedura.

Le misurazioni ecocardiografiche comprendevano: frazione d'eiezione (FE), frazione di accorciamento (FS), parete anteriore del ventricolo sinistro in sistole (LVAWs) ed in diastole (LVAWd), parete posteriore del ventricolo sinistro in sistole (LVPWs) ed in diastole (LVPWd), diametro interno del ventricolo sinistro in sistole (LVIDs) e diastole (LVIDd).

3.5 Emodinamica cardiaca

Alla fine del protocollo di studio tutti gli animali sono stati sottoposti a valutazione invasiva della funzione cardiaca in vivo. I ratti sono stati anestetizzati con isofluorano al 2% ed un micromanometro da 2-0 French è stato gentilmente introdotto nel ventricolo sinistro attraverso l'arteria carotide sinistra per la valutazione della contrattilità basale. A questo punto è stato utilizzato un accesso venoso attraverso la vena giugulare esterna destra per la somministrazione di isoproterenolo, un farmaco simpatico-mimetico attivo sui β -AR, dotato di effetti inotropo positivo e cronotropo positivo.

I dati sono stati registrati anche dopo infusione massima di isoprotenerolo (333 ng/kg/peso corporeo).

I dati pressori del ventricolo sinistro sono stati analizzati attraverso il “Power-Lab system” (Colorado Springs, CO) dotato di apposito software per la valutazione della massima e minima derivata prima di aumento della pressione nel tempo (rispettivamente $LV +dP/dt$ e $LV -dP/dt$) e la frequenza cardiaca.

3.6 Western Blotting

Le frazioni tissutali di cuore sono state ottenute come precedentemente citato (26). Il protocollo per l'estrazione delle proteine di membrana prevedeva la lisi del tessuto cardiaco in uno specifico buffer (saccarosio 0,25 M, tris HCl pH 7.2 10 Mm, EDTA 1Mm ed inibitori di proteasi), successivamente le proteine di membrana sono state separate dal citosol mediante l'utilizzato dell'ultracentrifuga (45.000rpm per 20'). Le proteine di membrana così ottenute, sono state separate mediante elettroforesi su SDS/PAGE e trasferite su membrana di PVDF.

Sono stati valutati i livelli proteici cardiaci di membrana dei recettori β 1-AR è (Ab anti- β 1-AR Thermo Scientifici) e i livelli della proteina GRK2 (sc-562 della Santa Cruz Biotechnology).

Le proteine sono state visualizzate mediante una reazione di chemiluminescenza con anticorpi secondari coniugati a perossidasi di rafano. L'analisi densitometrica delle bande proteiche è stata praticata mediante acquisizione delle immagini con il trans-illuminatore Chemidoc della Biorad e analizzate con un software di quantizzazione dedicato (QUANTITY ONE 1-D ANALYSIS SOFTWARE).

3.7 Immunofluorescenza

Per la valutazione dell'innervazione cardiaca è stato seguito un particolare protocollo di immunofluorescenza; è doveroso sottolineare che il presente protocollo è attualmente utilizzato per la diagnosi di neuropatie sensitive e/o autonome e per la valutazione della degenerazione e rigenerazione delle fibre nervose nell'uomo. Inoltre, è inserito nelle linee guida per la diagnosi delle neuropatie delle piccole fibre. (50). Tale procedura permette, in modo molto accurato, di valutare quantitativamente l'innervazione cardiaca sia delle fibre simpatiche che parasimpatiche.

I campioni di apice ventricolare prelevati dal cuore sono stati fissati in acido picrico e formaldeide (soluzione Zamboni), conservati a 4°C per circa 8 h e successivamente fissati a 4°C in PBS 0.1 M (pH 7.4) saccarosio al 20%. Il tessuto così fissato è stato incluso in OCT e tagliato in sezioni consecutive di 50- μ m utilizzando un apposito microtomo a slitta (Leica 2000R, Germany). Le sezioni così ottenute, sono state trattate con 5% di siero d'asina (NDS-Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) 0.3% Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO, USA) in PBS 0.1 M (pH 7.4) e incubate overnight con specifici anticorpi primari: dopamina β -hydroxylase ($\delta\beta$ h anti- mouse IgG- AbD Serotec 3960-0506) come marcatore delle fibre adrenergiche, vesicular acetylcholine transporter (VaChT anti- goat IgG- Poenix PHArmaceuticals, INC. H- V007) come marcatore delle fibre colinergiche e protein gene product 9.5 (PGP 9.5 anti- rabbit IgG- Spring Bioscience E3344) come marcatore pan- neuronale. Dopo tre lavaggi con 1% NDS in 0.1 M PBS con 0.3% Triton X-100, le sezioni sono state incubate overnight con anticorpi secondari specie specifici coniugati ad opportuni fluorofori cyanine-3, cyanine-2 e cyanine-5 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Successivamente montate su vetrini copri- oggetto tramite agarosio tipo VII (Sigma), deidratate mediante passaggi seriali in alcool, schiarite in

metilsalicilato e montate su vetrini porta- oggetto mediante DPX. Le sezioni infine, sono state acquisite utilizzando un microscopio non-laser confocale (Apotome confocal system; Zeiss, Oberkochen, Germany) e selezionate tre sezioni random per ogni campione e per ciascuna di essa sono state individuate cinque aree per ciascuna superficie della sezione. Successivamente, veniva sovrapposta ad ogni singola immagine acquisita una griglia squadrata di ventiquattro probes (*dimensioni: 1cm x 1cm*) opportunamente distanziati tra loro e, la densità d'innervazione è stata calcolata come numero di fibre nervose per millimetro quadrato (fibre/ mm²).

3.8 Valutazione istologica della fibrosi

Al termine del trattamento, ovvero un anno dopo l'infarto, i ratti sono stati sacrificati, i cuori escissi, pesati e tagliati lungo l'asse corto; la metà apicale è stata conservata per le successive indagine molecolari, mentre la parte basale è stata rapidamente fissata in paraformaldeide al 4% per 24h e inclusa successivamente in paraffina per l'analisi istologica. I campioni così preparati sono stati sottoposti a taglio con microtomo ottenendo sezioni dello spessore di 3µm.

Per la valutazione dell'area fibrotica le sezioni di ventricolo sinistro sono state colorate mediante la colorazione Tricromica di Masson (Masson Tricromica Goldner, Bio-optica), seguendo le istruzioni del produttore. Tale colorazione evidenzierà in nero i nuclei, in rosso citoplasma e fibre muscolari e in verde il collagene.

Dopo la colorazione le sezioni sono state montate ed acquisite con un microscopio Eclipse 1000 (Nikon, Milano) con un obiettivo 20X.

La fibrosi interstiziale è stata valutata usando un software dedicato, NisElements BR, tutte le aree verdi (fibrotiche) sono state selezionate ed espresse come percentuale sul totale dell'area.

3.9 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando il test “one-way ANOVA”, seguito da analisi *post hoc* di “Bonferroni”. E' stata considerata significativa una $p < 0.05$.

Tutti i dati quantitativi sono espressi come media \pm errore standard, i dati relativi alle variabili qualitative sono stati espressi come valori percentuali.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Graphpad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RISULTATI

4.1 Effetti della RC sul peso corporeo e sul peso del cuore.

La valutazione del peso corporeo è stata effettuata prima della randomizzazione (tempo 0), dopo 6 mesi dall'inizio del trattamento dietetico (tempo 6) e alla fine dello studio sperimentale, 12 mesi dopo l'inizio della dieta (tempo 12). Già 6 mesi dopo l'inizio del protocollo dietetico, il peso corporeo del gruppo di animali scompensati trattati con dieta a RC risultava statisticamente minore del peso del gruppo di animali scompensati alimentati con dieta ad libitum ($p < 0.0001$). Tale risultato era confermato alla fine dello studio, circa 12 mesi dall'inizio del protocollo dietetico ($p < 0.0001$) (Fig 1 a,b).

