

Terapie antiremodeling: nuove strategie e prospettive future nell'insufficienza cardiaca cronica post ischemica: Parte II

Anti remodeling therapy: new strategies and future perspective in post-ischemic heart failure. Part II

Andrea Salzano^{1*}, Domenico Sirico^{1*}, Michele Arcopinto², Alberto Maria Marra¹, Germano Guerra³, Aldo Rocca⁴, Alessandra Grieco¹, Francesco Giallauria¹, Carlo Vigorito¹

ABSTRACT: *Anti remodeling therapy: new strategies and future perspective in post-ischemic heart failure. Part II. A. Salzano, D. Sirico, M. Arcopinto, A.M. Marra, G. Guerra, A. Rocca, A. Grieco, F. Giallauria, C. Vigorito.*

In recent years, the remarkable progress achieved in terms of survival after myocardial infarction have led to an increased incidence of chronic heart failure in survivors. This phenomenon is due to the still incomplete knowledge we possess about the complex pathophysiological mechanisms that regulate the response of cardiac tissue to ischemic injury. These involve various cell types such as fibroblasts, cells of the immune system, endothelial cells, car-

diomyocytes and stem cells, as well as a myriad of mediators belonging to the system of cytokines and not only. In parallel with the latest findings on post-infarct remodeling, new potential therapeutic targets are arising to halt the progression of disease. After the evaluation of the results obtained from gene therapy and stem cells, in this part we evaluate micro-RNA, post-translational modification and microspheres based therapy.

Keywords: cardiac remodeling, gene therapy, stem cells, micro-RNA, microspheres, heart failure.

Monaldi Arch Chest Dis 2014; 82: 195-201.

¹ Department of Translational Medical Sciences, University Federico II, Naples, Italy.

² Department of Cardiac Surgery, IRCCS Policlinico San Donato, Milan, Italy.

³ Department of Medicine and Health Sciences, University of Molise, Campobasso, Italy.

⁴ Department of Clinical Medicine and Surgery, University of Naples "Federico II", Naples, Italy.

* These authors equally contributed.

Corresponding author: Andrea Salzano, MD; Department of Translational Medical Sciences; Federico II University of Naples; Via S. Pansini, 5; I-80131 Naples, Italy; Phone/Fax: +390817463492; E-mail address: andre.salzano@gmail.com

Introduzione

Grazie ai recenti miglioramenti delle tecniche di riperfusion coronarica e della terapia farmacologica dell'IMA, negli ultimi anni si è verificato un considerevole aumento della sopravvivenza dei pazienti con questa patologia, anche nei casi più severi [1, 2]. Contemporaneamente ciò ha determinato un aumento della morbilità nei pazienti sopravvissuti i quali, in un arco di tempo che va da pochi giorni a diversi mesi, spesso sviluppano disfunzione sistolica e/o diastolica di grado variabile, aritmie maggiori e sintomi da ICC. Questa evoluzione è dovuta al *remodeling*, un meccanismo fisiopatologico che è stato definito "l'espressione genomica secondaria a danno cardiaco risultante in cambiamenti molecolari, cellulari e interstiziali che si manifestano clinicamente come cambiamenti di dimensione, forma e funzione del cuore" [3]. Come si evince dalla definizione, il *remodeling* si verifica in seguito a danno cardiaco di qualunque tipo, sia acuto che cronico; tuttavia l'infarto del miocardio ne rappresenta senza

dubbio la causa più frequente e pertanto la maggior parte delle ricerche sul *remodeling* sono state condotte su modelli post-ischemici. Nell'ICC sono numerosi gli studi che stanno cercando testare nuove ipotesi, basate su meccanismi fisiopatologici complementari a quelli classici, nel tentativo di identificare nuovi bersagli terapeutici [4]. Si pensi al modello ormono-metabolico, che da anni si è affacciato nel panorama della ricerca clinica [5, 6], date le crescenti evidenze di una connessione molto stretta tra le alterazioni ormonali e il sistema cardiovascolare [7, 8]. Tra questi, il *remodeling* post-infartuale è stato oggetto di studi da oltre un ventennio e, sebbene rimangano numerosi aspetti ampiamente sconosciuti, le scoperte effettuate hanno permesso di progettare e mettere in atto delle strategie terapeutiche volte a contrastare specifiche alterazioni cellulari e molecolari in modo da prevenire le suddette manifestazioni patologiche [9]; come spesso accade in numerose condizioni cliniche [10, 11], diversi sono i bersagli cellulari coinvolti, basti pensare alle cellule infiammatorie, cellule endoteliali, molecole

