

Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in

"Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale"

XXIV ciclo anno 2009

RUOLO DEL TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF) ALFA SULLA PERFORMANCE CARDIACA: IMPLICAZIONI PER L'UTILIZZO DEGLI ANTI-TNF ALFA IN PAZIENTI AFFETTI DA SCOMPENSO CARDIACO

Fabio Cacciapaglia, MD

Coordinatore: Tutore:

Prof. Raffaele Antonelli Incalzi Prof.ssa Antonella Afeltra

Ai miei figli

Paolo e Gabriele

Sol bearful

INDICE

1. ABSTRACT	pag. 4
2. LO SCOMPENSO CARDIACO	pag. 8
Epidemiologia	pag. 8
Fisiopatologia	pag. 9
Manifestazioni cliniche	pag. 11
La classificazione NYHA	pag. 13
Diagnosi	pag. 14
Terapia	pag. 16
3. IL TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA (TNF α)	pag. 19
I recettori del TNFα	pag. 21
Attività biologiche del TNFα	pag. 26
Ruolo del TNFα nella patogenesi dello scompenso cardiaco	pag. 28
4. I FARMACI ANTAGONIZZANTI IL TNFα	pag. 33
Indicazioni terapeutiche per l'utilizzo degli anti-TNF α	pag. 37
Profilo di sicurezza e controindicazioni	pag. 41
Gli antagonisti del TNFα nello scompenso cardiaco	pag. 44
Malattia cardiovascolare, artrite reumatoide ed anti-TNF α	pag. 48
5. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 52
6. MATERIALI E METODI	pag. 53
Colture cellulari	pag. 53
MTT test e curve di vitalità	pag. 54
Determinazione dei recettori solubili tipo 1 e 2 per il TNFα	pag. 56
Dosaggio della Diclorofluoresceina	pag. 57
Dosaggio della Malondialdeide	pag. 59
Determinazione dei complessi DNA-istone clivati	pag. 61
Determinazione della Caspasi-3 attivata	pag. 63
7. RISULTATI	pag. 65
8. DISCUSSIONE	pag. 78
9. CONCLUSIONI	pag. 81
10. BIBLIOGRAFIA	pag 82

Sol bearfu

1. ABSTRACT

Lo scompenso cardiaco (SC) è una sindrome clinica complessa caratterizzata da un disordine cardiaco che determina l'incapacità d'organo ad assolvere la funzione di pompa ematica secondo le necessità dell'organismo. Differenti meccanismi patogenetici sono alla base di tale disordine: indubbiamente le modifiche strutturali e funzionali in seguito ad un danno (ischemico, infettivo o emodinamico) sono un tentativo di adattamento da parte del muscolo cardiaco, che alla lunga può risultare dannoso, soprattutto per l'innescarsi di sistemi neuro-ormonali cha determinano un ulteriore sovraccarico emodinamico.

L'impiego di farmaci come gli ACE-inibitori ed i beta-bloccanti ha apportato notevoli miglioramenti nella terapia medica dello SC, ma ciò nonostante negli ultimi dieci anni la mortalità e la morbilità di questa sindrome restano ancora elevate. La dimostrazione della correlazione diretta tra i livelli circolanti di TNFα, una citochina infiammatoria rilasciata dalle cellule del sitema immunitario innato, ma anche dal miocardiocita in condizioni di stress, e la gravità dello SC, aveva portato a pensare che l'antagonismo di tale citochina avrebbe portato dei vantaggi clinici e soprattutto prognostici per i pazienti trattati.

Dalla metà degli anni '90, sono entrati a disposizione nella pratica clinica dei farmaci biotecnologici in grado di legare selettivamente il TNFα, mediante meccanismo immunologico (Ab-Ag), e di contrastarne i suoi effetti biologici. Alcuni studi clinici pilota in pazienti affetti da SC avevano prodotto risultati incoraggianti, ma due trials clinici randomizzati multicentrici (ATTACH e RENEWAL) hanno fallito nel tentativo di dimostrarne un'efficacia terapeutica, portando ad un incremento dose-correlato del numero di ospedalizzazioni o di eventi fatali nei pazienti trattati ed appartenenti alle classi funzionali di scompenso NYHA III-IV.

4

Sh been h

Sulla base di questi risultati negativi i farmaci antagonizzanti il TNF α (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, e certolizumab) sono stati etichettati come controindicati nei pazienti con SC, portando a particolare cautela nell'utilizzo di questi farmaci nei pazienti affetti da patologie reumatiche, dermatologiche e gastroenterologiche.

Dopo oltre 10 anni di utilizzo di questi farmaci per le indicazioni reumatologiche, i dati provenienti dai Registri Nazionali di pazienti trattati con anti-TNFα sembrerebbero dimostrare che tali farmaci possono provocare effetti sia negativi che benefici sulla funzione cardiaca: infatti nei pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con anti-TNFα sembrerebbe essere ridotta l'incidenza di eventi cardiovascolari. Diverse ipotesi sono state avanzate per spiegare questo comportamento ambivalente, più di recente, le differenze funzionali tra i due recettori cellulari del TNFα (TNFR 1 p55 e TNFR2 p75), con diversa affinità di legame ed attivazione di pathwais intracellulari, potrebbero far supporre che bassi livelli circolanti di TNFα sarebbero in grado di trasmettere effetti benefici al cuore legandosi preferenzialmente ai TNFR2, mentre elevati livelli di TNFα determinerebbero effetti negativi.

Il precondizionamento del miocardiocita con bassi livelli di TNF α sarebbe in grado di proteggere il cuore contro la successiva esposizione ad elevati livelli di TNF α se questa ipotesi si dimostrasse corretta.

Per validare questa ipotesi, abbiamo condotto uno studio in vitro utilizzando la linea cellulare H9c2, cardiomiociti embrionali di ratto ampiamente usati per sondare la cardiotossicità da farmaci. Le cellule H9c2 sono state coltivate a subconfluenza e la vitalità cellulare è stata valutata mediante il test mitocondrio-specifico, in presenza di antimicina-A, di riduzione del 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) a sale di formazano.

Sal bearfu

Dopo aver condotto studi esplorativi di esposizione dei cardiomiociti per 24 h a dosi crescenti di TNFα (0,01-1000 ng/ml), abbiamo identificato la concentrazione inibente il 50% della vitalità cellulare (IC₅₀) per il TNF α ad una concentrazione di 0.06 ± 0.03 ng/ml (n=10), ed una concentrazione sub-tossica di 0.01 ng/ml da utilizzare come dose precondizionante. Abbiamo quindi esposto le cellule al medesimo stress, riscontrando che il precondizionamento con dosi sub-tossiche di TNFα proteggeva i cardiomiociti contro la riesposizione ad alte dosi di TNF α incrementando l'IC₅₀ delle H9c2 di \sim 60 volte (3.6 \pm 2.2 ng/ml, n=5; P<0.01).

Il dosaggio mediante kit ELISA commerciali (Quantikine – R&D system) dei livelli di TNFR1 e TNFR2 solubili nel sovranatante delle colture cellulari ha dimostrato che i cardiomiociti rilasciano circa il doppio di sTNFR2 rispetto al sTNFR1 con un incremento di rilascio dopo esposizione a dosi sub-tossiche di TNFα.

Poichè il TNFα esercita i suoi effetti aumentando i livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e determinando stress ossidativo, oppure inducendo apoptosi sia ROS-dipendente che -indipendente, abbiamo esposto i cardiomiociti H9c2, sia in condizioni basali che dopo precondizionamento con TNFα, a dosi crescenti di perossido di idrogeno (H₂O₂) somministrato in bolo (0,01-500 mM), oppure prodotto a livello intracellulare mediante inibizione della catalasi tramite aminotriazolo (AT, 0.01-1000 mM), e ad un agente proapototico ROS-indipendente come l'etoposide (ETO, 0,01-1000 mM). In tutti e tre i casi abbiamo osservato che il precondizionamento rendeva i cardiomiociti più resistenti all'H₂O₂, AT ed ETO, incrementando i valori di IC₅₀ rispettivamente, da 90 \pm 35 a 205 \pm 22 μ M, da 42.5 ± 2.4 a 130.6 ± 25 mM, e da 1 ± 0.35 a 191.7 ± 2.8 μ M (n=5, P \leq 0.01).

Inoltre abbiamo riscontrato una riduzione nel sovranatante dei livelli di nucleosomi e di caspasi 3 attivata, dosati mediante metodica ELISA con kit commerciali (Roche Diagnostic), quando i cardiomiociti venivano precondizionati con TNFα. Infine, la Sh bearful

valutazione in HPLC dei ROS intracellulari, mediante dosaggio della diclorofluoresceina (DCF) ossidata, e della lipoperossidazione, mediante dosaggio dei livelli di malondialdeide (MDA), ha dimostrato come il precondizionamento da TNF α sia in grado di ridurne la produzione intracellulare.

In conclusione, i nostri dati porterebbero a dover rivistare l'assioma "TNF α = danno cardiaco": perlomeno andrebbe riportato che il TNF α può esercitare sia effetti deleteri che positivi, come "Giano bifronte", ed i risultati inattesi degli anti-TNF α andrebbero spiegati alla luce di queste proprietà del TNF α .

Nei pazienti con SC gli effetti sfavorevoli degli anti-TNF α sarebbero determinati dall'abrogazione del precondizionamento cardiomiocitario esercitato da concentrazioni subtossiche di TNF α , che renderebbe il cardiomiocita più suscettibile agli agenti tossici.

Sh bearfu

2. LO SCOMPENSO CARDIACO

Lo scompenso cardiaco (o insufficienza cardiaca, SC) è una sindrome clinica complessa ad andamento progressivo, determinato da un disordine cardiaco, strutturale o funzionale, che causa un ostacolo nel riempimento o nello svuotamento ventricolare, che si traduce in una incapacità ad eiettare una quantità di sangue sufficiente per le necessità metaboliche dell'organismo (1).

Lo SC può essere causato da difetti strutturali, anomalie funzionali o da un sovraccarico improvviso che va al di là delle capacità di compenso del muscolo cardiaco.

Epidemiologia

Se negli ultimi 30 anni si è assistito ad una diminuzione della prevalenza delle malattie cardiovascolari, al contrario, per quanto riguarda lo SC, si è registrato un aumento della sua prevalenza. Le cause che possono giustificare un incremento dell'incidenza dello scompenso, cioè dei nuovi casi, possono individuarsi nell'invecchiamento della popolazione generale per miglioramento delle terapie, con riduzione della mortalità nelle fasi acute dell'infarto miocardio, e nell'aumento della prevalenza di condizioni cliniche predisponenti come il diabete, l'ipertensione, l'obesità.