Il peso corporeo degli animali sham risultava significativamente aumentato ($p < 0.0001$) rispetto agli animali scompensati a dieta ristretta alla fine del periodo di studio (12 mesi dopo l'inizio del trattamento dietetico). Al termine dello studio è stato inoltre valutato il peso del cuore (HW) nei 3 gruppi sperimentali (Fig 1 c). Il peso del cuore degli animali alimentati con dieta normale era aumentato in maniera significativa nel gruppo degli animali scompensati rispetto agli sham, come già descritto dal nostro gruppo di ricerca ($p < 0.001$). Inoltre, il peso del cuore degli animali scompensati trattati con dieta a restrizione calorica, risultava significativamente ridotto rispetto al gruppo alimentato con dieta ad libitum ($p < 0.01$) (Fig 1 c). Il rapporto peso del cuore/lunghezza della tibia negli animali trattati con dieta normale, era significativamente aumentato in quelli scompensati rispetto agli sham ($p < 0.001$). Nel gruppo degli animali scompensati, quelli a dieta ristretta mostrano una significativa diminuzione del rapporto peso del cuore/lunghezza della tibia rispetto agli animali a dieta normale ($p < 0.05$) (Fig 1 d).

Abbiamo inoltre riscontrato una significativa correlazione (Fig. 2 e) tra il peso del cuore ed il peso corporeo degli animali scompensati (a dieta normale e ristretta) ($R^2=0.6546$, $p<0.0001$) che suggerisce come in un modello di scompenso cardiaco post-ischemico la diminuzione del peso corporeo grazie ad una dieta ristretta sia in grado di determinare una consensuale diminuzione del peso del cuore.

4.2 Effetti della restrizione calorica sulla funzione cardiaca valutata con ecocardiografia

La valutazione ecocardiografica è stata effettuata a 4 settimane dall'operazione chirurgica (ecocardiografia basale), infarto del miocardio e operazione sham, allo scopo di determinare il grado di scompenso cardiaco e di randomizzare gli animali nei gruppi di trattamento dietetico (Fig.3 a-c). Gli animali scompensati mostravano una significativa riduzione della funzione cardiaca (diminuzione della FE) e un significativo aumento dei diametri ventricolari (incremento del LVIDd e del LVIDDs) rispetto agli animali sham ($p<0.001$). Gli animali sham operati, come atteso, mostravano una conservata funzione cardiaca (FE e LVIDd nella norma).

Dopo 12 mesi di trattamento, le misurazioni ecocardiografiche sono state ripetute allo scopo di valutare gli effetti della dieta sulla funzione cardiaca (Fig 3 d-f). Nel gruppo di ratti scompensati a dieta normale si evidenziava, come atteso, un peggioramento della funzione cardiaca rispetto alla rilevazione basale, con un'ulteriore diminuzione della frazione d'eiezione e un ulteriore aumento del diametro diastolico del ventricolo sinistro rispetto agli animali sham a dieta normale ($p<0.0001$).

Nel gruppo di ratti scompensati nutriti con un regime dietetico ristretto si osserva, invece, una minore dilatazione del ventricolo sinistro in sistole ed in diastole rispetto al gruppo di ratti scompensati a dieta normale ($p < 0.05$).

4.3 Effetti della RC sulla contrattilità cardiaca basale e dopo massima stimolazione adrenergica

Al termine del periodo di studio tutti gli animali sono stati sottoposti ad emodinamica cardiaca per la valutazione della contrattilità del ventricolo sinistro in condizioni basali e dopo massima stimolazione adrenergica isoproterenolo indotta. I dati ottenuti mostravano, come atteso, una significativa riduzione della contrattilità cardiaca e della riserva inotropa, nel gruppo dei ratti scompensati rispetto al gruppo di ratti sham, espressa come diminuzione del $+dP/dt$ max ed aumento del $-dP/dt$ max (Fig 4 a e b). Di maggiore interesse è stato il riscontro del significativo miglioramento della contrattilità cardiaca, osservato nel gruppo dei ratti scompensati sottoposti a restrizione calorica rispetto a quelli a dieta normale, dopo somministrazione di isoproterenolo, a dimostrazione del parziale ripristino della riserva inotropa ($p < 0.05$) (Fig 4 a e b). A conferma di quanto evidenziato, tali risultati sono stati supportati dai successivi dati molecolari, come mostrato in seguito.

4.4 Effetto della RC sull'espressione proteica dei recettori β 1-AR e della chinasi GRK2 nel cuore.

Campioni di tessuto miocardico prelevati dal ventricolo sinistro sono stati processati per l'estrazione delle membrane plasmatiche e la valutazione dei livelli di espressione del recettore β 1-AR, tramite metodica Western Blotting. (Fig 5).

I risultati ottenuti mostravano, in primo luogo, come già evidenziato dal nostro gruppo e riportato in letteratura, una significativa riduzione dei livelli di espressione dei recettori β 1-AR di membrana nei ratti scompensati rispetto agli sham ($p < 0.05$) (Fig 5a,b). Di maggiore importanza, invece, il significativo ripristino dell'espressione di tali recettori riscontrato nei ratti sottoposti a restrizione calorica rispetto a quelli alimentati con dieta *ad libitum*, in accordo con quanto evidenziato dai dati emodinamici. Inoltre, al fine di comprendere i meccanismi coinvolti nella *down regulation* dei β 1-AR e l'eventuale ruolo della chinasi GRK2, così come dimostrato in precedenti studi sullo scompenso cardiaco, si sono valutati i livelli di membrana di tale proteina, tramite Western Blotting. I dati ottenuti evidenziavano un significativo aumento dei livelli proteici di GRK2 di membrana nei ratti scompensati a dieta normale, rispetto al gruppo di animali sham. Infine, si assisteva ad una parziale riduzione dei livelli di GRK2 (non statisticamente significativa) nei ratti RC rispetto agli scompensati a dieta normale, risultati comunque in linea con l'andamento dell'espressione dei recettori β 1. (Figura 6)

4.5 Effetto della RC sull'innervazione cardiaca

Per la valutazione dell'innervazione cardiaca sono state processate sezioni di apice, seguendo un protocollo di immunofluorescenza che prevedeva l'utilizzo del $\text{d}\beta\text{h}$, marcatore specifico delle fibre nervose adrenergiche (Fig 7), del VaChT, specifico per le fibre nervose colinergiche (Fig 8) e del PGP 9.5, marcatore generico neuronale (Fig 9). Tale procedura, come precedentemente descritto, consentiva una accurata valutazione quantitativa dell'innervazione.

L'osservazione al microscopio confocale evidenziava una marcata riduzione delle fibre nervose adrenergiche (Fig 7,d) e colinergiche (Fig 8,d) nei ratti con SC rispetto ai ratti sham-operati ($p < 0,001$). Gli animali che avevano seguito un regime alimentare ristretto presentavano, invece, un aumento significativo ($p < 0,001$) del numero delle fibre adrenergiche rispetto agli animali scompensati alimentati con dieta *ad libitum*. Anche la conta delle fibre colinergiche, negli animali sottoposti a restrizione calorica (Fig 8), mostrava un lieve aumento, seppur non statisticamente significativo rispetto ai ratti scompensati a dieta normale.

4.6 Effetto della RC sulla fibrosi cardiaca.

La fibrosi interstiziale cardiaca è stata valutata su sezioni di ventricolo sinistro, allestite con colorazione Tricromica di Masson.

Le immagini rappresentative e le relative quantizzazioni dei 3 gruppi di studio riportate nella Figura 10 confermavano un aumento significativo ($p < 0,005$) della fibrosi interstiziale (~20%) nel gruppo degli scompensati alimentati con dieta *ad libitum*, rispetto agli Sham-operati. Interessante è il dato ottenuto nel gruppo degli scompensati sottoposti a restrizione calorica, nei quali si osservava una importante e significativa ($p < 0,005$) riduzione della fibrosi interstiziale.