di adesione, cellule della matrice extracellulare etc. Questa review, divisa in due parti, esaminerà i risultati ottenuti da alcune di esse. Sarà inoltre focalizzata l'attenzione su alcuni effetti che i training di esercizio fisico, da soli o inseriti come componenti della riabilitazione cardiologica hanno su alcune di questi nuove strategie. È dimostrato infatti che la riabilitazione cardiologica ha effetti benefici proprio nel prevenire il remodelling cardiaco [12,13], oltre che nel migliorare la performance cardiovascolare e la perfusione miocardica in pazienti affetti da cardiopatia ischemica cronica [14-17]. Diversi sono i meccanismi attraverso i quali l'esercizio fisico esercita i suoi effetti benefici: migliora la funzione endoteliale [18, ha proprietà anti-infiammatorie [19, 20], miglioramento dell'imbalance autonomo [21-25] e la dimostrata riduzione dello stress ossidativo [26].

Micro-RNA

I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante, a singolo filamento che modulano negativamente l'espressione genica, promuovendo la degradazione di mRNA e riducendo la produzione di proteine attraverso la repressione traslazionale [27].

I miRNA portano alla distruzione o alla repressione della traduzione di alcuni mRNA bersaglio che hanno una sequenza complementare nella loro regione non codificante 3' (3'-UTR), a valle del codone di stop, e hanno la funzione di mantenere una concentrazione proteica intracellulare ottimale. Nei vertebrati i miRNA costituiscono circa l'1% di tutti il genoma e regolano più del 30% della parte codificante del genoma umano. Nell'uomo sono stati identificati e sequenziati più di 700 miRNA e il numero di geni da essi regolati è stimato essere intorno a 1000 [59]. Un singolo miRNA è in grado di regolare l'espressione di più geni poiché lega diversi mRNA *target*. Questa caratteristica fondamentale fa sì che un singolo miRNA diventi funzionalmente equivalente a un fattore di trascrizione [28]. Pertanto, i miRNA potrebbero essere regolatori cardine nello sviluppo normale e in condizioni fisiologiche, ma anche in diverse patologie, tra cui il cancro e le malattie cardiovascolari. I miRNA sono coinvolti in molti processi cellulari come l'apoptosi, il metabolismo dei grassi, la differenziazione cellulare, la tumorigenesi, la cardiogenesi e l'angiogenesi [29].

Il ruolo dei miRNA nei processi di *remodeling* ha destato l'attenzione di numerosi studiosi negli ultimi anni. Diversi studi in letteratura hanno evidenziato come ci sia un'alterazione del pattern miocardico di espressione dei miRNA in corso di rimodellamento e scompenso cardiaco. In particolare Thum *et al.* [30] hanno riscontrato una elevata somiglianza tra il pattern di espressione dei miRNA nel cuore di un adulto con ICC e quello del cuore fetale, rispetto al tessuto cardiaco adulto normale. Questa riattivazione dei miRNA fetali sembra contribuire in modo sostanziale all'alterazione dell'espressione genica del miocardio infartuato, innescando quei cambiamenti morfo-funzionali raggruppati sotto la definizione di *remodeling*. L'analisi dei miRNA nel cuore è stata focalizzata non solo sui cardiomiociti, ma anche sulle cellule endoteliali, sulle fibrocellule mu-