Accanto alla popolazione con insufficienza cardiaca sintomatica, esiste la parte "sommersa" costituita dal rilevante numero di soggetti con disfunzione ventricolare asintomatica. Inoltre, nonostante l'impiego di farmaci come gli ACE-inibitori e i betabloccanti abbia portato ad importanti miglioramenti nella terapia medica dello SC, negli ultimi dieci anni la mortalità e la morbilità di questa sindrome rimangono ancora elevate.

L'incidenza stimata è di 1-5 ogni 1000 persone, che sale a 30-40 ogni 1000 persone con età maggiore di 75 anni. La prevalenza attualmente è di 0.4-2% della popolazione

Sol bearful

generale, con livelli di 2-5% nei soggetti con più di 65 anni. Tale dato fa sì che ogni anno negli Stati Uniti vi siano approssimativamente 1 milione di ricoveri in ospedale per SC. I dati di comunità dimostrano inoltre che quasi il 50 % dei pazienti muore entro cinque anni, con una mortalità annuale negli Stati Uniti di circa 250.000 pazienti ed in Europa di circa 300.000 pazienti (2).

I principali fattori di rischio di SC sono l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito di tipo 2, l'uso si sostanze cardiotossiche (alcool, cocaina, tabacco, agenti chemioterapici come le antracicline ed il trastuzumab), l'iperlipidemia, le patologie tiroidee (sia l'ipertiroidismo che l'ipotirodismo), la tachicardia e la patologia coronarica aterotrombotica (3).

Fisiopatologia

Nonostante lo SC possa essere una conseguenza di tutte le cardiopatie, la cardiopatia ischemica ne è la causa in circa i 3/4 dei casi. Le miocardiopatie rappresentano la seconda causa in ordine di frequenza, mentre meno comuni sono le eziologie congenite, valvolari o ipertensive.

Spesso lo SC si manifesta per la prima volta durante un disturbo cardiaco acuto che costringe un miocardio già cronicamente sovraccaricato ad uno sforzo aggiuntivo. Cause scatenanti più frequenti sono infezioni (in particolare quelle polmonari, cui sono maggiormente soggetti i pazienti affetti da scompenso del cuore sinistro), aritmie, stress fisici, emotivi, ambientali, dietetici o sovraccarico di liquidi, l'infarto miocardico, l'embolia polmonare, l'anemia, la tireotossicosi, lo stato gravidico, l'aggravamento di una sottostante ipertensione, le miocarditi o le endocarditi infettive.

Lo SC può essere definito sistolico o diastolico, ad alta o a bassa portata, acuto o cronico, destro o sinistro, retrogrado o anterogrado.

L'insufficienza sistolica consiste in un'incapacità, da parte del ventricolo, di contrarsi

Sol bearly

fisiologicamente ed eiettare una quantità sufficiente di sangue; un'insufficienza diastolica è l'incapacità del ventricolo di rilasciarsi e di riempirsi di sangue in maniera adeguata. Le manifestazioni cliniche proprie dell'insufficienza sistolica sono quindi l'astenia e la ridotta tolleranza allo sforzo in presenza o meno di segni e sintomi di ipoperfusione periferica; quelle invece dell'insufficienza diastolica, abitualmente definita come una insufficienza cardiaca in un paziente con una FE>50%, sono caratterizzate dall'aumento di pressione di riempimento del ventricolo interessato e conseguente ristagno nel letto venoso a monte.

Le cause principali di insufficienza diastolica sono un aumento della resistenza al flusso ventricolare in entrata e una ridotta capacità diastolica ventricolare (es. pericardite costrittiva, cardiopatia ipertensiva o ipertrofica), una compromissione del rilascio ventricolare (es. infarto miocardico) o una fibrosi miocardica (es. miocardite restrittiva).

Un'insufficienza cardiaca a bassa portata si verifica in seguito ad infarto miocardico, ipertensione arteriosa, miocardiopatia dilatativa o una patologia valvolare o pericardica, mentre un'insufficienza cardiaca ad alta portata si verifica nei pazienti con ridotta resistenza vascolare sistemica (es. ipertiroidismo, anemia, gravidanza, fistole A-V, Beriberi e malattia di Paget).

Un'insufficienza cardiaca si definisce acuta quando insorge in breve tempo in seguito, per esempio, a rottura di una cuspide vascolare, a trauma, o ad un infarto del miocardio massivo in un paziente non affetto in precedenza da cardiopatia. Nell'insufficienza cardiaca acuta, si ha un'improvvisa caduta della gittata cardiaca che spesso esita in un'ipotensione sistemica senza edema periferico. Un'insufficienza cardiaca si definisce invece cronica quando insorge in un tempo più prolungato in pazienti già affetti da una cardiopatia, come ad esempio una miocardiopatia dilatativa o multivalvolare. Nel quadro clinico dello SC cronico, domina la manifestazione della congestione vascolare, con mantenimento di una pressione arteriosa efficace fino agli stadi finali.

Sh been h

Nell'insufficienza cardiaca sinistra, i pazienti vanno incontro a sovraccarico emodinamico (per esempio, rigurgito aortico) o indebolimento dei miocardiociti del ventricolo sinistro (per esempio, in seguito ad infarto), sviluppando così dispnea e ortopnea per congestione polmonare. Nell'insufficienza cardiaca destra (in caso, per esempio, di ipertensione polmonare primaria o secondaria a tromboembolia polmonare), prevalgono invece edema periferico, epatomegalia e distensione venosa periferica. Frequentemente l'insufficienza cardiaca sinistra e destra si possono associare.

Il concetto di insufficienza cardiaca retrograda presuppone che uno dei due ventricoli non sia in grado di eiettare una quantità adeguata di sangue oppure di riempirsi normalmente. In questo modo, aumenta la pressione atriale e venosa a monte del ventricolo interessato, con alterazioni neuroendocrine (incremento di peptidi natriuretici) e conseguente ritenzione idrosalina con aumento delle pressioni venose e capillari, e stravaso di liquido nello spazio interstiziale polmonare (edema polmonare) o sistemico (edema periferico). Secondo il modello di insufficienza cardiaca anterograda, le manifestazioni cliniche sono causate invece dalla distribuzione non adeguata del sangue nell'albero arterioso; la ritenzione idrosalina, quindi, sarebbe conseguenza della riduzione di perfusione renale e dell'eccessivo riassorbimento sodico a livello del tubulo prossimale e distale (attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone) (4).

Manifestazioni cliniche

Nelle fasi precoci dello SC, la dispnea compare soltanto sotto sforzo. Con l'avanzare della patologia di base, le attività che inducono la comparsa di dispnea nel pazienti diventano progressivamente meno impegnative, fino a presentarsi anche a riposo.

Due forme particolari di dispnea, che sono manifestazioni cliniche tipiche di SC, sono l'ortopnea e la dispnea parossistica notturna.

Sh bearful

L'ortopnea (dispnea in posizione supina) non rappresenta una manifestazione precoce di insufficienza cardiaca; essa rappresenta piuttosto la conseguenza della ridistribuzione dei liquidi dall'addome e dagli arti inferiori verso il torace quando il paziente assume la posizione supina, con aumentata pressione capillare polmonare che si accompagna all'elevazione del diaframma.

La dispnea parossistica notturna consiste in attacchi di importante mancanza di fiato, tipicamente durante la notte, che svegliano il paziente; l'affanno e la tosse possono non recedere in posizione seduta. Tale sintomo può essere causato, almeno in parte, dalla depressione del centro del respiro durante il sonno e dalla diminuita tensione arteriosa di ossigeno.

La gran parte dei pazienti riferisce astenia e affaticamento, specialmente per riduzione della perfusione dei muscoli scheletrici e per incapacità di aumentare la gittata da parte del cuore scompensato in caso di stress o sotto sforzo fisico. Sono comuni anche anoressia e nausea, con senso di distensione e dolore addominali; tali manifestazioni cliniche possono essere in particolare ricondotte alla congestione del sistema portale e del parenchima epatico.

I pazienti affetti da grave SC, in particolare se associato a arteriosclerosi celebrale, ridotta perfusione celebrale e ipossiemia arteriosa, possono andare incontro a difficoltà di concentrazione, perdita di memoria, cefalea, ansia, insonnia e nicturia (4).

Sh beerfly

La classificazione NYHA.

Una classificazione funzionale molto utile ed ormai standardizzata nella pratica clinica è il sistema proposto dalla New York Heart Association (NYHA) (Tabella I). Esso valuta la presenza di sintomi nelle varie attività quotidiane e si è dimostrato correlare con la prognosi del paziente. Inoltre trova un corrispettivo nella scelta della approccio terapeutico. Altri test possono risultare importanti nella valutazione della capacità funzionale del paziente affetto da insufficienza cardiaca, tra cui, per esempio, il test del cammino in 6 minuti (3).

Tabella I. Sistema di classificazione della New York Heart Association (NYHA)

Classe NYHA I (grado minimo)

Il paziente ha disfunzione ventricolare sinistra asintomatica. La normale attività fisica non determina stanchezza, palpitazioni o affanno eccessivi.

Classe NYHA II (grado lieve)

Il paziente ha stanchezza, palpitazioni o affanno in seguito a normale attività fisica.

Classe NYHA III (grado moderato)

Il paziente ha affanno in seguito ad attività fisiche minime, incluse le usuali attività quotidiane.

Classe NYHA IV (grado grave)

Il paziente ha affanno a riposo e non è in grado di effettuare nessuna attività fisica senza provare disagio. L'attività fisica di qualunque genere peggiora tale disagio ed è necessario monitorare ad ogni visita clinica eventuali fluttuazioni del paziente affetto da insufficienza cardiaca per quanto riguarda la classe NYHA di appartenenza, in particolare per valutare un eventuale consulto specialistico o l'indicazione al trapianto cardiaco.

13

Sol bearfu

Diagnosi

Nella diagnosi di SC, un ruolo fondamentale è giocato dai reperti semeiologici, laboratoristici e strumentali.

Il polso venoso giugulare, nell'insufficienza cardiaca, mostra un'onda atriale "a" più ampia del normale, mentre la discesa "y" appare più ripida. Può essere presente un'onda "v" ampia per rigurgito tricuspidale (per insufficienza relativa da dilatazione ventricolare destra). All'auscultazione potranno essere repertati III o IV tono (5, 6).

I livelli sierici del brain natriuretic peptide (BNP) e la frazione N-terminale del suo precursore (NT-pro-BNP) aumentano all'aumentare del volume e delle pressioni ventricolari (7) e possono dunque essere utilizzati come *markers* di sovraccarico pressorio o volumetrico ventricolare.