5. DISCUSSIONE

Lo SC è una delle patologie croniche maggiormente diffuse nel mondo ed una delle principali causa di mortalità nei Paesi occidentali (1-3). Tale patologia è una sindrome clinica caratterizzata dalla diminuzione della funzione ventricolare sinistra e da modificazioni bioumorali tra cui è importante ricordare l'iperattività simpatica caratterizzata dall'incremento dei livelli di CA circolanti(1,5,8). Nonostante i miglioramenti diagnostici e terapeutici degli ultimi anni nel campo cardiologico, la prevalenza e l'incidenza dello SC continuano ad essere elevate(3). L'ipertono simpatico rappresenta inizialmente un processo di adattamento rivolto a compensare la riduzione della performance cardiaca; tuttavia, il cronico incremento delle CA plasmatiche si associa ad una marcata disregolazione dei β -AR cardiaci sia a livello recettoriale che post-recettoriale(8). L'incremento dell'espressione della G-protein coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) risulta avere un ruolo chiave nell'induzione della disfunzione dei β -AR(4,14). A livello cardiaco l'iperattivazione adrenergica è responsabile di un danno strutturale caratterizzato da dilatazione ed ipertrofia delle camere ventricolari, necrosi focale, infiammazione ed aumento della deposizione di collagene con conseguente fibrosi interstiziale miocardica(5,8,27,28). Gli effetti biologici negativi della sostenuta iperstimolazione simpatica risultano evidenti anche a livello dei cardiomiociti con aumento del consumo di ossigeno e dell'apoptosi. L'inibizione di GRK2 a livello cardiaco sia tramite terapia genica che attraverso modelli transgenici, è stata dimostrata avere un ruolo benefico nello SC(4,13,14,16). Inoltre, recentemente Schumacher et al. hanno mostrato che l'inibizione di GRK2 tramite la paroxetina è in grado di migliorare la performance cardiaca in un modello di scompenso cardiaco post-ischemico(18).

È noto già da molti anni come la RC eserciti effetti benefici sul sistema cardiovascolare e sul profilo metabolico(19,20,29). Infatti, un trattamento preventivo con RC è in grado di rallentare il declino della performance del sistema cardiovascolare che si verifica dopo IM (29,30). È stato inoltre dimostrato in studi clinici che una dieta ipocalorica nello scompenso cardiaco cronico è in grado di aumentare la sopravvivenza dei pazienti obesi riducendo la dispnea e l'affaticamento(31-34). Nel corso degli anni sono stati dimostrati diversi meccanismi tramite i quali la RC esercita i suoi effetti benefici in pazienti anziani tra cui è importante segnalare la riduzione dell'incidenza di malattie associate all'età (cancro, diabete mellito e malattie renali), la riduzione della pressione arteriosa, del peso corporeo e delle concentrazioni di lipidi del siero(20,21,23,25,35). Un regime dietetico ristretto in pazienti obesi è in grado di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari e lo stato infiammatorio(19,21,24). I meccanismi molecolari attraverso cui la RC riesce a migliorare la prognosi dei pazienti con SC non sono però ancora del tutto noti.

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare gli effetti di un trattamento dietetico con RC sulla funzione cardiaca, sul signaling adrenergico e sull'innervazione in un modello animale (ratto) di SC post-ischemico.

Un anno di dieta a regime calorico ristretto induceva una significativa diminuzione del peso corporeo rispetto ad una dieta ad libitum sia nel gruppo di ratti scompensati che negli sham operati ($p < 0.01$). Nel gruppo di ratti scompensati sottoposti a RC le misurazioni ecocardiografiche eseguite alla fine del periodo di studio rivelavano un miglioramento anche se non significativo della funzione cardiaca sistolica e una riduzione significativa del diametro telediastolico del ventricolo sinistro rispetto al gruppo di ratti scompensati trattati con dieta normale. La valutazione emodinamica basale confermava il risultato ecocardiografico

evidenziando un miglioramento pur non significativo della contrattilità e del lusitropismo basale. Il cateterismo cardiaco, inoltre, mostrava un miglioramento significativo della contrattilità cardiaca, isoproterenolo-indotta (+dP/dt e -dP/dt), negli animali SC trattati con RC rispetto a quelli nutriti con dieta normale. Tale dato suggeriva un miglioramento della funzione dei recettori β -adrenergici cardiaci indotto dalla restrizione calorica. Infatti, nel gruppo di ratti con SC a dieta normale si assisteva ad una notevole riduzione dell'espressione dei recettori β 1-AR sulle membrane estratte da cuori rispetto al gruppo sham. Di grosso interesse, la restrizione calorica induceva una normalizzazione dell'espressione di tali recettori che era sovrapponibile a quella osservata negli animali sham.

Questo risultato è di particolare importanza poiché numerosi studi, nel corso degli ultimi anni, hanno descritto come in modelli di invecchiamento fisiologico la RC contrasti l'attivazione neuro-ormonale ed in particolare, riduca i livelli di catecolamine circolanti che sono noti avere un ruolo patogenetico importante nello sviluppo dello scompenso cronico nell'uomo ed in diversi modelli animali di tale sindrome(35-37).

In linea con i dati funzionali sulla contrattilità cardiaca, precedentemente esposti, si evidenziava, inoltre, un importante aumento dell'innervazione adrenergica nel gruppo di ratti a dieta ristretta ed una notevole riduzione della fibrosi miocardica, con conseguente miglioramento della performance cardiaca.

6. CONCLUSIONI

I nostri dati suggeriscono che in un modello sperimentale di SC la RC, iniziata dopo l'infarto del miocardio, determina la riduzione della fibrosi miocardica, l'aumento dell'innervazione adrenergica cardiaca ed il ripristino dei livelli di espressione dei recettori β 1-AR, con consensuale miglioramento della funzione cardiaca e della riserva inotropica.

Il presente studio individua perciò un nuovo meccanismo molecolare che possa spiegare gli effetti benefici della RC sulla riduzione dell'iperattivazione del sistema nervoso simpatico nello scompenso cardiaco cronico e suggerisce che la RC può esercitare un'azione benefica sul signaling cardiaco dei β 1-AR recettori, potenzialmente complementare a quella di altri interventi farmacologici come i β -bloccanti e l'esercizio fisico(26,38-40). L'utilità di questo trattamento può essere particolarmente evidente nei soggetti con numerosi fattori di rischio cardiovascolare e comorbilità quali i pazienti ultrasessantacinquenni(2).

La RC, come da noi dimostrato, migliora infatti la funzione contrattile e la riserva inotropica del ventricolo sinistro, consolidando ulteriormente la convinzione che una dieta ipocalorica possa essere utile soprattutto nei pazienti affetti da una patologia cardiovascolare come lo scompenso cardiaco cronico particolarmente frequente nella popolazione anziana.

7. FIGURE E TABELLE



Figura 1. Disegno dello studio. La durata complessiva dello studio è stata di 13 mesi.