scolari striate, sulle cellule infiammatorie e sui fibroblasti, essendo l'interazione tra questi differenti tipi cellulari il principale determinante del rimodellamento cardiaco. In particolare diversi studi hanno rivelato che la *up-* o la *down-regulation* di differenti miRNA può contribuire al danno cardiaco o può al contrario svolgere un'azione protettiva, alterando elementi chiave del *signaling* intracellulare. Yang *et al.* hanno evidenziato che miRNA-1 è espresso in modo preferenziale nei cardiomiociti adulti e nelle cellule del muscolo scheletrico [31]. Esso regola numerose funzioni cellulari, inclusa l'apoptosi, regolando la sintesi di HSP-70, HSP-60 e Bcl-2, e la genesi di aritmie, regolando la sintesi di KCNJ2 e GJA1. La *down-regulation* di miRNA-1 sembra ridurre l'apoptosi e l'insorgenza di aritmie. Dong *et al.* nel 2009 hanno studiato il ruolo di miRNA-21, un interessante candidato per l'inibizione dell'apoptosi nel cuore [71]. In particolare si è visto che la *up-regulation* di miRNA-21 promuove la sopravvivenza cellulare attraverso l'inibizione di PTEN. PTEN degrada il fosfatidil-inositolo 3,4,5, trifosfato che è essenziale per l'attivazione della chinasi Akt. Inoltre questo miRNA controlla l'espressione della metalloproteinasi-2, che riveste un ruolo importante nella progressione dello scompenso cardiaco e nell'infiammazione. Notevole interesse scientifico ruota anche intorno alla famiglia dei miRNA-29, che è composta da tre membri, miRNA-29a, miRNA-29b e miRNA-29c. Tutti e tre questi miRNA, *up-regolano* p53 e inducono apoptosi. Antagonisti farmacologici di miRNA-29a e miRNA-29c aumentano l'espressione di mcl-2 e riducono significativamente la dimensione dell'area infartuata e l'apoptosi dovuta a ischemia-riperfusion [32]. La morte dei cardiomiociti dopo l'ischemia è seguita da fibrosi miocardica e alcuni miRNA, come miRNA-29, sono coinvolti nella fibrosi cardiaca. L'espressione di miRNA-29 è maggiore nei fibroblasti cardiaci rispetto ai cardiomiociti e maggiore nell'area ischemica rispetto alla zona di confine dell'infarto; la sua azione si manifesta con un aumento della fibrosi attraverso la de-repressione della traduzione di collagene ed elastina. Xu *et al.* [33] hanno studiato il miRNA-133, espresso nei cardiomiociti e nelle cellule del muscolo scheletrico. MiRNA-133 esercita effetti anti-apoptotici attraverso la regolazione della caspasi-9. Mi RNA-133 è silenziato nell'ipertrofia e la sua espressione riduce l'ipertrofia e le anomalie di conduzione. Inoltre pazienti che muoiono di infarto del miocardio, hanno ridotti livelli di miRNA-133 nella zona infartuata del cuore. Callis *et al.* hanno studiato il miRNA-208 e il suo ruolo nel rimodellamento cardiaco nei topi [34]. Essi hanno osservato che le MHC, i motori molecolari del muscolo cardiaco, presentano due isoforme, α - e β - MHC, con differente attività ATP-asi e velocità di contrazione che sono espresse nei cuori dei mammiferi. Un'alterata composizione delle MHC, come una diminuzione di α -MHC, è stata dimostrata nei cuori scompensati [35]. In maniera analoga sono state descritte due forme di miRNA-208: miRNA-208a e miRNA-208b. miRNA-208a è codificato da un introne del gene MYH6 della catena pesante α della miosina cardiaca e miR-208b è codificato all'interno del gene MYH7 della catena pesante β

della miosina cardiaca. Si è scoperto che questi miRNA sono co-trascritti con i loro geni MHC di accoglienza e, dal momento che mostrano una sequenza quasi identica, potrebbero essere in grado di reprimere gli stessi geni bersaglio e le stesse vie di segnalazione. Tuttavia, miR-208b non è stato ritrovato nel cuore adulto, il che indica che probabilmente le due forme sono espresse a diversi stadi dello sviluppo. I topi *knock-out* per miRNA-208a non esprimono β -MHC in risposta alla TAC suggerendo che i miRNA-208 regolano l'induzione dell'espressione di β -MHC nello stress cardiaco. Inoltre, è stato osservato che la sovraespressione cardiaca di miRNA-208a è sufficiente per attivare la via di segnalazione della calcineurina, che media lo stress cardiaco dovuto all'aumento del post-carico e induce ipertrofia cardiaca, reprimendo l'espressione di Thrap1, un cofattore del recettore nucleare degli ormoni tiroidei e della miostatina. L'inattivazione genica di Thrap1 e della miostatina è stata associata all'ipertrofia cardiaca. Per quanto riguarda la fibrosi, miRNA-208 appare coinvolto nel processo di fibrosi cardiaca in risposta al sovraccarico di pressione [36]. È importante sottolineare inoltre che l'espressione di miRNA-208a e la *up-regulation* di β -MHC sono state rilevate esclusivamente nelle aree di fibrosi miocardica [37].

L'identificazione dei miRNA come importanti regolatori non solo di singoli geni ma di intere reti di geni ha implicazioni terapeutiche enormi. Cionondimeno la biologia dei miRNA è un'area di ricerca relativamente nuova. La disregolazione di un particolare miRNA è di importanza tale da comportare specifiche patologie cardiovascolari, le quali potrebbero essere prevenute e trattate correggendo i miRNA espressi in modo aberrante. A tal fine sono stati sperimentati diversi approcci. La tecnologia dei "*miR mimics*" è stata sviluppata sintetizzando acidi nucleici che sono capaci di legarsi in modo specifico a mRNA *target* e svolgere lo stesso effetto regolatore dei miRNA, ossia reprimere geni *target* a livello post-trascrizionale [38, 39]. L'efficacia di questa tecnica è stato già ampiamente dimostrata *in vitro*. Per quei miRNA che sono up-regolati nel corso di specifiche malattie sono state sviluppate tecniche che usano anti-miRNA per bloccare l'iperespressione. Una di queste è l'uso di ASO [40], oligonucleotidi artificiali complementari ai loro mi-RNA *target*, che si legano ad essi e ne riducono l'attività.