Tali sostanze proteiche sono prodotte dai cardiomiociti, in particolare atriali, in risposta allo stiramento e alla deformazione e sono dotate di azione vasodilatatrice e natriuretica. Il BNP, prodotto dalle cellule ventricolari è di maggiore interesse clinico, in quanto i ventricoli, avendo massa maggiore rispetto agli atri, producono peptidi natriuretici in quantità superiori e quindi meglio rilevabili. Il NT-pro-BNP è biologicamente inattivo, ma si caratterizza per una più lunga emivita che lo rende particolarmente idoneo a rilevare nel tempo variazioni anomale della formazione ventricolare di BNP (3). Come tale, Nt-pro-BNP ha acquisito importanza crescente nella diagnosi neuro-umorale di eccessiva distensione o ridotto rilasciamento diastolico ("stiffness") della parete ventricolare in pazienti con FE conservata.

I dati più significativi per quanto riguarda l'utilità sia di BNP che di NT-pro-BNP riguardano la valutazione della componente indotta da SC in un paziente che presenti dispnea acuta e malattia polmonare (8). I livelli sierici di BNP possono risultare più elevati nelle donne, nei pazienti più anziani, nei pazienti affetti da insufficienza renale, con infarto miocardico acuto o in alcune condizioni cliniche non di natura cardiaca. Per questo motivo l'interpretazione di

Sol bearly

tale dato laboratoristico deve essere integrata con reperti clinici e strumentali (9). Inoltre, i livelli di BNP possono aiutare nella stratificazione del rischio e nell'identificazione della prognosi dei pazienti affetti da SC (10). Il monitoraggio routinario di BNP e NT-pro-BNP rimane un punto controverso; sono in corso studi per risolvere tale dibattito (11).

In tutti i pazienti con SC di recente insorgenza, è indicato studiare una possibile sottostante patologia tiroidea, eseguendo il dosaggio del TSH e degli ormoni tiroidei. Dal momento che l'anemia, l'insufficienza renale, le infezioni o una patologia polmonare concomitante possono esacerbare le manifestazioni cliniche dello SC, è importante considerare tali condizioni nel work-up dello SC.

L'American College of Cardiology (ACC) e l'American Heart Association (AHA) raccomandano di eseguire un elettrocardiogramma (ECG) in qualunque paziente a rischio e con storia di patologia cardiaca, tra i quali figurano anche pazienti con SC di recente insorgenza o con riesacerbazione di tale patologia. Ogniqualvolta sia possibile, il tracciato elettrocardiografico deve essere confrontato con i precedenti. I risultati di questo esame possono evidenziare ipertrofia ventricolare, anomalie atriali, aritmie, anomalie della conduzione, pregressi infarti miocardici e ischemie miocardiche in atto.

L'ecocolordoppler cardiaco transtoracico in due dimensioni resta l'esame principe per la valutazione del paziente con SC, in quanto è in grado di valutare il volume e la funzione dei ventricoli e permette di studiare eventuali anomalie della motilità, di misurare la frazione di eiezione (FE), di documentare patologie valvolari e di discriminare adeguatamente tra insufficienza cardiaca sistolica ed insufficienza cardiaca con preservata funzione sistolica.

Nell'insufficienza cardiaca con preservata funzione sistolica la frazione di eiezione è nel range di normalità (FE>50%) e c'è evidenza di ipertrofia del ventricolo. Nella disfunzione sistolica, la frazione di eiezioni è inferiore al 50% ed è spesso presente dilatazione del ventricolo sinistro.

Sh beerfly

Inoltre può essere indicato eseguire, ove clinicamente possibile, un test ergometrico per studiare pazienti con ischemia coronarica subclinica, per quantificare la loro capacità funzionale, e per identificare aritmie da sforzo. Si può anche utilizzare uno stressor farmacologico, come dipiridamolo, dobutamina o adenosina, con valutazione alla risonanza magnetica o all'ecocolordoppler cardiaco, nei pazienti che non possono esporsi ad esercizio fisico.

Infine è necessario valutare l'opportunità di effettuare una cateterizzazione cardiaca in quei pazienti affetti da SC nei quali l'ecocolordoppler cardiaco non sia in grado di valutare adeguatamente la gravità di una patologia valvolare o quando si sospetti o sia presente un'ischemia cardiaca. In tal caso può essere utile effettuare una cateterizzazione del cuore destro qualora il paziente non risponda alle tradizionali terapie o quando l'ipertensione polmonare contribuisca in maniera determinante ai sintomi (3).

Terapia

Negli ultimi 40 anni la terapia farmacologica ha modificato profondamente le aspettative di vita dei pazienti affetti da SC.

In particolare l'utilizzo degli ACE-inibitori in tutti i pazienti affetti da disfunzione del ventricolo sinistro indipendentemente dalla classe funzionale di appartenenza (anche in assenza di sintomatologia) si è dimostrato in grado di modificare la storia naturale di malattia ed aumentare la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti (3, 12-14).

I bloccanti del recettore dell'angiotensina II (ARBs), o sartani, rappresentano una valida alternativa terapeutica agli ACE-inibitori, infatti numerosi studi clinici hanno dimostrato come siano in grado di ridurre la mortalità, migliorare la classe funzionale NYHA di appartenenza, e diminuire il numero di ospedalizzazioni dei pazienti con SC (15-19).

Gli stessi studi hanno anche dimostrato un beneficio dall'associazione tra ACE-inibitori e

Sol bearly

sartani, soprattutto sul rimodellamento delle camere cardiache (principalmente del ventricolo sinistro).

I pazienti affetti da SC che, non rispondono nè ad ACE-inibitori né ai sartani, possono ricevere terapia con idralazina e nitrati a lunga durata di azione. Tale combinazione migliora la prognosi e diminuisce la mortalità nei pazienti con SC e diminuzione della frazione di eiezione (20, 21). La terapia con idralazina con l'aggiunta di nitrati a lunga durata di azione può essere efficacemente associata a quella con ACE-inibitori o sartani, dimostrandosi in grado di influenzare favorevolmente il *remodelling* cardiaco e la mortalità (22).

I β-bloccanti possono essere usati nei pazienti di qualunque classe funzionale NYHA, a patto che siano stabilmente in terapia con ACE-inibitori o con altri vasodilatatori e che non abbiano sovraccarico di volume. I β-bloccanti tendono a ridurre i sintomi dell'insufficienza cardiaca, migliorano la prognosi e la frazione di eiezione, e diminuiscono sensibilmente la mortalità. I pazienti affetti da SC meno grave ricevono da questa classe di farmaci il maggior beneficio a lungo termine. Molti studi che hanno considerato l'impatto della terapia con carvedilolo, bisoprololo e metoprololo succinato a lunga durata di azione, hanno rilevato una riduzione delle ospedalizzazioni, delle morti improvvise e della mortalità globale nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca (23-28).

Se i pazienti persistono in classe funzionale NYHA III-IV nonostante la terapia con ACE-inibitori e β -bloccanti, è possibile considerare la terapia con antagonisti dell'aldosterone, come lo spironolattone (29).

I diuretici, che rappresentano l'unica terapia in grado di ridurre la sintomatologia in acuto, diminuiscono la pressione di incuneamento dei capillari polmonari e l'edema, mentre aumentano la capacità di sforzo fisico. Non esistono però trials clinici che abbiano studiato la loro sicurezza a lungo termine e il loro impatto sulla mortalità. I diuretici dell'ansa possono essere utilizzati in combinazione ad una dieta povera di sodio per controllare il sovraccarico

Sh beerft

volumetrico e migliorare la capacità funzionale dei pazienti di classe NYHA da II a IV. Nello SC non è indicata la monoterapia con diuretici, dal momento che questa classe di farmaci non previene la progressione di malattia (3).

La digossina allevia i sintomi e diminuisce le ospedalizzazioni nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca, ma deve essere riservata ai pazienti sintomatici in classe NYHA da II a IV, dal momento che le ricerche a disposizione non indicano un beneficio in termini di mortalità rispetto al placebo (30).



3. IL TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA.

Il Tumor Necrosis Factor alfa (TNF α) è una citochina pleiotropica proinfiammatoria, le cui funzioni sono implicate in un'ampia gamma di condizioni flogistiche, infettive, autoimmuni e tumorali (31). In particolare, rappresenta il principale mediatore della risposta infiammatoria contro i batteri Gram-negativi ed altri agenti infettivi, ed è responsabile di molte delle manifestazioni cliniche sistemiche in corso di infezioni, come ad esempio la febbre (32).

Originariamente, il TNF α fu identificato come quella sostanza presente nel siero di animali esposti a lipopolisaccaride (LPS) che induceva, in vivo, necrosi di alcuni tumori (32).

Il TNF α è una molecola facente parte della superfamiglia del TNF, di cui fanno parte anche, tra gli altri, TNF β (o linfotossina), FasL, CD40L, p33, CD134L, CD154, CD70, CD153, CD137L, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, TL1, AITRL e THANK (33).

La principale sorgente cellulare di TNF α e costituita dai fagociti mononucleati attivati, tuttavia può essere prodotto anche da linfociti T e B, cellule NK, mastociti, cellule endoteliali e tessuto nervoso (32-34).

La secrezione del TNF α è regolata a livello trascrizionale, post-trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale.

La trascrizione del gene del TNF α è attivata in risposta ad un grande numero di stimoli caratteristici dell'attivazione cellulare, dell'infiammazione, delle infezioni e dello stress cellulare. Tra questi stimoli si rinvengono il segnale mediato dal calcio, come l'influsso di calcio indotto da ionofori; patogeni, come batteri e virus; mitogeni, come esteri del forbolo; stess chimici; radiazioni, come gli ultravioletti. Sono induttori della trascrizione del gene del TNF α anche ligandi per molte tipologie di recettori, tra i quali recettori per l'antigene, come il TCR (T cell receptor); PRR (pattern recognition receptors), come i Toll-like receptors;

Sol beauty

recettori per citochine, tra i quali anche entrambi i recettori per il TNFα.

Uno stretto controllo dell'espressione del gene del TNF α è assolutamente essenziale per l'omeostasi cellulare, come evidenziato dal fatto che livelli elevati di TNF α sono associati a stati patologici, quali asma, artrite reumatoide, malattie cardiovascolari, morbo di Chron, diabete di tipo 2, eczema, sclerosi multipla, psoriasi, lupus eritematoso sistemico, shock settico e svariate forme di cancro (35, 36).

Disregolazioni dell'espressone di tale gene sono anche associate ad una aumentata suscettibilità ad alcune tipologie di infezioni maggiori, tra cui la tubercolosi (quando vi sia deficit di $TNF\alpha$) o la malaria celebrale (quando vi siano elevati livelli di $TNF\alpha$) (37, 38).

Sono stati identificati, nel promotore del gene del TNF α , sei siti di legame per NFAT, quattro per Ets/Elk, due per Sp1, tre per Egr, un elemento di risposta all'AMP ciclico. Tali fattori di trascrizione giocano un ruolo fondamentale nell'espressione di tale gene (39).