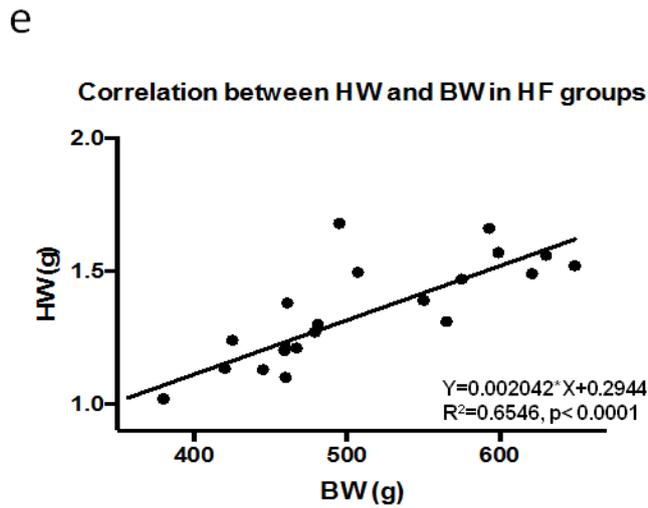
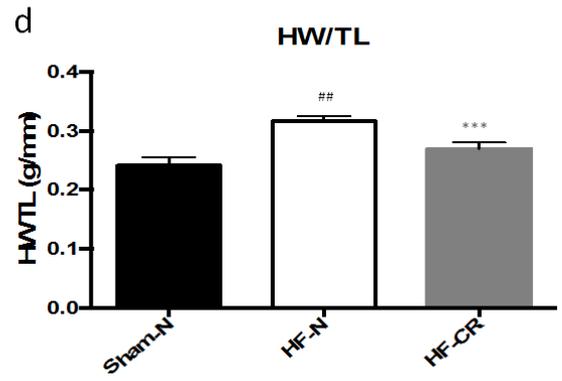
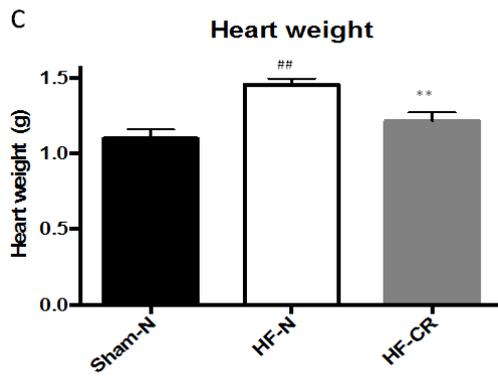
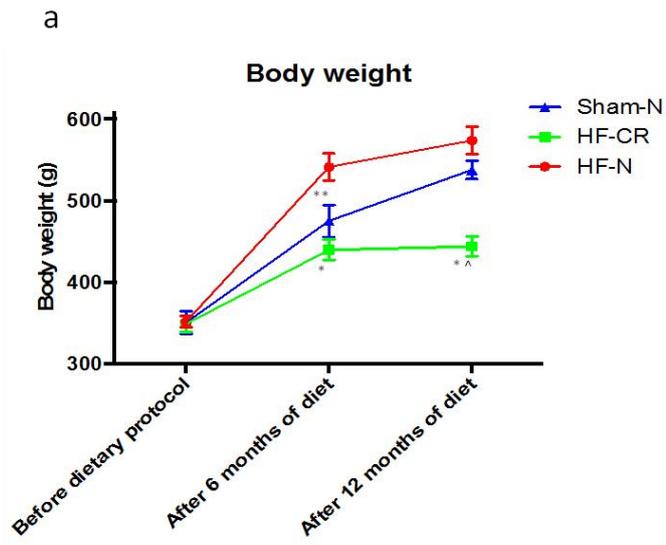


Figura 2. a, Peso corporeo (BW) durante il trattamento dietetico: la flow-chart mostra le variazioni del peso corporeo dei gruppi in studio a 0, 6 e 12 mesi dall'inizio del protocollo dietetico. **b,** Immagine rappresentativa dei ratti dei gruppi HF-N (a destra) e HF-RC (a sinistra) alla fine del periodo di studio (12 mesi dopo l'inizio del trattamento dietetico). **c,** misurazione del peso del cuore (HW). **d,** peso del cuore normalizzato per la lunghezza della tibia (HW/TL). **e,** Grafico che mostra la diretta correlazione tra il peso del cuore ed il peso corporeo nei gruppi scompensati: HF-N e NF-RC. n = 10 to 13 per gruppo, effettuata mediante regressione lineare. I dati sono presentati come Media±Errore standard. *p<0.0001 vs HF-N, **p<0.01 vs HF-N, ***p<0.05 vs HF-N #p<0.01 vs Sham-N, ##p< 0.001 vs Sham-N, ^p<0.0001 vs Sham-N. Nei pannelli A, C, D è stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA ad una o due vie con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi.

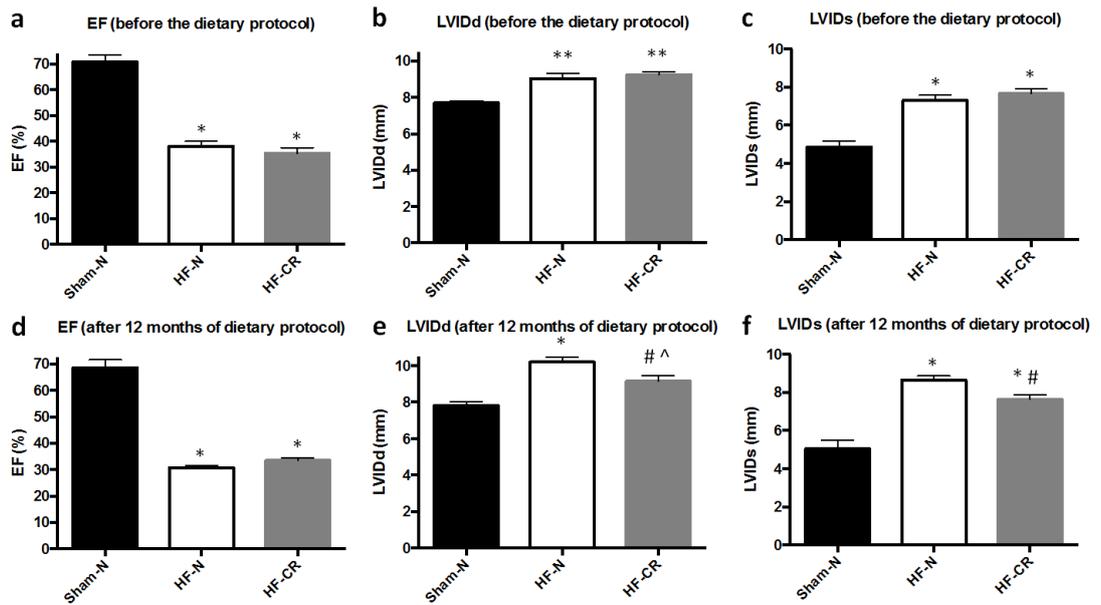


Figura 3. Frazione di eiezione (EF), Diametro interno del ventricolo sinistro in diastole (LVIDd) e systole (LVIDs) (**a, b, c**) misurati con l'Ecocardiografia prima dell'inizio del protocollo dietetico (4 settimane dopo l'infarto del miocardio). EF (**d**), LVIDd (**e**) and LVIDs (**f**) misurati con l'Ecocardiografia alla fine dello studio (12 mesi dopo l'inizio del protocollo dietetico) n = 6 to 11 per gruppo. I dati sono presentati come Media±Errore standard. * p<0.0001 vs SH-N, **p<0.001 vs SH-N, #p<0.05 vs HF-N, ^p<0.05 vs SH-N. È stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA ad una con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi

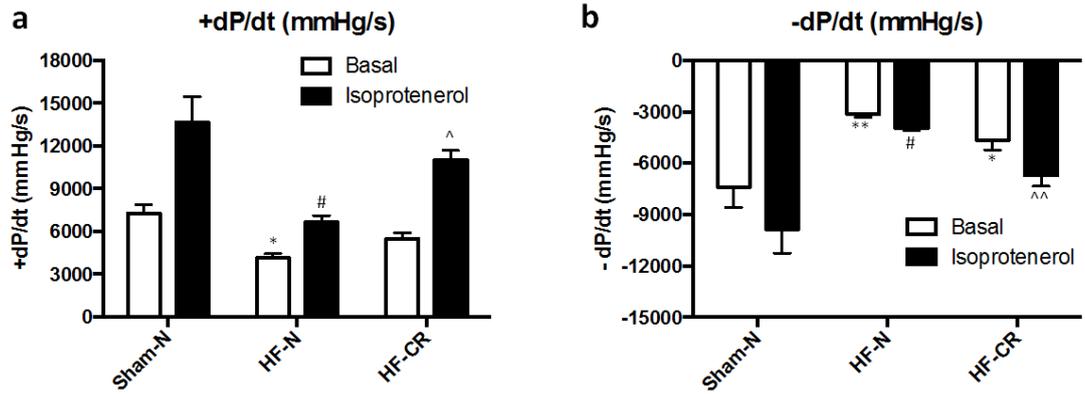


Figure 4. Valutazione emodinamica della contrattilità cardiaca e della riserva inotropica. Media dei valori del LV +dP/dt (a) e del LV -dP/dt (b) nei 3 gruppi sperimentali (Sham-N, n=5; HF-N, n=7; HF-CR, n=6) valutati in condizioni basali e dopo stimolazione massimale con isoproterenolo (ISO). I dati sono presentati come Media±Errore standard. *p<0.5 vs Sham-N in condizioni basali, **p<0.001 vs Sham-N in condizioni basali, #p<0.0001 vs Sham-N dopo ISO, ^p<0.001 vs HF-N dopo ISO, ^^p<0.5 vs Sham-N and HF-N dopo ISO. È stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA a due vie con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi.