La maggiore limitazione all'uso della terapia basata sui miRNA, è che un singolo mi-RNA regola l'espressione di centinaia di geni e la loro modulazione può comportare numerosi effetti collaterali indesiderati. Per risolvere questo problema è stata sviluppata una tecnica chiamata "*miR-mask*" [38], in cui si utilizzano oligonucleotidi disegnati per essere perfettamente anti-senso rispetto al sito di legame nel mRNA *target*, il quale forma così un legame con l'oligonucleotide e non con altri miRNA. In questo modo il *miR-mask* agisce come un antagonista farmacologico che lega il suo sito d'azione, mascherando il sito di legame per inibire l'azione di specifici miRNA. I risultati ottenuti fino ad oggi sono incoraggianti, tuttavia tali approcci hanno bisogno di essere validati da ulteriori studi *in vivo*.

Modifiche post-traduzionali: l'esempio di High Mobility Group Box-1 (HMGB-1) e del training fisico

HMGB-1 è una proteina di legame non istonica coinvolta nel mantenimento della struttura del proteosoma e attiva nel processo di ricombinazione, replicazione e trascrizione genica [41]. HMGB-1 può essere incluso nella famiglia delle molecole associate al pattern di danno molecolare (DAMPs), conosciute come allarmine. Diverse molecole appartengono a questa famiglia, differendo per struttura e sequenza, e sono rilasciate dalle cellule necrotiche, con la funzione di attivare il sistema immunitario [42]. Oltre che dalle cellule necrotiche, HMGB-1 è secreto nella media extracellulare dai monociti, in risposta a stimoli pro-infiammatori, attraverso una via non classica, vescicolo-mediata [43]. Da notare che, quando secreta attraverso questa via, HMGB-1 possiede una coda acetilata che non è presente quando è rilasciata dalle cellule necrotiche, suggerendo un ruolo dell'acetilazione nella modulazione del trasporto di HMGB-1 all'esterno delle cellule attivate [44]. HMGB-1 è inoltre rilasciato dalle cellule apoptotiche [45]. HMGB-1 di derivazione apoptotica è ossidato su Cys 106 in un processo in cui le caspasi e le specie reattive dell'ossigeno mitocondriali sono attivamente coinvolte. Si può quindi affermare che, nella patofisiologia dell'infiammazione, HMGB-1 può svolgere i suoi effetti come iniziatore precoce (rilascio passivo dalle cellule necrotiche) e come promotore tardivo (rilascio sia attivo che passivo dalle cellule della serietà macrofagica) [43]. HMGB-1 è stato trovato inoltre nelle lesioni aterosclerotiche, dove è rilasciato dai macrofagi attivati [46] inducendo espressione di altre citochine infiammatorie [47]. È stato suggerito che HMGB-1 attraverso questa infiammazione indotta genera uno stato di infiammazione cronica a livello della lesione aterosclerotica [46]; HMGB-1 potrebbe inoltre promuovere la crescita della placca, avendo funzione di trigger sulla migrazione e sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce [48]. Inoltre potrebbe promuovere la progressione della aterosclerosi stimolando la migrazione dei macrofagi e l'attivazione/maturazione delle cellule dendritiche [43]. È stato dimostrato che HMGB-1 stimola l'attivazione delle cellule endoteliali up-regolando l'espressione delle molecole di adesione (ICAM-1, VCAM ed E-Selectina in particolare, con meccanismi che ancora una volta intrecciano molecole di interesse oncologico alle patologie cardiovascolari) [11, 49].

Pochi sono gli studi in letteratura circa l'associazione tra HMGB-1 e l'ischemia del miocardio [50-55].

Goldstein *et al.* [50] hanno dimostrato alti livelli serici di HMGB-1 in 9 pazienti con sindrome coronarica acuta rispetto a soggetti sani. In uno studio preclinico [51], Andrassy *et al.* Anno dichiarato di avere dati non ancora pubblicati con evidenza di elevati livelli plasmatici di HMGB-1 in pazienti con STEMI all'ammissione in pronto soccorso. In un recente studio, Kohno *et al.* hanno dimostrato [52] che, nei pazienti affetti da infarto acuto, vi è un transitorio aumento dei livelli di