Di grande importanza appare anche l'accessibilità del DNA nel contesto della cromatina (epigenetica). La trascrizione del gene del TNF α è associata con numerose coppie istone-acetiltrasferasi, che comprendono ATF-2 (40-44), CBP/p300 (45-47), p/CAF (15, 18) e GCN5 (48). Inoltre, una componente del complesso proteico rimodellante la cromatina SWI/SNF che agisce con istoni acetilati, denominato BRG1, si associa con il promotore del gene del TNF α nelle cellule monocitiche non stimolate J774, e la sua funzione consisterebbe in una preinduzione all'apertura della conformazione cromatinica (49). Altre modificazioni legate agli istoni, oltre all'acetilazione, importanti per l'espressione del gene del TNF α , sono anche metilazioni, fosforilazioni e ubiquitinazioni (50-53).

A livello traduzionale, invece, il controllo appare legato alla regione 3' non tradotta dell'mRNA del TNF α che contiene sequenze AU (AU rich elements, ARE), che predispongono per il legame da parte delle RNAsi (54).

Avvenuta la trascrizione e la traduzione del gene, il TNFα viene inizialmente sintetizzato

Sh beerfly

come una proteina transmembranaria trimerica del peso molecolare di 26 kDa (54, 55), e, successivamente, ad opera di una metalloproteinasi denominata enzima convertente il TNFα (TACE o ADAM17), avviene un clivaggio che esita nella liberazione del TNFα del peso di 17 kDa dalla membrana cellulare nel liquido interstiziale (55, 56). Tanto la forma transmembranaria quanto quella solubile sono biologicamente attive purchè rimangano nella loro forma trimerica.

I recettori del TNFa

Il TNFα esplica le proprie funzioni a livello cellulare previo legame con due distinti recettori di membrana, denominati TNF receptor 1 (TNFR1, CD120a, p55/p60) e TNF receptor 2 (TNFR2, CD120b, p77/p80) (55, 57).

Il TNFR1 è una glicoproteina transmembranaria, costituivamente espresso nella maggior parte delle cellule sia del sistema immunitario che di altri sistemi o apparati.

Al contrario, il TNFR2 e per la maggior parte rivenuto nelle cellule della linea ematopoietica e nelle cellule endoteliali e la sua espressione appare non costitutiva.

Il TNFR1, previo legame con il TNFα, forma trimeri e induce l'attivazione del suo *pathway* di segnale a livello intracellulare (58). Il TNFR1 induce l'attivazione di multiple cascate di segnale tra cui quella di NF-κB e di alcune MAPK (JNK, p38 e ERK). L'attivazione del segnale di NF-κB e delle MAPK induce l'espressione di un grande numero di geni che regolano le risposte immuni ed infiammatorie, tra cui citochine proinfiammatorie, chemochine e molecole di adesione. Al contempo, il *pathway* di NF-κB è implicato nell'espressione di molte molecole con funzione anti-apoptotica, tra cui C-FLIP e membri della famiglia del Bcl2, e numero enzimi antiossidanti come le superossido dismutasi (Cu/Zn SOD, MnSODs). Al contrario il TNFR1 è allo stesso tempo un potente attivatore dell'apoptosi, infatti recluta ed attiva la caspasi 8. L'effetto finale del TNFR1 è determinato,

dunque, da una delicata interazione tra meccanismi apoptotici ed antiapoptotici (55).

Gli eventi citoplasmatici a valle dell'attivazione del TNFR1 sono stati ampiamente descritti. Il TNFR1 contiene, nella sua porzione citoplasmatica, un dominio di morte (death domain, DD), essenziale per la trasduzione del segnale.

Dopo il legame con il TNFα, il TNFR1, una volta trimerizzato, recluta una serie di molecole, tra cui TRADD, la chinasi RIP1, TRAF2 e TRAF5, e gli inibitori dell'apoptosi cIAP1 e cIAP2, formando così un complesso molecolare di trasduzione del segnale, chiamato anche complesso I (59). La funzione di ogni molecola formante il complesso I è stata studiata a mezzo di topi knock-out. Fibroblasti embrionali di topo mancanti di RIP1 non possono attivare NF-κB e mostrano un aumento di morte cellulare in risposta a TNFα; RIP1 appare dunque come fondamentale nell'attivazione di NF-kB, ma non nell'apoptosi TNFR1-mediata. I medesimi risultati sono stati ottenuti in cellule con deficit combinato di TRAF2 e TRAF5. Recenti studi effettuati su cellule derivate da topi con deficit di TRADD dimostrano che tale molecola è un adattatore del segnale indotto da TNFR1 (60). Tali studi comprovano una significativa riduzione del segnale proinfiammatorio legato ai pathway di NF-κB e di MAPK, ma non una completa abolizione, in assenza di TRADD; d'altra parte l'apoptosi TNFR1mediata, in assenza di TRADD, è completamente abrogata. Da ciò si evince che TRADD gioca un ruolo cruciale nell'apoptosi TNFR1-mediata, ed un effetto non completamente indispensabile nel segnale proinfiammatorio. TRADD rivestirebbe anche un ruolo chiave nella formazione del complesso I. Più recentemente, è stata riconosciuta, nella trasduzione del segnale indotta da TNFR1, l'implicazione delle proteine inibitrici dell'apoptosi cIAP1 e cIAP2, tuttavia il loro meccanismo dal punto di vista molecolare non è stato ancora debitamente chiarificato.

L'ubiquitinazione delle proteine sembra potrebbe rivestire un ruolo di prim'ordine nella trasduzione del segnale TNFR1 mediata (61).

Sh beerft

L'apoptosi indotta da TNFR1 è mediata dall'assemblaggio di un complesso intracitoplasmatico, denominato complesso II. Il Complesso II si forma in seguito alla dissociazione dalla membrana plasmatica (e, quindi, dal TNFR1) del complesso I (62). Nell'ambito del complesso II, TRADD, TRAF2 e RIP1 deubiquitinato hanno la possibilità di interagire con FADD, una molecola che, oltre il suo death domain, è in grado di interagire con altre proteine contenenti DD. Il meccanismo finale consiste nell'attivazione della caspasi 8, che porta all'apoptosi.

Per prevenire un'incontrollata aggregazione in trimeri e conseguente attivazione, TNFR1 viene mantenuto in forma monomerica dalla proteina SODD. In seguito al legame tra il TNF α e il TNFR1, SODD si dissocia dal TNFR1 consentendo, pertanto, la trasduzione del segnale (55).

Il TNFR2, che viene attivato in maniera preferenziale dalla forma transmembranaria piuttosto che dalla forma solubile di TNF α (49), manca, invece, di un DD, e sembrerebbe, pertanto, mediare in maniera prevalente segnali di attivazione, proliferazione e migrazione cellulare (63-65).

Sono stati realizzati modelli animali ingegnerizzati con difetti di espressione del TNF α o dei TNFR che hanno contribuito in maniera determinante a comprendere più a pieno gli effetti del TNF α e dei suoi recettori.

Topi con deficit di TNF α hanno evidenziato il ruolo fisiologico di tale citochina nella microarchitettura degli organi linfoidi secondari e nella loro funzione, nonchè nella difesa dell'ospite nei confronti di infezioni (66). Tali effetti sono stati collegati con le funzioni svolte dal TNFR1 (67-69).

Gli studi condotti in topi appositamente mutati per una sovra-produzione di TNF α hanno senz'altro approfondito la conoscenza degli effetti dannosi di tale citochina nell'ambito delle patologie immunomediate, ma hanno anche rilevato, d'altro canto, una importante funzione

Sh beerfly

immunomodulante di tale citochina nel contesto di patologie autoimmuni.

Una deregolata iperproduzione di TNF α è già di per se sufficiente, nel topo transgenico, a determinare un'infiammazione muti-organo o tessuto-specifica, che si manifesta con patologie rassomiglianti all'artrite reumatoide (70, 71), alle malattie infiammatorie croniche intestinali (71) o alla sclerosi multipla (72). La specifica patologia che si viene a determinare in questi topi sembrerebbe conseguente ad alcuni fattori riguardanti la produzione del TNFα, come la localizzazione di tale produzione in tessuti specifici, il contesto cellulare, la bioattività e la cronicità. Inoltre, topi transgenici esprimenti un TNFR1 "iperattivo" presentano un'aumentata risposta immunitaria dell'ospite nei confronti di insulti infettivi, ma sviluppano spontaneamente patologia epatica ed hanno un'aumentata suscettibilità ad infiammazioni ed autoimmunità. Tali riscontri inducono a pensare che la modulazione dell'attività del TNFR1 sia fondamentale nella funzione del TNFα (73). Nell'uomo, mutazioni riguardanti il TNFR1 sono state associate con lo sviluppo di sindromi periodiche TNFRassociate, caratterizzate da episodi di febbre ed infiammazione localizzata (74). Risulta altrettanto ragionevole supporre che gli effetti dannosi del TNFα possano insorgere quando siano aboliti i meccanismi aventi lo scopo di armonizzare gli effetti benefici e quelli pericolosi di tale citochina.

Tuttavia, l'ipotesi che una sostenuta attività del TNF α risulti sempre in una patologia autoimmune o infiammatoria non è sempre confermata. In modelli di autoimmunità sistemica o di diabete tipo 1, il TNF α appare promuovere o inibire la patologia autoimmunitaria sottostante in dipendenza di alcuni fattori quali lo stato di sviluppo della malattia, il background genetico dell'ospite ed il timing dell'espressione del TNF α (75-78).

Entrambi i recettori per il TNF α possono lasciare la membrana cellulare, andando a costituire le forme solubili, con la probabile funzione di inattivare TNF α circolante (32).

Un riassunto delle funzioni di TNFR1 e TNFR2 è riportato in Figura 1.

Sh been h

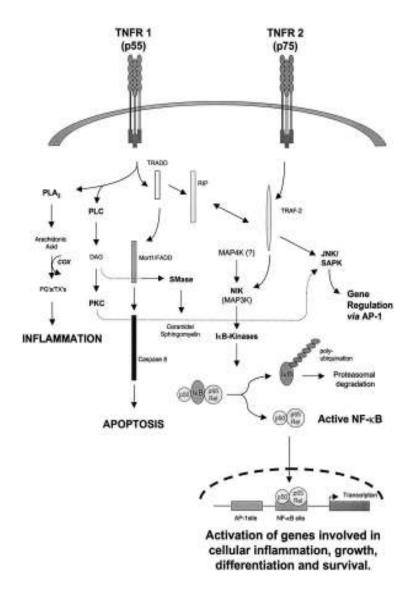


Figura 1: Pathways di segnale indotti dai TNFRs dopo essere stati attivati dal TNF. Questa figura mostra il reclutamento di svariate proteine al TNFR1 o al TNFR2. Queste includono: tumor receptor associated death domain protein (TRADD), receptor interactin protein (RIP), TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) and Fas-associated death domain protein (FADD, anche detto Mort1). Il reclutamento di queste proteine si associa all'attivazione di numerosi *pathways* di segnale che culminano nell'infiammazione, nell'apoptosi ed in multiple attivazioni genetiche, come mostrato. Il *pathway* della fosfolipasi A2 comprende: la cicloossigenasi (COX), le prostaglandine (PGs) e i trombossani (TXs). Il *pathway* della fosflipasi C (PLC) comprende: diacilglicerolo (DAG), sfingomielinasi (SMase) e protein chinasi C (PKC). Il *pathway* della chinasi attivata dal mitogeno (MAPK) comprende: chinasi inducente NfkB (NIK), i sottotipi p50 e p65 del fattore di trascrizione di NF-kB e complesso proteico citosolico ancorante NFkB (IkB). Un *pathway* alternativo di TRAF 2 o PKC è rappresentato dalla chinasi Janus N-terminale/proteina chinasi attivata dallo stress (JNK/SAPK).