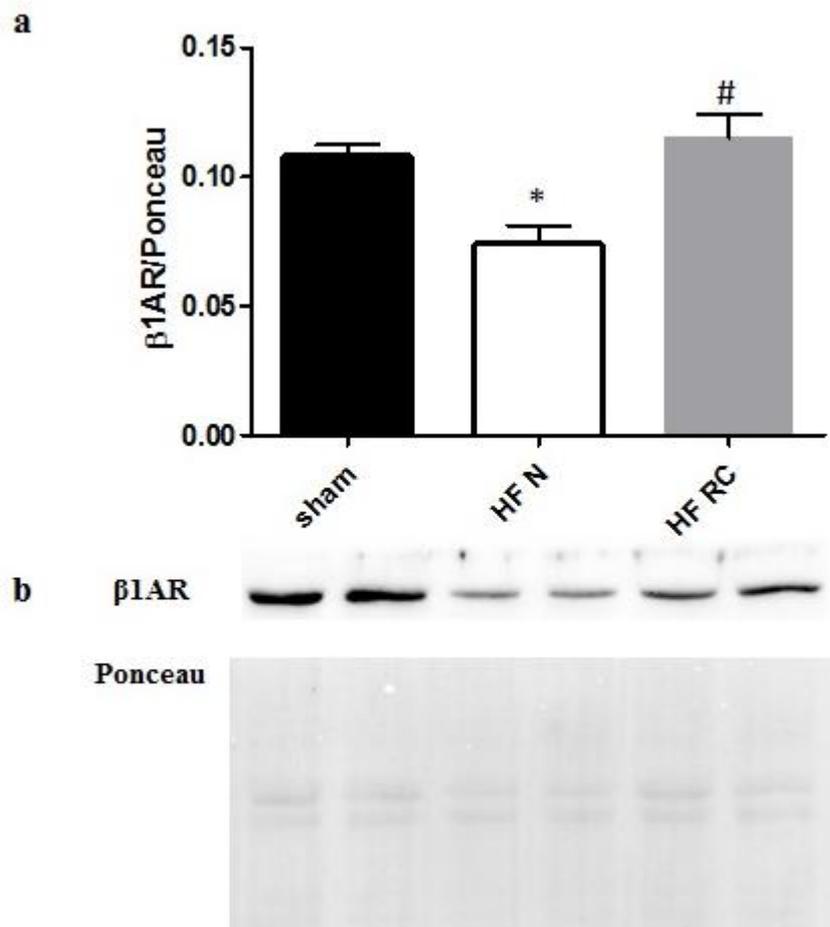


Figura 5. Valutazione dei livelli di espressione proteici del recettore $\beta 1-AR$ sulle membrane dei cardiomiociti del ventricolo sinistro. (a) Analisi quantitativa densitometrica media dei western blots **(b)** western blot rappresentativo. I valori densitometrici sono stati normalizzati per il totale delle proteine caricate per ogni campione. I dati sono presentati come Media \pm Errore standard. È stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA ad una via con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi.

* $p < 0.05$ vs SC N; # $p < 0,05$ vs HF N.

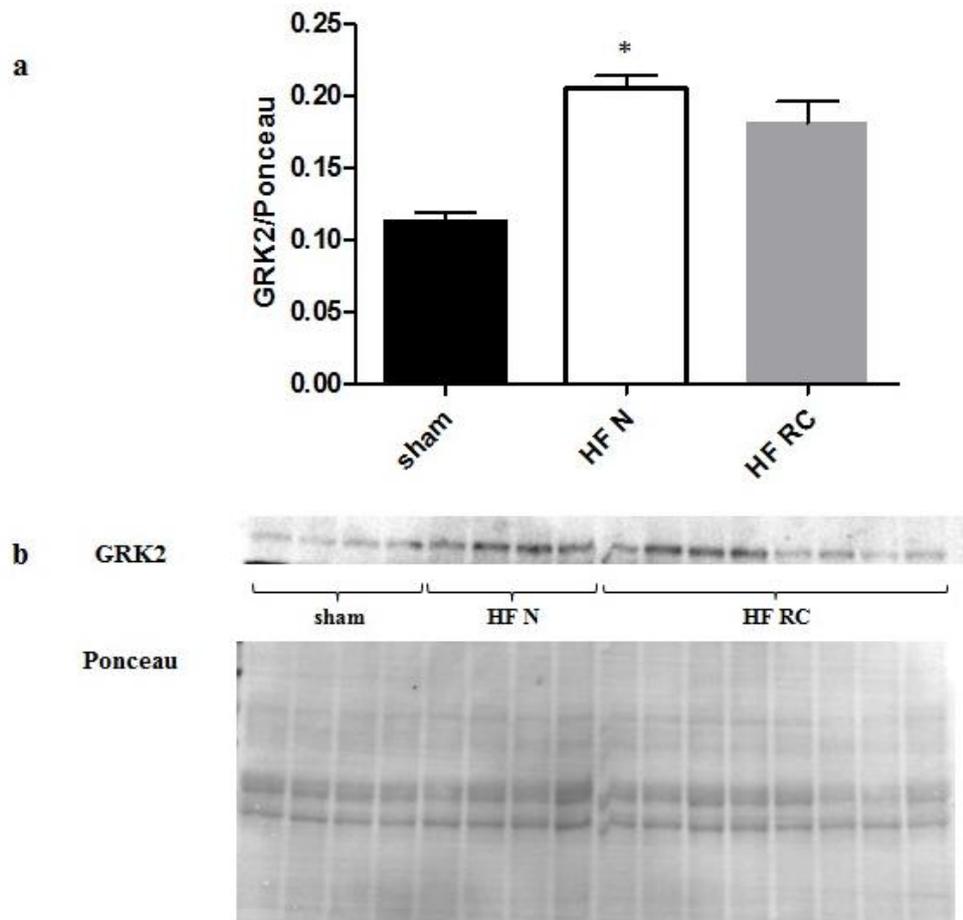


Figura 6. Valutazione dei livelli di espressione proteici della chinasi GRK2 sulle membrane dei cardiomiociti del ventricolo sinistro. (a) Analisi quantitativa densitometrica media dei western blots (b) western blot rappresentativo. I valori sensitometrici sono stati normalizzati per il totale delle proteine caricate per ogni campione. I dati sono presentati come Media \pm Errore standard. È stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA ad una via con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi.