HMGB-1 nei primi sette giorni, con un picco a 12 ore dall'evento. Gli stessi autori hanno mostrato un'associazione tra i livelli di HMGB-1 e il rischio di rottura di cuore e di morte intraospedaliera. Questo risultato è però al momento ancora da verificare, data l'esigua numerosità dei pazienti coinvolti. Cirillo *et al.* [20] ha mostrato che livelli più alti di HMGB-1 nei pazienti affetti da infarto del miocardio acuto erano significativamente correlati ad outcome peggiori di parametri ecocardiografici e di funzione cardiopolmonare, come ad esempio volume telediastolico, frazione di eiezione, picco di consumo di ossigeno. Inoltre, lo stesso gruppo ha mostrato una associazione tra HMGB-1 e la disfunzione autonoma [53]. Recentemente, Sorensen *et al.* hanno mostrato che i livelli plasmatici di HMGB-1 nel post-infarto sono più elevati se comparati ai soggetti sani, trovando una correlazione significativa tra alti livelli di HMGB-1 e il tasso di mortalità nei pazienti affetti da STEMI [54].

In letteratura è presente un unico studio che ha esplorato gli effetti del training fisico sui livelli di HMGB-1 dopo infarto acuto del miocardio [53, 55]. Questo studio randomizzato ha mostrato che dopo 6 mesi, i livelli di HMGB-1 erano significativamente ridotti nei soggetti sottoposti a training rispetto a quelli non sottoposti a cicli di riabilitazione. Inoltre la diminuzione di HMGB-1 era significativamente associata al miglioramento del picco di consumo di ossigeno, del tasso di recupero cardiaco, alla riduzione del volume telediastolico e ad un miglioramento nel wall-motion score index. Questi dati sottolineano la rilevanza dei mediatori infiammatori nell'evoluzione nel post-infarto del remodeling cardiaco. Anche in questo campo sono quindi auspicabili ulteriori studi, così come un campo di ricerca potrebbe essere l'effetto della farmaco-terapia sui livelli di HMGB-1.

Microsfere

Gli avanzamenti tecnologici nel campo dei biomateriali hanno sempre condotto a vere e proprie rivoluzioni nella ricerca cardiologica, basti pensare agli stent medicati o alle protesi valvolari biocompatibili. Negli ultimi anni questo settore ha prodotto delle tecnologie, apparentemente poco sfruttate nella patologia cardiovascolare, che permettono il rilascio locale, graduale e prolungato di molecole ad azione terapeutica [81], note con il termine di microsfere. Queste sono ormai da tempo validate come *carrier* di farmaci citostatici nella terapia di diversi tumori, nonché come mezzo di contrasto ultrasonografico in associazione con il gas Perflutren. Le loro potenzialità come vettori di proteine ad azione anti-remodeling nel post-infarto rimangono invece quasi inesplorate.

Le microsfere sono delle strutture sintetiche formate da polimeri, come PEI o GHM, oppure da lipidi, come nel caso dei liposomi. La loro caratteristica peculiare è che durante la sintesi si possono stabilire il diametro delle particelle e la porosità ottimale al raggiungimento dell'obiettivo terapeutico.

Studi sull'ICC post-ischemica hanno dimostrato che il rilascio locale e graduale di fattori di

crescita come l'IGF-1 e il VEGF è efficace nel migliorare la funzione del miocardio ischemico attraverso neoangiogenesi [56-59], inibizione dell'apoptosi [56], e promozione dell'ipertrofia fisiologica [56, 60]. I principali ostacoli alla somministrazione sistemica dei fattori di crescita includono la loro emivita limitata e la potenziale tossicità legata all'induzione di tumori [61]. Inoltre, l'infusione acuta di IGF-1 provoca vasodilatazione, tachicardia ed ipoglicemia, mentre la somministrazione sistemica del VEGF può portare alla formazione di emangiomi ed altri effetti indesiderati [62].

Teoricamente l'azione fisiologica di IGF-1 e VEGF sul miocardio ischemico è di tipo costante e prolungato [63, 64], pertanto il rilascio ottimale ottenuto grazie a una combinazione di biomateriali e fattori di crescita ingegnerizzati potrebbe effettivamente aumentare la sopravvivenza cellulare nel tessuto residuo. A tale scopo, le GHM rappresentano un mezzo eccezionale per il rilascio sostenuto e controllato dei fattori di crescita in corso di *remodeling*. La sicurezza della gelatina nell'uso clinico è convalidata e la forma sferica sembra favorire molto di più la ritenzione del farmaco nel miocardio danneggiato rispetto al Matrigel o alle preparazioni a base di gel [65].

Rimanendo nell'ambito dei biomateriali, vanno citati anche i dati di uno studio che ha sperimentato la somministrazione di microsfele di idrossiapatite calcica (CHAM) disperse in gel idrosolubile per stimolare l'apposizione di collagene nell'area ischemica, con risultati positivi [66].