(modificato da Sack MN et al. Cardiovasc Res 2000 45:688-695)

Sh bearfu

Attività biologiche del TNFa

Dal punto di vista sistemico, la principale funzione biologica del TNF α consiste nel facilitare il reclutamento di neutrofili e monociti nei siti di infezione e di attivarne le funzione fagocitiche (32). Tali effetti sono il risultato di un'azione combinata sulle cellule endoteliali e sui leucociti. Nelle cellule endoteliali, infatti, vengono espresse, in risposta a tale citochina, molecole di adesione (integrine e selectine, in particolare) che, in una prima fase, ancorano i neutrofili, e, successivamente, anche linfociti e monociti. Inoltre, nelle cellule endoteliali come nei macrofagi, il TNF α induce la formazione di chemochine le quali, a loro volta, favoriscono il reclutamento di leucociti. Come dimostrato utilizzando topi knock-out per il gene del TNF α , tale citochina svolge un ruolo fondamentale nella resistenza alle infezioni. Tuttavia, il TNF α contribuisce in maniera importante nella patogenesi di reazioni flogistiche locali dannose per l'ospite (come avviene in svariate malattie autoimmunitarie).

Nel corso di infezioni gravi, il TNF α viene prodotto in quantità maggiori, svolgendo, di fatto, funzioni endocrine che possono provocare alterazioni tissutali e manifestazioni cliniche sistemiche.

In particolare a livello dell'ipotalamo, induce la febbre: per tale ragione, questa citochina e stata denominata "pirogeno endogeno" (per differenziarlo dall'LPS, denominato, invece, "pirogeno esogeno"). Sull'ipotalamo, nell'induzione della febbre, il TNFα (come anche l'IL-1) agisce aumentando la produzione di prostaglandine.

Sugli epatociti agisce (in concerto con IL-1 e IL-6) aumentando la produzione di alcune proteine, dette reattanti di fase acuta, quali il fibrinogeno e la proteina amiloide A del siero.

Una produzione sostenuta di TNF α provoca le condizioni metaboliche tipiche della cachessia, una condizione clinica caratterizzata da una significativa perdita di tessuto muscolare e adiposo. Il TNF α induce cachessia soprattutto perché determina anoressia, ma anche perché e in grado di inibire la lipoprotein-lipasi, un enzima necessario per la liberazione

Sol bearly

degli acidi grassi liberi dalle lipoproteine circolanti e per il loro utilizzo periferico.

Quando elevate concentrazioni di TNFα vengono introdotte nel sangue (concentrazioni sieriche maggiori di 10⁻⁷ M), la contrattilità del miocardio ed il tono della muscolatura vascolare risultano inibiti, con importante calo pressorio e l'instaurarsi di una vera e propria condizione di shock.

Il TNFα provoca anche trombosi intravascolare, in particolare a mezzo dell'inibizione dei fattori anticoagulanti propri dell'endotelio. Tale citochina, infatti, induce l'espressione, sulle cellule endoteliali, di tissue factor (TF), un potente attivatore della cascata coagulativa, ed inibisce l'espressione di trombomodulina, la quale serve ad arrestare la cascata coagulativa. La situazione è ulteriormente complicata dal reclutamento dei neutrofili, che favorisce l'intasamento vascolare (l'effetto necrotizzante sui tumori sarebbe, appunto, principalmente dovuto a queste proprietà).

Sempre ad alte concentrazioni, il TNF α provoca importanti turbe metaboliche, quali ipoglicemia severa, persino a livelli non compatibili con la vita. Tale effetto sarebbe mediato da una parte dall'eccessivo utilizzo periferico di glucosio, e dall'altra parte dall'incapacità da parte degli epatociti di introdurre in circolo glucosio in maniera efficace.

Lo shock settico è una sindrome che sovente complica gravi sepsi da batteri Gramnegativi, caratterizzata da collasso cardio-circolatorio, coagulazione intravascolare disseminata ed alterazioni metaboliche. Lo shock settico sembra causato dall'induzione da parte del LPS di una massiccia produzione di TNFα e di altre citochine proinfiammatorie, quali l'IL-12, l'IFN-γ e l'IL-1. Le concentrazioni plasmatiche di TNFα possono risultare un valore predittivo dell'esito dell'infezione da batteri Gram-negativi: questo rappresenta uno dei rari casi in cui la misurazione del livello sierico di una citochina può offrire un'informazione clinica preziosa. Lo shock settico può essere riprodotto sperimentalmente, infondendo in animali da laboratorio LPS o TNFα. Anche se nei modelli sperimentali gli antagonisti del

Sh beerfly

TNF α possono prevenire la morte, la sperimentazione clinica condotta con anticorpi monoclonali anti- TNF α e recettori solubili del TNF α nei pazienti con sepsi non ha dato i risultati sperati. Tale fallimento terapeutico sarebbe imputabile alla ridondanza delle citochine, vale a dire alla capacità di molte citochine di svolgere un'azione simile in tutto o in parte a quella del TNF α .

Ruolo del TNFa nella patogenesi dello scompenso cardiaco

Dal punto di vista fisiopatologico, la riduzione della gittata cardiaca stimola la produzione di svariati mediatori neuro-ormonali quali adrenalina, noradrenalina, renina, angiotensina e aldosterone, che danno un importante contributo nella compensazione a breve termine del deficit di pompa miocardica (79). Tuttavia, a lungo termine, questi neuro-ormoni hanno un effetto peggiorativo sulla funzione cardiaca, dovuto alla loro diretta o indiretta tossicità sul tessuto miocardico (80-82). Questi fattori di compensazione, quando cronicamente elevati, rappresentano un fattore predittivo negativo. Sono dunque entrati nella pratica clinica una serie di farmaci che bloccano l'effetto lesivo di tali mediatori (ACE-inibitori, beta-bloccanti e antagonisti dell'aldosterone).

Parimenti, si è profuso molto impegno per continuare a trovare farmaci che blocchino gli effetti lesivi sul miocardio di un grande numero di molecole circolanti, correlate con un peggioramento, nel tempo, della funzione cardiaca nei pazienti effetti da scompenso cardiaco. Uno di questi mediatori è il TNF α , citochina ritrovata in alte concentrazioni nel sangue di pazienti affetti da insufficienza cardiaca (83). Il fatto che alcune citochine (oltre al TNF α , anche l'IL-6) siano elevate nell'insufficienza cardiaca, suggerisce che possano giocare un ruolo simile nella patogenesi di questa malattia, in un modo simile ai neuro-ormoni, come la noradrenalina.

Sh been h

E' interessante notare come il TNF α può essere secreto, in particolari condizioni, anche dai cardiomiociti, suggerendo una peculiare funzione di questa citochina nella biologia e nella funzione del miocardio (84). Tale secrezione cardiomiocitaria non è costitutiva, ma viene attivata in quasi tutte le condizioni di insulto cardiaco, come miocarditi, infarto miocardico, angina instabile, insufficienza cardiaca, sovraccarico pressorio ed altri (85). Da questo punto di vista, le citochine pro-infiammatorie potrebbero rappresentare parte di una risposta intrinseca aspecifica del cuore agli stress. Sono stati identificati due grandi stimoli biologici che portano ad un aumento dell'espressione di TNF α in risposta ad insulto cardiaco: un aumento dello stress di parete (come dimostrato in studi su cardiomiociti isolati) (86, 87) ed elevati livelli di neuro-ormoni (88).

E' stato oggetto di studio anche l'effetto diretto del TNF α sul cuore. Iniezioni di TNF α direttamente nel miocardio provocano ipotensione, acidosi metabolica e morte, in modo simile a quanto si verifica nello shock settico (89). Su modelli animali, sono state anche infuse, per via intraperitoneale, concentrazioni di TNF α simili a quelle che si riscontrano nel sangue periferico dei malati di insufficienza cardiaca. Il risultato di questi studi ha dimostrato che una continua infusione di TNF α porta ad una depressione della funzione del ventricolo sinistro tempo dipendente (parametro valutato ecocardiograficamente), accorciamento delle fibre miocardiche e dilatazione del ventricolo sinistro, parzialmente reversibile dopo sospensione dell'infusione. Lo stesso esperimento è stato effettuato infondendo anche agenti anti- TNF α : in questo caso gli effetti dannosi del TNF α sono apparsi più limitati (90). Nei cani, singole infusioni di TNF α danneggiavano la funzione sistolica e diastolica per almeno 6 ore dopo l'infusione, ma apparivano completamente reversibili dopo 72 ore (91). Studi simili, sempre su cani, lasciano ipotizzare un effetto bifasico del TNF α : inizialmente infatti, durante la prima ora dall'infusione, la funzione cardiaca avrebbe un incremento, in seguito si assisterebbe ad una sua depressione (92). Studi che hanno utilizzato topi transgenici con

iperespressione del TNF α specificatamente limitata al cuore hanno dimostrato che tale sovraespressione indurrebbe diminuzione della contrattilità del ventricolo sinistro, in modo dipendente dal dosaggio genico (93). Un'iperespressione della forma transmembranaria del TNF α è legata a sviluppo di ipertrofia concentrica, ed un successivo rilascio della molecola dalla membrana stessa ad opera di ADAM17 porta a dilatazione cardiaca e a scompenso (94). D'altro canto, però, il TNF α ha effetti citoprotettivi sul miocardio, come evidenziato da aumenti dell'area di infarto e da un maggior tasso di apoptosi in topi *knock out* per i TRNRs (95). Ulteriori indagini hanno messo in luce l'importanza di NF- κ B come mediatore intracellulare protettivo del TNF α (96).