* $p < 0.05$ vs SC N;

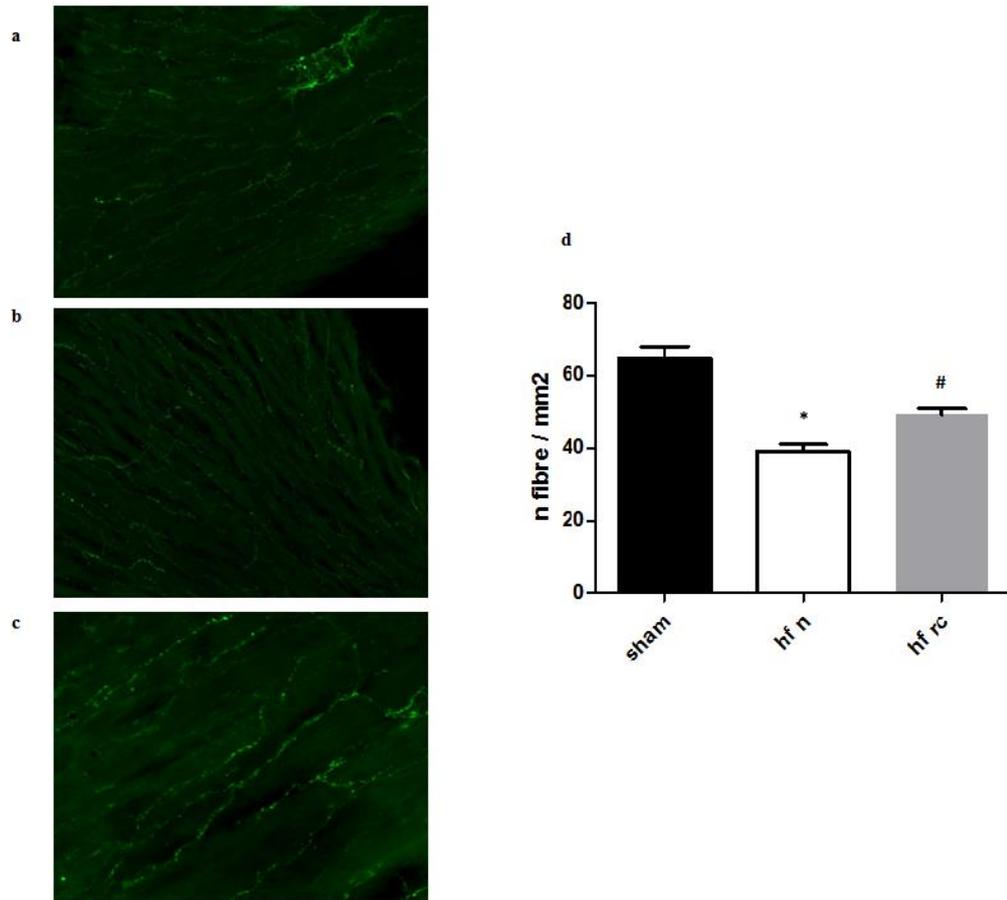


Figura 7. Valutazione dell'innervazione adrenergica mediante immunofluorescenza su sezioni di apice.

Immagini rappresentative dei tre gruppi di studio (a) gruppo sham-operato;(b) gruppo scompensato a dieta normale (HF N); (c) gruppo scompensato a dieta ristretto (HF RC). Come marcatore delle fibre adrenergiche è stato utilizzato un anticorpo primario anti- dopamina β -hydroxylase (d β h anti- mouse IgG- AbD Serotec 3960-0506).

d) Istogramma rappresentativo della innervazione miocardica espressa come numero di fibre per mm². I dati sono presentati come Media \pm Errore standard. È stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA ad una via con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi.* p<0.0001 vs Sham; # p<0.0001 vs HF N.

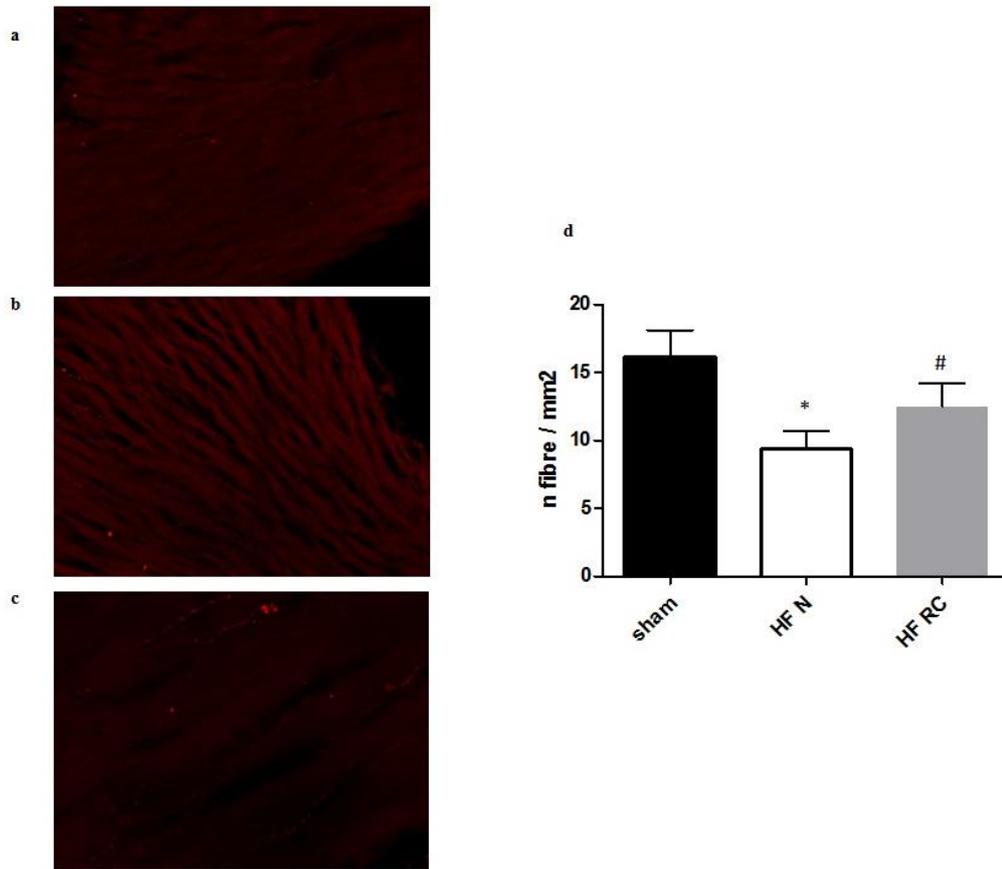


Figura 8. Valutazione dell'innervazione colinergica mediante immunofluorescenza su sezioni di apice.

Immagini rappresentative dei tre gruppi di studio a) gruppo sham-operato; b) gruppo scompensato a dieta normale (HF N); c) gruppo scompensato a dieta ristretto (HF RC). Come marcatore delle fibre adrenergiche è stato utilizzato un anticorpo primario anti-vesicular acetylcholine transporter (VaChTanti- goat IgG- Poenix Pharmaceuticals. d) Istogramma rappresentativo della innervazione miocardica espressa come numero di fibre per mm². I dati sono presentati come Media±Errore standard. È stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA ad una via con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi.* p<0.0001 vs Sham; # p<0.0001 vs HF N.