Un chiaro esempio di come le tecniche citate finora possano cooperare nell'ambito di un'unica strategia terapeutica giunge da alcuni studi recentissimi, in cui sono state usate cellule staminali come MSC, SM, o cellule di Schwann [67], manipolate per far loro esprimere fattori di crescita paracrini come GLP-1 e VEGF, e incapsulate con del biomateriale simile alla matrice extracellulare che ne favorisce l'attecchimento e contemporaneamente le protegge dall'ambiente extracellulare pericoloso per la loro sopravvivenza.

Conclusioni

Il grande progredire delle scoperte in campo fisiopatologico ha portato negli ultimi anni la ricerca di terapie indirizzate non tanto ad antagonizzare i meccanismi patologici, ma a ripristinare o stimolare i meccanismi fisiologici persi o alterati a causa della patologia. Questo crescente interesse alla terapie "biologiche" ha comportato una gran numero di pubblicazioni di lavori scientifici sia di basic-medicine che di sperimentazione clinica. Sebbene ancora non sia possibile al momento attuale avere indicazioni certe, non essendo i risultati ottenuti univoci, è certo che in un futuro non troppo remoto queste terapie anti-remodeling diverranno fondamentali nel trattamento delle patologie cardiovascolari. Perché ciò avvenga tuttavia sono indispensabili studi clinici randomizzati e controllati su vasta scala e di lunga durata che ne possano attestare la superiorità o la non-inferiorità rispetto alle attuali cure farmacologiche e chirurgiche.

Riassunto

Grazie ai notevoli progressi terapeutici e del tasso di sopravvivenza dopo un infarto del miocardio, vi è nel mondo un aumento dell'incidenza di insufficienza cardiaca cronica. Questo fenomeno è dovuto alla impossibilità di prevenire la progressione del danno miocardico, a causa della conoscenza ancora parziale che possediamo sui complessi meccanismi fisiopatologici che regolano la risposta del tessuto cardiaco al danno ischemico. Essi vedono coinvolti svariati tipi cellulari come fibroblasti, cellule del sistema immunitario, cellule endoteliali, cardiomiociti e cellule staminali, nonché una miriade di mediatori appartenenti al sistema delle citochine e non solo. Da qui l'interesse verso il remodeling post-infartuale, campo nel quale emergono nuovi potenziali target terapeutici per arrestare la progressione cronica del danno miocardico. Dopo aver valutato, nella prima parte di questa review, i risultati ottenuti mediante la terapia genica e l'impiego delle cellule staminali, in questa seconda parte saranno discusse le innovazioni ed i risultati più recenti ottenuti grazie ai micro-RNA, alle modifiche post-traduzionali e all'uso delle microsfe.

ABBREVIAZIONI (in ordine alfabetico)

AAV: Virus Adeno-Associato
 AdV: Adenovirus
 ASC: Adipose Stem Cells
 ASO: Anti-Sense Oligonucleotides
 BMC: Bone Marrow-derived Cells
 CHAM: Calcium HydroxyApatite Microspheres
 CSC: Cardiac Stem Cells
 eNOS: endothelial Nitric Oxide-Synthase
 EPC: Endothelial Progenitor Cells
 ESC: Embryonic Stem Cells
 FGF: Fibroblast Growth Factor
 GHM: Gelatin Hydrogel Microspheres
 HGF: Hepatocyte Growth Factor
 ICC: Insufficienza Cardiaca Cronica
 IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1
 IMA: Ischemia Miocardica Acuta
 IPS: Inducible Pluripotent Stem cells
 MHC: Myosin Heavy Chain
 miRNA: micro-RNA
 MSC: Mesenchymal Stem Cells
 mRNA: RNA messaggero
 PCI: Percutaneous Coronary Intervention
 PEI: PoliEtilen-Immina
 SOD: Superossido-Dismutasi
 SM: Skeletal Myoblasts
 SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone
 TAC: Transverse Aortic Constriction
 VEGF: Vascular-Endothelial Growth Factor