Gli effetti inotropi negativi del TNFα sono stati collegati con l'attività del TNFR1 (97), mentre l'effetto citoprotettivo sembrerebbe mediato da entrambi i recettori (95). L'attivazione di NF-κB sembra giocare un ruolo di prim'ordine nell'upregulation di alcune proteine citoprotettive quali la manganese superossido dismutasi (MnSOD) e delle heat shock proteins (85).

Gli effetti deleteri del TNFα sul miocardio possono essere suddivisi in una componente immediata e in una componente ritardata (98). La componente immediata si estrinseca nel giro di pochi minuti ed è il risultato dell'attivazione del *pathway* della sfingomielinasi neutra (99) e delle modificazioni delle correnti del calcio (100).

Il pathway ritardato richiede invece da ore a giorni per instaurarsi e sarebbe mediato dall'attenuarsi del segnale β -adrenergico indotto da ossido nitrico (NO) (101). Inoltre, l'ipertrofia dei miociti, l'espressione di geni fetali, la progressiva perdita (per apoptosi) dei cardiomiociti e l'inizio della disfunzione endoteliale sembrano giocare un ruolo essenziale negli effetti sfavorevoli del TNF α sulla funzione cardiaca (93, 102, 103). Infine, la dilatazione del ventricolo sinistro indotta da TNF α potrebbe essere mediata dall'attivazione di metalloproteasi, con conseguente riorganizzazione strutturale dei cardiomiociti (104).

Sh beerfly

Per i dati attualmente a disposizione, nonostante sembri evidente un'attività miocardio-protettiva del TNF α , esiste una prevalente evidenza che supporta l'ipotesi di un effetto dannoso di tale citochina sulla progressione dello scompenso cardiaco.

Un'ulteriore prova a favore di tale ipotesi proviene da studi sperimentali nei quali non solo è stato evidenziato un aumento di TNF α nel sangue periferico dei pazienti affetti da scompenso cardiaco, ma anche come la concentrazione di tale citochina sarebbe direttamente correlata con la classe NYHA del paziente (105). Inoltre, le concentrazioni di TNF α e di IL-6 nel sangue periferico, insieme alle concentrazioni di TNFR1 e TNFR2 solubili, si sono dimostrate fattori predittivi per la prognosi dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca (106). Inoltre alcuni studi (106-108) hanno riportato che nell'insufficienza cardiaca determinate molecole proinfiammatorie come il TNF α sono secrete prima rispetto ai classici neuro-ormoni, che appaiono invece essere attivati più tardi nella storia naturale di malattia (109), suggerendo un'importante interrelazione tra il classico sistema neuro-ormonale ed i mediatori proinfiammatori.

A tal proposito, concentrazioni di angiotensina II fisiopatologicamente rilevanti sono sufficienti ad attivare la trascrizione del gene del TNF α nel cuore adulto tramite un *pathway* dipendente da NF- κ B (88). Di conseguenza, il trattamento con ACE-inibitori ha diminuito nel breve termine l'espressione di mediatori infiammatori nel modello animale di infarto cronico (110). In studi clinici, trattamenti a lungo termine con ACE-inibitori e bloccanti del recettore dell'angiotensina II sono risultati efficaci nel ridurre la concentrazione delle citochine proinfiammatorie come il TNF α e/o molecole di adesione cellulare (ICAM-1 e PECAM-1) in pazienti con scompenso cardiaco (111, 112). Simili risultati sono stati ottenuti con l'uso di antagonisti β 1 selettivi nel modello sperimentale di remodelling del ventricolo sinistro postinfartuale (113).

I dati clinici e sperimentali suggeriscono dunque che il TNFα non solo rappresentea un

Sh bearful

biomarker del livello di scompenso cardiaco, ma può anche contribuire al decorso della malattia, come accade per i classici mediatori neuro-ormonali.

Il ruolo patogenetico del TNFα nello scompenso cardiaco è riassunto in Figura 2.

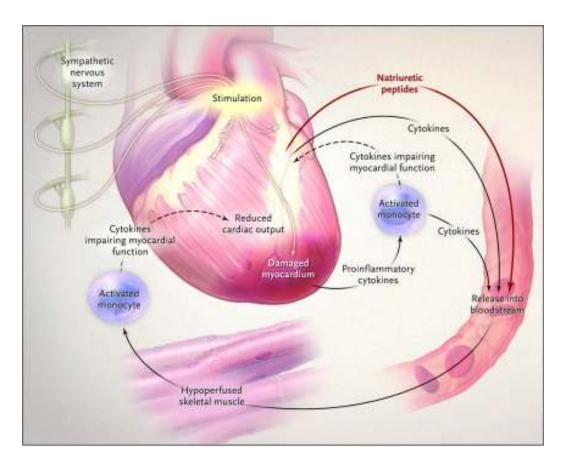


Figura 2: Il TNFα, assieme ad altre citochine pro-infiammatorie, riveste un ruolo centrale nella patogenesi dello scompenso cardiaco: rilasciato in circolo direttamente dal tessuto miocardico danneggiato, determinrebbe l'attivazione del sistema monocito-macrofagico con amplificazione della risposta infiammatoria ed alterazioni morfo-funzionali tipiche dello scompenso. Il rilascio di TNFα sarebbe responsabile delle alterazioni periferiche con ipoperfusione tissutale, che in sinergia con l'attivazione neuro-ormonale (noradrenalina, renina, aldosterone ed angiotensina) andrebbe ad innescare il circolo vizioso del rimodellamento cardiaco (attivazione di metalloproteinasi – MMP), rilascio di sostanze ossedianti (ROS), ritenzione di sodio e liquidi, e conseguente aumento del lavoro e del consumo di ossigeno miocardico, con progressione dello scompenso. (modificato da Braunwald E. *N Engl J Med 2008; 358: 2148-59*)

Sol bearful

4. FARMACI ANTAGONIZZANTI IL TNFα

Dalla fine degli anni novanta sono entrati nella pratica clinica farmaci biotecnologici in grado di legarsi con alta specificità ed affinità al TNF α , sia esso libero oppure legato ai recettori di membrana, inibendone le attività biologiche. Tali farmaci rappresentano un'opzione terapeutica senza precedenti per il trattamento di malattie infiammatorie croniche sostenute dal TNF α , come le malattie infiammatorie croniche dell'intestino, la psoriasi e le poliartriti infiammatorie, e rappresentano un arma terapeutica essenziale per ottenere la remissione clinica e radiologica, con blocco dell'evoluzione verso la disabilità permanente. I farmaci anti-TNF α possono essere suddivisi in anticorpi monoclonali anti-TNF α (infliximab, adalimumab, golimumab), o proteine di fusione che espongono il recettore tipo 2 per il TNF α (etanercept).

Dalla prima autorizzazione dei farmaci anti-TNF α per uso clinico nel 1998, oltre 2.000.000 di pazienti in tutto il mondo sono stati trattati con tali farmaci per le molteplici indicazioni terapeutiche che sono state via via approvate, come l'artrite reumatoide, le malattie infiammatorie croniche intestinali, l'artropatia psoriasica, l'artrite idiopatica giovanile, la psoriasi a placche, la spondilite anchilosante e l'uveoretinite associata a malattia di Behcet (quest'ultima indicazione solo in Giappone). Gli antagonisti del TNF α hanno segnato una nuova era nel trattamento di queste malattie, che affliggono circa il 2-3% della popolazione. Questi farmaci hanno dimostrato una notevole efficacia ed un accettabile profilo di sicurezza a lungo termine (114).

Nell'Aprile 2009 risultava che circa 1.100.000 pazienti in tutto il mondo erano stati trattati con infliximab, 550.000 pazienti con etanercept e 350.000 pazienti con adalimumab. Certolizumab pegilato e golimumab sono stati introdotti in commercio solo recentemente e, per tale ragione, l'esperienza clinica riguardo a questi ultimi farmaci è ancora molto limitata.

Sol been h

I cinque farmaci anti- $TNF\alpha$ attualmente in commercio e le rispettive indicazioni sono mostrati in Tabella II.

Tabella II: antagonisti del TNFα autorizzati e indicazioni approvate negli USA (FDA), Europa (EMEA) e Giappone.

Farmaco	Classe	PM (KDa)	Uso	Struttura		Indicazioni approvate
Infliximab (Remicade®)	MoAb	149	e.v.	Back Property of the Control of the	Anti- TNFα IgG1 ricombinante chimerico (umano-murino)	Artrite reumatoide, morbo di Crohn, colite ulcerosa, spondilite anchilosante, psoriasi, artrite psoriasica, malattia di Behcet
Adalimumab (Humira®)	MoAb	148	s.c.	To Taylor	Anti- TNFα IgG1 ricombinante completamente umano	Artrite reumatoide, artrite idiopatica giovanile, morbo di Crohn, colite ulcerosa, spondilite anchilosante, psoriasi, artrite psoriasica
Golimumab (Simponi®)	MoAb	147	s.c.	France France	Anti- TNFα IgG1 ricombinante completamente umano	Artrite reumatoide, spondilite anchilosante, artrite psoriasica
Certolizumab pegol (Cimzia®)	Fab' frag	40	s.c.	Hernanced Province COPIni onamie COPIni Projection (S. Projection of S. Pr	Frammento Fab ricombinante umanizzato e peghilato di un anti- TNFα IgG1	Artrite reumatoide, morbo di Crohn
Etanercept (Enbrel®)	Proteina di fusione	150	s.c.	Harrian Fort	Recettore per TNF α tipo 2 (TNFR2) legato al frammento Fc di una IgG1	Artrite reumatoide, artrite idiopatica giovanile, spondilite anchilosante, psoriasi, artrite psoriasica



I principali meccanismi di azione terapeutica, che non sono del tutto distinti tra loro e possono sovrapporsi, includono i seguenti: riduzione di citochine proinfiammatorie, attenuazione della permeabilità vascolare e dell'angiogenesi, deattivazione delle cellule endoteliali, delle cellule epiteliali, delle cellule dendritiche, dei miofibroblasti e degli osteoclasti, aumento dei linfociti T regolatori nel sangue, e diminuito reclutamento di cellule infiammatorie dal sangue ai tessuti infiammati (115, 116). Questi meccanismi, e probabilmente altri che verranno scoperti in futuro, agirebbero a differenti livelli nelle differenti malattie, come anche nei differenti pazienti affetti dalla stessa patologia.

Gli antagonisti del TNF α lavorano direttamente neutralizzando l'attività del TNF α solubile e prevenendo la sua interazione con i suoi recettori. Inoltre, le gli anticorpi monoclonali anti-TNF α sarebbero in grado di indurre citotossicità complemento-dipendente (CDC) ed anticorpo-dipendente (ADCC) attraverso il legame con il TNF α transmembranario espresso sui vari tipi cellulari (117). Inoltre, questo legame può interferire con la trasduzione del segnale intracellulare, con il risultato di indurre apoptosi, arrestare la produzione di citochine e/o la crescita cellulare (118-121).