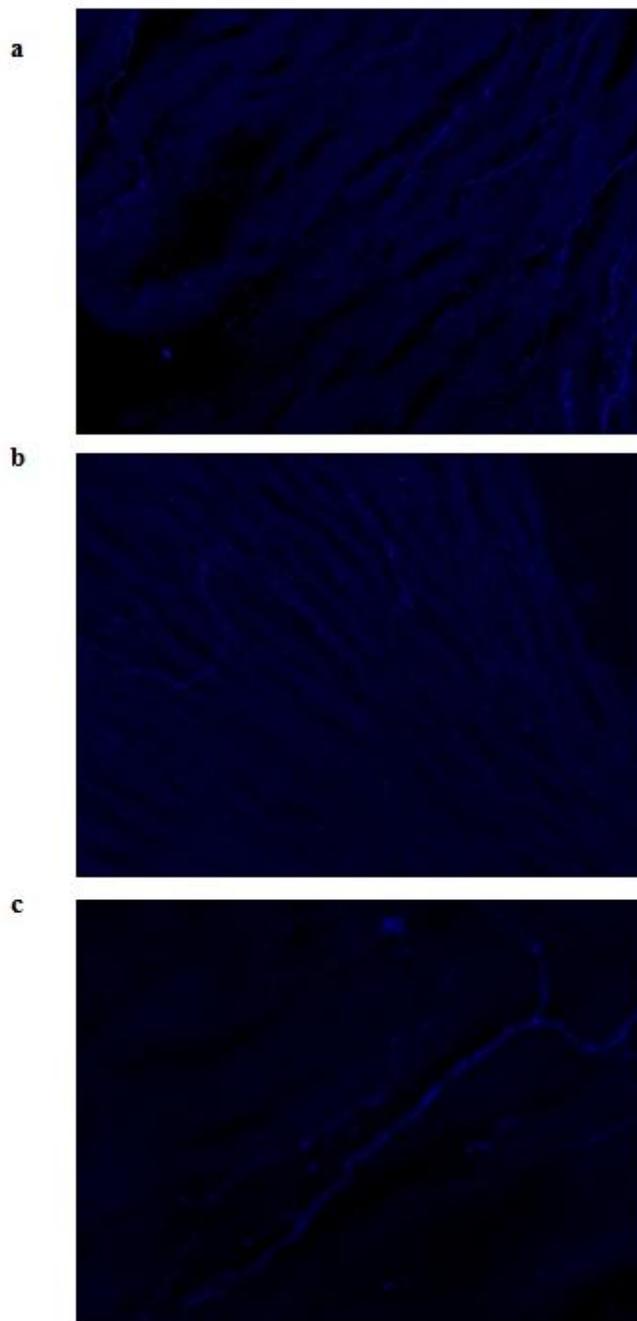


Figura 9. Valutazione dell'innervazione cardiaca mediante immuno-fluorescenza su sezioni di apice.

Immagini rappresentative dei tre gruppi di studio a) gruppo sham-operato; b) gruppo scompensato a dieta normale (HF N); c) gruppo scompensato a dieta ristretto (HF RC). Come marcatore pan- neuronale è stato utilizzato un anticorpo primario protein gene product 9.5 (PGP 9.5 anti- rabbit IgG- Spring Bioscience E3344).

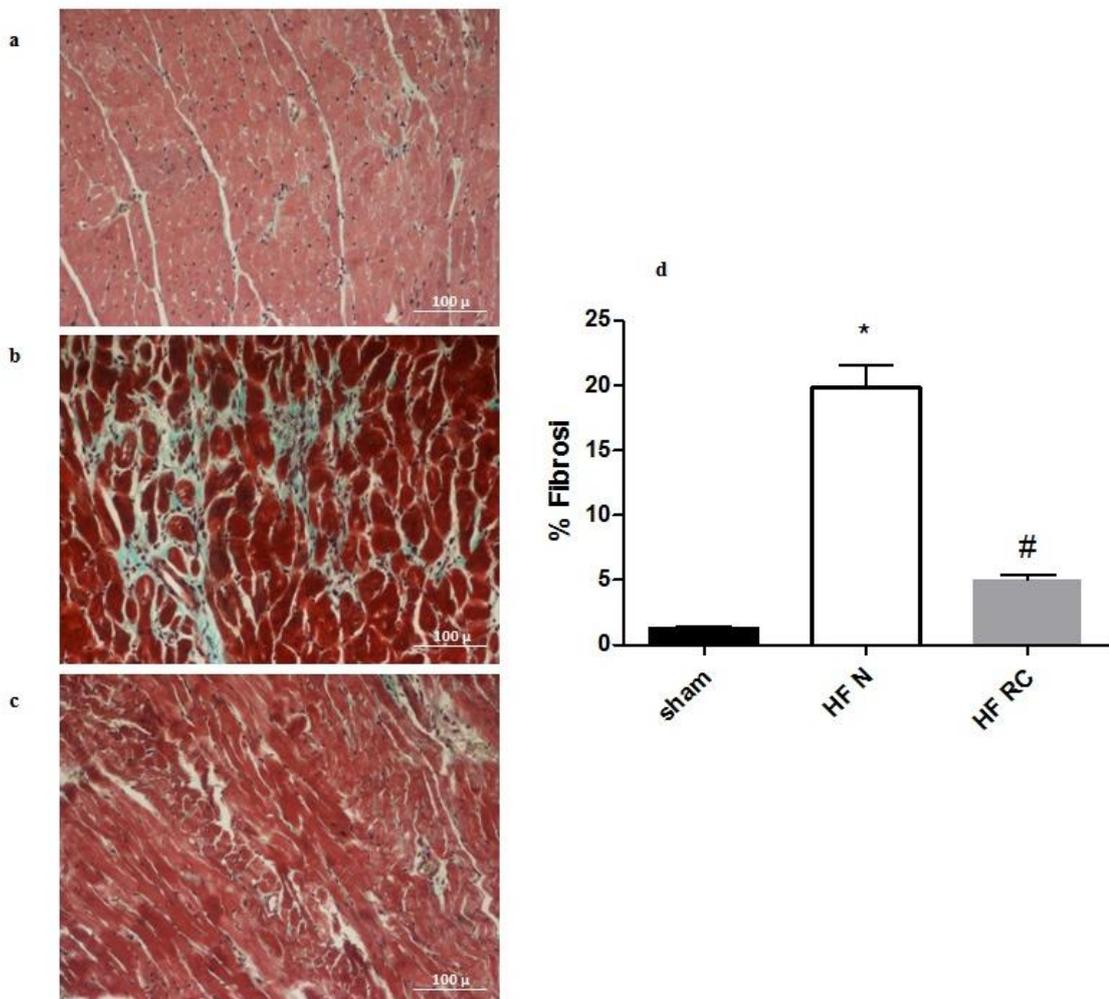


Figura 10. Valutazione istologica dell'area fibrotica mediante colorazione Tricromica di Masson su sezioni di ventricolo sinistro.

a) gruppo sham-operato; b) gruppo scompensato a dieta normale (HF N); c) gruppo scompensato a dieta ristretto (HF RC); d) Istogramma rappresentativo della fibrosi miocardica espressa come area percentuale su area totale. I dati sono presentati come Media±Errore standard. È stata utilizzata un'analisi di tipo ANOVA ad una via con correzione di Bonferroni, tra tutti i gruppi. * $p < 0.0001$ vs Sham; # $p < 0.0001$ vs HF N.

8. BIBLIOGRAFIA

(1) Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009 Apr 14;119(14):e391-479.

(2) Rengo F, Leosco D, Iacovoni A, Rengo G, Golino L, Borgia F, et al. Epidemiology and risk factors for heart failure in the elderly. *Ital Heart J* 2004 Dec;5 Suppl 10:9S-16S.

(3) McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012 Jul;33(14):1787-1847.

(4) Rengo G, Lympelopoulos A, Leosco D, Koch WJ. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011 May;50(5):785-792.

(5) Rengo G, Perrone-Filardi P, Femminella GD, Liccardo D, Zincarelli C, de Lucia C, et al. Targeting the beta-adrenergic receptor system through G-protein-coupled receptor kinase 2: a new paradigm for therapy and prognostic evaluation in heart failure: from bench to bedside. *Circ Heart Fail* 2012 May 1;5(3):385-391.

- (6) Ferrara N, Davia K, Abete P, Rengo F, Harding SE. Alterations in beta-adrenoceptor mechanisms in the aging heart. Relationship with heart failure. *Aging (Milano)* 1997 Dec;9(6):391-403.
- (7) Ferrara N, Komici K, Corbi G, Pagano G, Furgi G, Rengo C, et al. Beta-Adrenergic Receptor Responsiveness in Aging Heart and Clinical Implications. *Front Physiol* 2014 Jan 9;4:396.
- (8) Lympopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res* 2013 Aug 30;113(6):739-753.
- (9) Brodde OE. Beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Fundam Clin Pharmacol* 2008 Apr;22(2):107-125.
- (10) Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 Sep;3(9):639-650.
- (11) Petrofski JA, Koch WJ. The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2003 Oct;35(10):1167-1174.
- (12) Raake PW, Vinge LE, Gao E, Boucher M, Rengo G, Chen X, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res* 2008 Aug 15;103(4):413-422.
- (13) Cannavo A, Liccardo D, Koch WJ. Targeting cardiac beta-adrenergic signaling via GRK2 inhibition for heart failure therapy. *Front Physiol* 2013 Sep 26;4:264.