Bibliografia

- Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart failure* 2013; 1: 1-20.
- Dorn GW, 2nd. Novel pharmacotherapies to abrogate postinfarction ventricular remodeling. *Nature reviews Cardiology* 2009; 6: 283-91.
- Cohn JN, 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. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 35: 569-82.
- Cittadini A, Marra AM, Arcopinto M, et al. Growth hormone replacement delays the progression of chronic heart failure combined with growth hormone deficiency: an extension of a randomized controlled single-blind study. *JACC Heart failure* 2013; 1: 325-30.
- Marra AM, Arcopinto M, Bobbio E, Salzano A, Sacca L, Cittadini A. An unusual case of dilated cardiomyopathy associated with partial hypopituitarism. *Internal and emergency medicine* 2012; 7 Suppl 2: S85-7.
- Bossone E, Limongelli G, Malizia G, et al. The T.O.S.C.A. Project: research, education and care. Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica tisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo 2011; 76: 198-203.
- Pasquali D, Arcopinto M, Renzullo A, et al. Cardiovascular abnormalities in Klinefelter syndrome. *International journal of cardiology* 2013; 168: 754-9.
- Marra AM, Improda N, Capalbo D, et al. Cardiovascular abnormalities and impaired exercise performance in adolescents with Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; jc20141805.
- Landmesser U, Wollert KC, Drexler H. Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodeling. *Cardiovascular research* 2009; 81: 519-27.
- Salzano A, Sirico D, Golia L, et al. [The portopulmonary hypertension: an overview from diagnosis to treatment]. Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica tisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo 2013; 80: 66-8.
- Arcopinto M, Cella CA, Wesolowski R, et al. Primary prevention of cancer-related thrombosis: special focus on ambulatory patients. *International journal of cardiology* 2014; 173: 583-4.
- Giallauria F, Cirillo P, Lucci R, et al. Left ventricular remodelling in patients with moderate systolic dysfunction after myocardial infarction: favourable effects of exercise training and predictive role of N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 2008; 15: 113-8.
- Giallauria F, Galizia G, Lucci R, et al. Favourable effects of exercise-based Cardiac Rehabilitation after acute myocardial infarction on left atrial remodeling. *International journal of cardiology* 2009; 136: 300-6.
- Giallauria F, Lucci R, D'Agostino M, et al. Two-year multicomprensive secondary prevention program: favorable effects on cardiovascular functional capacity and coronary risk profile after acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2009; 10: 772-80.
- Giannuzzi P, Temporelli PL, Marchioli R, et al. Global secondary prevention strategies to limit event recurrence after myocardial infarction: results of the GOSPEL study, a multicenter, randomized controlled trial from the Italian Cardiac Rehabilitation Network. *Archives of internal medicine* 2008; 168: 2194-204.
- Giallauria F, Acampa W, Ricci F, et al. Effects of exercise training started within 2 weeks after acute myocardial infarction on myocardial perfusion and left ventricular function: a gated SPECT imaging study. *European journal of preventive cardiology* 2012; 19: 1410-9.
- Giallauria F, Acampa W, Ricci F, et al. Exercise training early after acute myocardial infarction reduces stress-induced hypoperfusion and improves left ventricular function. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2013; 40: 315-24.
- Tarro Genta F, Eleuteri E, Temporelli PL, et al. Flow-mediated dilation normalization predicts outcome in chronic