Oltre al TNF α , etanercept è in grado di neutralizzare la linfotossina (mentre gli anticorpi monoclonali anti- TNF α non hanno questa proprietà), inibendo anche le funzioni di questa molecola (122).

Gli studi in vitro sugli antagonisti del TNF α hanno prodotto risultati abbastanza mutevoli, in particolare a causa delle differenze nelle condizioni sperimentali. Alcuni studi hanno messo in luce differenze tra gli antagonisti del TNF α nel legare la forma solubile piuttosto che la forma transmembranaria di TNF α , con conseguenti differenze nella proprietà di indurre apoptosi (119, 122-124). Un studio indirizzato a comprendere la specificità di legame dei farmaci anti-TNF α verso TNFR1 e TNFR2 (125), ha dimostrato come infliximab, adalimumab e certolizumab sarebbero in grado di neutralizzare in egual misura la trasduzione del segnale

Sal bearful

indotta da TNF α transmembranario sia attraverso TNFR1 che attraverso TNFR2, ma certolizumab sarebbe due volte più potente nel neutralizzare la trasduzione del segnale da TNF α solubile attraverso entrambi i recettori rispetto a infliximab ed adalimumab.

In un sistema sperimentale di mieloma NS0 che esprime TNFα transmembranario, è stato dimostrato come etanercept legherebbe una quota minore di molecole di TNFα rispetto ad infliximab, adalimumab e certolizumab (117). Tuttavia, solo etanercept, infliximab ed adalimumab sono in grado di indurre citotossicità complemento- e anticorpo-mediata, mentre certolizumab non esibisce queste capacità in quanto manca della porzione Fc.

In altri modelli sperimentali, infliximab ed adalimumab esibiscono una maggiore proprietà di indurre citotossicità complemento-mediata rispetto a etanercept (124, 126).

D'altro canto, come dimostrato in un recente studio caratterizzato da differenti condizioni sperimentali, sebbene le proprietà leganti di etanercept, adalimumab ed infliximab siano tutto sommato simili per la forma solubile di TNF α , e molto simili per la forma transmembranaria di TNF α , nessuno dei tre farmaci esibisce capacità di indurre citotossicità complemento-mediata nei fagociti mononucleati attivati normali del sangue periferico umano (127).

Infine, in cellule di Jurkat che esprimono una forma non clivabile di TNF α transmembranario, la trasduzione inversa del segnale attraverso il TNF α transmembranario sarebbe indotta da adalimumab ed infliximab, ma non da etanercept: ciò spiegherebbe almeno in parte la differenza di efficacia nel morbo di Chron (126).

Oltre alle differenti proprietà farmacodinamiche i diversi anti-TNF α ad oggi in commercio (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab e certolizumab) differiscono nella modalità di somministrazione (endovena o sottocute), nei dosaggi ed intervalli di somministrazione in dipendenza delle proprietà farmacocinetiche, oltre che al profilo di immunogenicità; tutte caratteristiche che possono influenzare la loro efficacia e soprattutto il loro profilo di sicurezza. (128, 129).

Sh beerft

Indicazioni terapeutiche per l'utilizzo degli anti-TNFa

Tra le prime indicazioni terapeutiche per l'utilizzo degli anti-TNFα, l'atrite reumatoide è stata drammaticamente influenzata dall'introduzione di tali farmaci. Infatti nonostante la disponibilità sin dagli anni ottanta di diversi farmaci immunosoppresori in grado di modificare il decorso della patologia (disease modifing anti-rheumatic drugs – DMARDs), come il methotrexate, la ciclosporina A, in monoterapia o in terapia combinata, in quasi il 50% dei pazienti si osservava l'inarrestabile evoluzione verso il danno strutturale articolare e la progressiva disabilità permanente.

Gli antagonisti del TNF α somministrati in monoterapia sono efficaci in misura analoga al methotrexate nel sopprimere l'infiammazione e nel migliorare la prognosi dei pazienti affetti da artrite reumatoide. Tuttavia, questi farmaci sono più potenti del methotrexate nel ridurre la progressione del danno strutturale articolare (128).

La combinazione degli antagonisti del TNF α con methotrexate rappresenta probabilmente la prima terapia che abbia permesso di ragiungere la remissione di malattia nei pazienti affetti da artrite reumatoide. Molti trials clinici randomizzati hanno mostrato in maniera convincente che l'aggiunta di un antagonista del TNF α ad una terapia con methotrexate offre risultati migliori in ogni aspetto di malattia rispetto alla terapia con solo methotrexate. Lo stesso succede quando la terapia con antagonisti del TNF α viene confrontata con placebo in pazienti in cui il trattamento con DMARDs

abbia fallito. In questi trials la remissione di malattia è stata raggiunta in circa il 40% dei pazienti (130).

L'artrite idiopatica giovanile si riferisce a un gruppo eterogeneo di patologie (7 sottotipi) che hanno in comune la presenza di artrite infiammatoria cronica.

Nonostante il trattamento a lungo termine, molti pazienti non hanno miglioramenti clinici e subiscono significative limitazioni funzionali in età adulta. I farmaci antiinfiammatori non



steroidei (FANS) sono efficaci solo nel 25% dei pazienti, e i corticosteroidi andrebbero evitati, quando possibile, per i loro effetti deleteri sulla crescita e sull'apparato scheletrico. Dei DMARDs utilizzati negli adulti, solo il metotrexate è stato approvato nei bambini. Il metotrexate è dunque diventato la pietra miliare in particolare del trattamento delle forme poliarticolari simili all'artrite reumatoide dell'adulto. Più del 50% dei pazienti con artrite idiopatica giovanile poliarticolare raggiunge un completo controllo di malattia con antagonisti del TNFα, come confermato da un miglioramento del 70%, in accordo ai criteri di risposta pediatrica stilati dall'American College of Rheumatology, inclusi i pazienti che non avevano tratto beneficio dalla monoterapia con metotrexate (131-134). Questi farmaci hanno anche la capacità di rallentare il danno radiologico ed aumentare la densità ossea. In questa malattia esiste un'esperienza clinica maggiore per adalimumab ed etanercept, dal momento che gli altri anti-TNFα non sono ancora approvati per questa indicazione. Alte dosi di etanercept sembrano offrire un importante beneficio in casi più difficili (135), mentre prove sperimentali indicano che alte dosi di infliximab siano associate con aumento di eventi avversi (136). Per quanto riguarda le altre forme di artrite idiopatica giovanile, adalimumab, infliximab ed etanercept sono efficaci nella forma di artrite entesite-relata (spondiloartropatia giovanile), ma non significativamente efficaci nella forma sistemica (131-138).

Prima dell'introduzione dei farmaci antagonisti del TNF α , la terapia farmacologica della spondilite anchilosante si è basata fondamentalmente su FANS.

Tuttavia, dosi piene di indometacina, il più comune FANS prescritto per la spondilite anchilosante, offrono gradi di risposta abbastanza bassi. I corticosteroidi e i DMARDs hanno dimostrato di offrire un lieve beneficio nel trattamento della spondilite anchilosante, ma non hanno proprietà di modificare la storia naturale di malattia. Molti trials, utilizzando etanercept (139), infliximab (140), adalimumab (141) e golimumab (142), hanno dimostrato chiaramente che gli antagonisti del TNFα migliorano i segni, i sintomi, la funzionalità e la qualità di vita

Sh bearfu

dei pazienti affetti da spondilite anchilosante. La portata della risposta a breve termine per i 4 farmaci sopra elencati appare simile. Gli effetti benefici degli antagonisti del TNF α includono un importante miglioramento della mobilità toraco-addominale durante gli atti del respiro, che spesso, nei pazienti affetti da questa spondiloartrite, risultano difficoltosi (143). Inoltre, i dati proveniente da trials clinici suggeriscono che i flare di uveite ricorrono meno frequentemente sotto trattamento con farmaci anti- TNF α rispetto ai pazienti trattati con placebo (144).

I trattamenti farmacologici tradizionali per psoriasi e artropatia psoriasica sono in larga parte simili a quelli utilizzati nell'artrite reumatoide, inclusi i DMARDs (in particolare metotrexate e ciclosporina A), che hanno però prodotto al massimo risposte parziali. Molti trials randomizzati hanno mostrato che gli antagonisti del TNF α sono efficaci nel trattamento dei pazienti con psoriasi e artropatia psoriasica di grado da moderato a grave, producendo miglioramenti significativi e rapidi sia per le manifestazioni articolari che per quelle cutanee e riducendo la disabilità. Infliximab (145), adalimumab (146), golimumab (147) ed etanercept (148) inducono un rilevante miglioramento clinico nella maggior parte dei pazienti, inclusi quelli che hanno fallito una terapia con metotrexate. L'efficacia sull'artrite periferica si è dimostrata simile a quella ottenuta per l'artrite reumatoide. Anche le entesiti e le dattiliti sono notevolmente migliorate sotto terapia con antagonisti del TNF α , e anche il danno strutturale articolare appare rallentato. Tuttavia, non si sono riscontrati, rispetto a placebo, cambiamenti significativi nelle manifestazioni radiologiche tipiche di malattia, come le dita a penna di calamio, osteolisi e periostiti, probabilmente perché esse rappresentano manifestazioni croniche ormai non migliorabili di malattia. Parrebbe che tutti gli antagonisti del TNFa abbiano efficacia comparabile (149). La terapia con antagonisti del TNF α è indicata, in accordo con i trials clinici, nei pazienti affetti da psoriasi refrattaria a protocolli farmacologici tradizionali, come nei pazienti con artrite psoriasica attiva che non è debitamente controllata da FANS in caso di malattia assiale e da DMARDs in caso di malattia periferica (149, 150).



La prima indicazione approvata di un antagonista del TNF α è stata il morbo di Chron. Nel primo trial clinico effettuato su infliximab, 1'81% dei pazienti che avevano ricevuto terapia con infliximab 5 mg/kg hanno avuto risposta clinica a 4 settimane, ed il 33% dei pazienti trattati con infliximab ha raggiunto remissione rispetto al 4% nel gruppo di pazienti trattati con placebo (151). Trials successivi, in cui sono stati testati infliximab, adalimumab e certolizumab (152, 153), hanno confermato la grande efficacia di questa classe di farmaci nell'indurre remissione in una significativa percentuale di pazienti con morbo di Chron da moderato a grave.

Anche le manifestazioni extraintestinali, quali uveiti, episcleriti, artrite o pioderma gangrenoso (154) possono rispondere agli inibitori del TNFα. Etanercept non si è dimostrato efficace confrontato con placebo alla settimana 4 e 8 (155).

Le evidenze dell'efficacia di questi farmaci nella rettocolite ulcerosa (RCU) sono invece scarse. Il primo farmaco antagonista del TNFα indicato nella RCU è stato infliximab (156), recentemente anche adalimumab ha ottenuto l'approvazione per il trattamento.