- (14) Reinkober J, Tscheschner H, Pleger ST, Most P, Katus HA, Koch WJ, et al. Targeting GRK2 by gene therapy for heart failure: benefits above beta-blockade. *Gene Ther* 2012 Jun;19(6):686-693.
- (15) Rengo G, Lympopoulos A, Zincarelli C, Donniacuo M, Soltys S, Rabinowitz JE, et al. Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation* 2009 Jan 6;119(1):89-98.
- (16) Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, et al. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* 1995 Jun 2;268(5215):1350-1353.
- (17) Raake PW, Schlegel P, Ksienzyk J, Reinkober J, Barthelmes J, Schinkel S, et al. AAV6.betaARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur Heart J* 2013 May;34(19):1437-1447.
- (18) Schumacher SM, Gao E, Zhu W, Chen X, Chuprun JK, Feldman AM, et al. Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Sci Transl Med* 2015 Mar 4;7(277):277ra31.
- (19) Fontana L, Villareal DT, Weiss EP, Racette SB, Steger-May K, Klein S, et al. Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized, controlled trial. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 Jul;293(1):E197-202.

(20) Donati A, Recchia G, Cavallini G, Bergamini E. Effect of aging and anti-aging caloric restriction on the endocrine regulation of rat liver autophagy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008 Jun;63(6):550-555.

(21) Fontana L, Partridge L. Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell* 2015 Mar 26;161(1):106-118.

(22) Seymour EM, Parikh RV, Singer AA, Bolling SF. Moderate calorie restriction improves cardiac remodeling and diastolic dysfunction in the Dahl-SS rat. *J Mol Cell Cardiol* 2006 Oct;41(4):661-668.

(23) Marino G, Pietrocola F, Madeo F, Kroemer G. Caloric restriction mimetics: natural/physiological pharmacological autophagy inducers. *Autophagy* 2014;10(11):1879-1882.

(24) Renes J, Rosenow A, Roumans N, Noben JP, Mariman EC. Calorie restriction-induced changes in the secretome of human adipocytes, comparison with resveratrol-induced secretome effects. *Biochim Biophys Acta* 2014 Sep;1844(9):1511-1522.

(25) Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan DX, Reiter RJ. Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mech Ageing Dev* 2015 Mar 27;146-148C:28-41.

(26) Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc Res* 2008 May 1;78(2):385-394.

- (27) Hamdani N, Linke WA. Alteration of the beta-adrenergic signaling pathway in human heart failure. *Curr Pharm Biotechnol* 2012 Oct;13(13):2522-2531.
- (28) Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, Dell'oro R. Sympathetic activation in congestive heart failure: evidence, consequences and therapeutic implications. *Curr Vasc Pharmacol* 2009 Apr;7(2):137-145.
- (29) Wan R, Ahmet I, Brown M, Cheng A, Kamimura N, Talan M, et al. Cardioprotective effect of intermittent fasting is associated with an elevation of adiponectin levels in rats. *J Nutr Biochem* 2010 May;21(5):413-417.
- (30) Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* 2005 Nov 15;112(20):3115-3121.
- (31) Dolinsky VW, Morton JS, Oka T, Robillard-Frayne I, Bagdan M, Lopaschuk GD, et al. Calorie restriction prevents hypertension and cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 2010 Sep;56(3):412-421.
- (32) Dolinsky VW, Dyck JR. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2011 Nov;1812(11):1477-1489.
- (33) Zuber M, Kaeslin T, Studer T, Erne P. Weight loss of 146 kg with diet and reversal of severe congestive heart failure in a young, morbidly obese patient. *Am J Cardiol* 1999 Oct 15;84(8):955-6, A8.
- (34) Sankaralingam S, Abo Alrob O, Zhang L, Jaswal JS, Wagg CS, Fukushima A, et al. Lowering body weight in obese mice with diastolic heart failure improves cardiac

insulin sensitivity and function: implications for the obesity paradox. *Diabetes* 2015 May;64(5):1643-1657.

(35) Ribaric S. Diet and aging. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:741468.

(36) Gao E, Snyder DL, Roberts J, Friedman E, Cai G, Pelleg A, et al. Age-related decline in beta adrenergic and adenosine A1 receptor function in the heart are attenuated by dietary restriction. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Apr;285(1):186-192.

(37) Snyder DL, Gayheart-Walsten PA, Rhie S, Wang W, Roberts J. Effect of age, gender, rat strain, and dietary restriction, on norepinephrine release from cardiac synaptosomes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998 Jan;53(1):B33-41.

(38) Rengo G, Galasso G, Vitale DF, Furgi G, Zincarelli C, Golino L, et al. An active lifestyle prior to coronary surgery is associated with improved survival in elderly patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010 Jul;65(7):758-763.

(39) Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Filippelli A, Lymperopoulos A, Zincarelli C, et al. Exercise training and beta-blocker treatment ameliorate age-dependent impairment of beta-adrenergic receptor signaling and enhance cardiac responsiveness to adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Sep;293(3):H1596-603.

(40) Rengo G, Parisi V, Femminella GD, Pagano G, de Lucia C, Cannavo A, et al. Molecular aspects of the cardioprotective effect of exercise in the elderly. *Aging Clin Exp Res* 2013 Oct;25(5):487-497.

(41) Kapa S¹, DeSimone CV¹, Asirvatham SJ.

Innervation of the heart: An invisible grid within a black box. *Trends Cardiovasc Med*. 2016 Apr;26(3):245-57. doi: 10.1016/j.tcm.2015.07.001. Epub 2015 Jul 9.

- (42) Hopkins DA, Macdonald SE, Murphy DA, Armour JA. Pathology of intrinsic cardiac neurons from ischemic human hearts. *Anat Rec.* 2000 Aug 1;259(4):424-36.
- (43) Carrió I¹, Cowie MR, Yamazaki J, Udelson J, Camici PG. Cardiac sympathetic imaging with mIBG in heart failure. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2010 Jan;3(1):92-100. doi: 10.1016/j.jcmg.2009.07.014.
- (44) Cohn J.N, Ferrari R, Sharpe N Cardiac remodeling- concepts and clinical implications:a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling *JACC* 2000 Mar 1;35(3):569-82).
- (45) van Nieuwenhoven FA, Turner NA. The role of cardiac fibroblasts in the transition from inflammation to fibrosis following myocardial infarction. *Vascul Pharmacol.* 2013 Mar;58(3):182-8. doi: 10.1016/j.vph.2012.07.003. Epub 2012 Aug 3
- (46) Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res.* 2016 Mar 18;118(6):1021-40. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565. Review
- (47) D'Souza KM¹, Malhotra R, Philip JL, Staron ML, Theccanat T, Jeevanandam V, Akhter SA G protein-coupled receptor kinase-2 is a novel regulator of collagen synthesis in adult human cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* 2011 Apr 29;286(17):15507-16. doi: 10.1074/jbc.M111.218263. Epub 2011 Feb 25.

(48) Ahmet I¹, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M.

Effect of Caloric Restriction or Aerobic Exercise Training on Peak Oxygen Consumption and Quality of Life in Obese Older Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction A Randomized Clinical Trial. *Cardioprotection by intermittent fasting in rats. Circulation.* 2005 Nov 15;112(20):3115-21. Epub 2005 Nov 7

(49) Kitzman DW, Brubaker P, Morgan T, Haykowsky M, Hundley G, Kraus WE, Eggebeen J, Nicklas BJ

Effect of Caloric Restriction or Aerobic Exercise Training on Peak Oxygen Consumption and Quality of Life in Obese Older Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016 Jan 5;315(1):36-46. doi: 10.1001/jama.2015.17346.

(50) Lauria G¹, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, Nolano M, Merkies IS, Polydefkis M, Smith AG, Sommer C, Valls-Solé J; European Federation of Neurological Societies; Peripheral Nerve Society

European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol.* 2010 Jul;17(7):903-12, e44-9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03023.