- heart failure patients. *Journal of cardiac failure* 2013; 19: 260-7.
19. Giallauria F, Cirillo P, D'Agostino M, *et al.* Effects of exercise training on high-mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. *Journal of cardiac failure* 2011; 17: 108-14.
 20. Cirillo P, Giallauria F, Pacileo M, *et al.* Increased high mobility group box-1 protein levels are associated with impaired cardiopulmonary and echocardiographic findings after acute myocardial infarction. *Journal of cardiac failure* 2009; 15: 362-7.
 21. Giallauria F, De Lorenzo A, Pileri F, *et al.* Long-term effects of cardiac rehabilitation on end-exercise heart rate recovery after myocardial infarction. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 2006; 13: 544-50.
 22. Giallauria F, Lucci R, Pietrosante M, *et al.* Exercise-based cardiac rehabilitation improves heart rate recovery in elderly patients after acute myocardial infarction. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2006; 61: 713-7.
 23. Giallauria F, Lucci R, De Lorenzo A, D'Agostino M, Del Forno D, Vigorito C. Favourable effects of exercise training on N-terminal pro-brain natriuretic peptide plasma levels in elderly patients after acute myocardial infarction. *Age and ageing* 2006; 35: 601-7.
 24. Giallauria F, De Lorenzo A, Pileri F, *et al.* Reduction of N terminal-pro-brain (B-type) natriuretic peptide levels with exercise-based cardiac rehabilitation in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 2006; 13: 625-32.
 25. Smart NA, Meyer T, Butterfield JA, *et al.* Individual patient meta-analysis of exercise training effects on systemic brain natriuretic peptide expression in heart failure. *European journal of preventive cardiology* 2012; 19: 428-35.
 26. Rengo G, Parisi V, Femminella GD, *et al.* Molecular aspects of the cardioprotective effect of exercise in the elderly. *Aging clinical and experimental research* 2013; 25: 487-97.
 27. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, *et al.* Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics* 2005; 37: 766-70.
 28. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature reviews Genetics* 2007; 8: 93-103.
 29. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet* 2014.
 30. Thum T, Galuppo P, Wolf C, *et al.* MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007; 116: 258-67.
 31. Yang B, Lin H, Xiao J, *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine* 2007; 13: 486-91.
 32. Ye Y, Hu Z, Lin Y, Zhang C, Perez-Polo JR. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research* 2010; 87: 535-44.
 33. Xu C, Lu Y, Pan Z, *et al.* The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *Journal of cell science* 2007; 120: 3045-52.
 34. Callis TE, Pandya K, Seok HY, *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of clinical investigation* 2009; 119: 2772-86.
 35. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *Journal of cardiac failure* 2010; 16: 404-10.
 36. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 18255-60.
 37. Shyu KG, Lu MJ, Wang BW, Sun HY, Chang H. Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *European journal of clinical investigation* 2006; 36: 713-9.
 38. Xiao J, Yang B, Lin H, Lu Y, Luo X, Wang Z. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *Journal of cellular physiology* 2007; 212: 285-92.
 39. Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li PF. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 12103-8.
 40. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-9.
 41. Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clinica chimica acta: international journal of clinical chemistry* 2007; 375: 36-42.
 42. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology* 2007; 28: 429-36.
 43. Cirillo P, Giallauria F, Di Palma V, *et al.* Cardiovascular disease and high-mobility group box 1—is a new inflammatory killer in town? *Angiology* 2013; 64: 343-55.
 44. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-5.
 45. Bell CW, Jiang W, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *American journal of physiology Cell physiology* 2006; 291: C1318-25.
 46. Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, *et al.* Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004; 24: 2320-5.
 47. Andersson U, Wang H, Palmblad K, *et al.* High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of experimental medicine* 2000; 192: 565-70.
 48. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, *et al.* Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006; 20: 2565-6.
 49. Nagatani G, Nomoto M, Takano H, *et al.* Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer research* 2001; 61: 1592-7.
 50. Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, *et al.* Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock* 2006; 25: 571-4.
 51. Andrassy M, Volz HC, Riedle N, *et al.* HMGB1 as a predictor of infarct transmural and functional recovery in patients with myocardial infarction. *Journal of internal medicine* 2011; 270: 245-53.
 52. Kohno T, Anzai T, Naito K, *et al.* Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodelling. *Cardiovascular research* 2009; 81: 565-73.

53. Giallauria F, Cirillo P, Lucci R, *et al.* Autonomic dysfunction is associated with high mobility group box-1 levels in patients after acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2010; 208: 280-4.
54. Sorensen MV, Pedersen S, Mogelvang R, Skov-Jensen J, Flyvbjerg A. Plasma high-mobility group box 1 levels predict mortality after ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovascular interventions* 2011; 4: 281-6.
55. Giallauria F, Cirillo P, Lucci R, *et al.* Effects of exercise-based cardiac rehabilitation on high mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction: rationale and design. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2009; 10: 659-63.
56. Cittadini A, Monti MG, Petrillo V, *et al.* Complementary therapeutic effects of dual delivery of insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor by gelatin microspheres in experimental heart failure. *European journal of heart failure* 2011; 13: 1264-74.
57. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, *et al.* New cytokine delivery system using gelatin microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2002; 301: 59-65.
58. Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman M, Ikada Y. Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 1999; 10: 79-94.
59. Dragoni S, Laforenza U, Bonetti E, *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration. *Stem Cells* 2011; 29: 1898-907.
60. Hao X, Silva EA, Mansson-Broberg A, *et al.* Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 2007; 75: 178-85.
61. Post MJ, Laham R, Sellke FW, Simons M. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovascular research* 2001; 49: 522-31.
62. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; 102: 898-901.
63. Cittadini A, Isgaard J, Monti MG, *et al.* Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41: 2154-63.
64. Sacca L, Cittadini A, Fazio S. Growth hormone and the heart. *Endocrine reviews* 1994; 15: 555-73.
65. Anderl JN, Robey TE, Stayton PS, Murry CE. Retention and biodistribution of microspheres injected into ischemic myocardium. *Journal of biomedical materials research Part A* 2009; 88: 704-10.
66. Dixon JA, Gorman RC, Stroud RE, *et al.* Targeted regional injection of biocomposite microspheres alters post-myocardial infarction remodeling and matrix proteolytic pathways. *Circulation* 2011; 124: S35-45.
67. Wang Y, Zhang G, Hou Y, *et al.* Transplantation of microencapsulated Schwann cells and mesenchymal stem cells augment angiogenesis and improve heart function. *Molecular and cellular biochemistry* 2012; 366: 139-47.