Nel primo studio in un piccolo gruppo di pazienti con uveoretinite, con pericolo di perdita della vista associata a morbo di Behcet, vi è stata una soppressione dell'infiammazione oculare dopo terapia con infliximab nell'arco di 24 ore dall'infusione (157). Altre evidenze simili sono state raccolte nel tempo portando all'approvazione, in Giappone, di infliximab per il trattamento del morbo di Behcet complicata da uveoretinite refrattaria che non risponde alle terapia convenzionali (Osaka, Giappone, 26 Gennaio 2007, JCN Newswire). Infliximab è anche efficace nelle manifestazioni extraoculari per i pazienti trattati per uveoretinite, come ulcere orogenitali refrattarie, artrite, intestinali, coinvolgimento del sistema nervoso centrale e aneurismi dell'arteria polmonare.

Sal bearfu

Profilo di sicurezza e controindicazioni

I problemi di sicurezza emersi nei primi anni di esperienza clinica degli antagonisti del TNF α includono infezioni, malattie autoimmuni, malattia demielinizzante, neoplasie e scompenso cardiaco. Globalmente, queste condizioni patologiche, nei trial clinici, non si ritrovano aumentate in modo significativo in corso di trattamento con farmaci antagonisti del TNF α rispetto al trattamento con placebo. Tuttavia, studi estesi, casi clinici riportati in letteratura e dati di farmacosorveglianza hanno evidenziato gli effetti deleteri del bloccare il ruolo protettivo del TNF α .

I principali problemi di sicurezza legati ai farmaci anti- TNFα sono riassunti in Tabella III.

Tabella III. Problemi di sicurezza degli anti-TNF α .

Controindicazioni relative

Tubercolosi latente

Epatite B

Epatite C

ΗĪV

Gravidanza

Scompenso cardiaco congestizio classe NYHA I-II

Controindicazioni assolute

Scompenso cardiaco congestizio classe NYHA III-IV

Sclerosi multipla

Infezioni attive

Linfoma

Tumori solidi

Rare reazioni avverse

Anemia aplastica

Demielinizzazione

Psoriasi

Lupus eritematoso sistemico

Vasculite

Sol bearfu

In un grande trial randomizzato, controllato con placebo, il rischio di serie infezioni in pazienti che ricevevano una dose di infliximab di 3 mg/kg associata a methotrexate per artrite reumatoide, si è dimostrato uguale al rischio nel gruppo di pazienti trattati con il solo methotrexate. I pazienti che hanno ricevuto una induzione con infliximab 10 mg/kg associato a methotrexate e successivamente una terapia con infliximab 10 mg/kg hanno mostrato un rischio aumentato di gravi infezioni fino alla ventiduesima settimana dopo l'inizio del trattamento.

Gli antagonisti del TNF α possono riattivare un'infezione cronica da HBV, tuttavia il trattamento con infliximab associato a lamivudina può stabilizzare l'attività di malattia dell'HBV. Cautela è richiesta nel trattare con antagonisti del TNF α pazienti con infezione cronica da HCV.

L'esecuzione di uno screening per HBV e HCV prima di intraprendere terapia con inibitori del TNF α , ed in caso di risultati positivi la terapia con antagonisti del TNF α deve essere intrapresa insieme a trattamenti antivirali, monitorando in maniera stretta i marcatori bio-umorali di malattia epatica. Evidenze ancora limitate suggeriscono che il trattamento con antagonisti del TNF α possa essere una valida alternativa nei pazienti HIV positivi senza malattia avanzata e malattia reumatica associata refrattaria alle terapie standard (158), ma deve essere usata grandissima cautela. Le infezioni fungine non sono risultate significativamente aumentate nei trial randomizzati, ma, basandosi su casi clinici riportati in letteratura, se un paziente in terapia con anti-TNF α sviluppa febbre e sintomi compatibili, l'infezione fungina deve essere considerata.

L'importante ruolo giocato dal TNF α nella regolazione delle cellule presentanti l'(auto)antigene può essere collegato con segni clinici di nuova insorgenza di malattia autoimmune in alcuni pazienti trattati con antagonisti del TNF α . Lo sviluppo di lupus eritematoso sistemico nei pazienti con artriti infiammatorie trattati con anti-TNF α è raro, e la

Sh bearly

sospensione di tali farmaci porta solitamente ad una regressione completa dei sintomi. D'altro canto, lo sviluppo di anticorpi anti-nucleo (ANA) in seguito a terapia con antagonisti del TNFα è un reperto molto comune, e spesso compaiono anche anti-dsDNA e anti-cardiolipina.

Molti eventi neuropatologici e di demielinizzazione, incluse esacerbazioni di una preesistente sclerosi multipla, sono stati riportati nei pazienti in terapia con antagonisti del TNFα; tuttavia, l'incidenza di malattia demielinizzante non appare essere aumentata nei pazienti in terapia con anti-TNFα quando comparata alla popolazione generale.

Non c'è nemmeno un'evidenza chiara che questi farmaci inducano un aumento dei tumori solidi, o recidiva nei pazienti con pregressa malattia neoplastica. Sebbene gli attuali dati suggeriscano un'aumentata incidenza di linfoma nei pazienti in terapia con anti-TNF α rispetto alla popolazione generale, rimane incerto se il trattamento con antagonisti del TNF α implichi un maggior rischio di linfoma rispetto al trattamento con farmaci immunosoppressivi tradizionali.

La tubercolosi è stata riconosciuta come la più frequente infezione grave osservata nei pazienti affetti da anti- TNF α . La sua incidenza è influenzata dall'età, da regimi immunosoppressivi concomitanti, da un basso status socioeconomico e dalla posizione geografica. Inoltre è stato osservato un aumentato rischio di infezione ativa entro il primo anno di trattamento, come ad indicare come principale causa di malattia una riattivazione di una TBC "latente". Pertanto lo screening dei pazienti che hanno indicazione ad intraprendere una terapia con antagonisti del TNF α ha diminuito in maniera importantissima il rischio di riattivazione di tubercolosi.

Lo screening dovrebbe includere l'anamnesi, l'esame obiettivo, una radiografia del torace e l'esecuzione dell'intradermoreazione secondo Mantoux o di un test di rilascio in vitro di interferon-gamma dopo esposizione ad antigeni tubercolari (*Interferon-Gamma* Release Assays - IGRAs) come il QuantiFERON-TB Gold test o ELISPOT. Nel caso di tubercolosi

Sh been h

latente, è imperativo cominciare una profilassi anti-tubercolare prima di avviare il trattamento con antagonisti del TNF α .

Riguardo ad infliximab, reazioni acute allergiche sono state rinvenute nel 5% delle infusioni intravenose, ma utilizzando protocolli appropriati di premedicazione queste reazioni sono facilmente controllate in quasi tutti i pazienti.

Se gli antagonisti del TNF α non sono utilizzati nei pazienti con infezioni acute, tumori, preesistente demielinizzazione e scompenso cardiaco, il loro profilo di sicurezza può dirsi ottimo. Globalmente, il rischio di sviluppare tumori e la mortalità nei pazienti trattati con adalimumab sono identici a quelli della popolazione generale (159).

Gli antagonisti del TNFa nello scompenso cardiaco

Data l'importanza patogenetica del TNF α nello scompenso cardiaco, l'utilizzo degli anti-TNF α è subito apparsa una brillante soluzione terapeutica nei pazienti affetti da questa condizione. I dati preclinici e quelli provenienti da alcuni studi di pilota in piccola scala avevano mostrato risultati incoraggianti, con un aumento della frazione di eiezione e delle capacità funzionali, come il test del cammino dei 6 minuti, nei pazienti trattati.

Sono quindi stati organizzati alcuni trials clinici randomizzati in doppio cieco per valutare questa opportunità terapeutica.

I risultati dei trials RENAISSANCE (Randomised Etanercept North American Strategy to Study Antagonism of CytokinEs) e RECOVER (Research into Etanercept CytOkine Antagonism in VentriculaR dysfunction) sono stati uniti e presentati insieme nello studio RENEWAL (Randomised EtaNErcept Worldwide evALuation), riportando i risultati ottenuti in oltre 2'000 pazienti da 25 paesi in tutto il mondo.

I pazienti sono stati inclusi nello studio se rientravano nella classe funzionale NYHA II-IV da almeno 2 mesi, se erano incapaci di camminare per più di 375 m in 6 minuti (o 425 m se



ospedalizzati per scompenso cardiaco negli ultimi 6 mesi), se in terapia ottimale e stabile per insufficienza cardiaca e senza infezioni gravi nei mesi precedenti. I pazienti sono stati divisi in tre gruppi: trattati con placebo, trattati con etanercept 25 mg a settimana e trattati con etanercept 25 mg due volte a settimana. Tutti i trattamenti sono stati somministrati mediante iniezione sottocutanea.

L'obiettivo primario di RECOVER e RENAISSANCE era il miglioramento delle condizioni cliniche a 24 settimane, definite come migliorate (secondo la classe NYHA), peggiorate (morte, ospedalizzazione per scompenso cardiaco o peggioramento della classe NYHA) o non modificate.

Nel Marzo 2001 entrambi gli studi sono stati terminati anticipatamente per chiara dimostrazione di assenza di beneficio riguardo a morbilità e mortalità rispetto al placebo.

All'interruzione del trial erano stati arruolati un totale di 1123 pazienti nello studio RECOVER e 925 nello studio RENAISSANCE, dei quali il 25% erano in classe NYHA II, il 70% in classe NYHA III e il 4% in classe NYHA IV; il 62% dei pazienti avevano avuto cardiopatia ischemica. Il periodo medio di trattamento era stato di 12,7 mesi nello studio RENAISSANCE e 5,7 mesi nello studio RECOVER.

Non era stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo trattato con placebo ed i gruppi trattati con etanercept riguardo agli obiettivi primari dello studio. L'analisi dei rapporti di rischio per morte e peggioramento dello scompenso cardiaco hanno mostrato che nello studio RECOVER i pazienti trattati con dosi più elevate di etanercept apparivano ottenere risultati leggermente migliori di chi assumeva una dose inferiore (0.87 vs 1.01).

Nello studio RENAISSANCE l'analisi dei rapporti di rischio è risultato aumentato in entrambi i gruppi trattati con etanercept. Si è riscontrato un trend verso un aumento di rischio di morte nei gruppi trattati con etanercept in entrambi gli studi (HR 1.10), come anche

Sh beerfly

un'indicazione di prognosi peggiore nei pazienti con cardiopatia non-ischemica e con età minore di 65 anni. Non c'è stata evidenza di aumento di infezioni gravi o potenzialmente mortali in nessuno dei gruppi.

E' stato concluso che sebbene lo studio RENEWAL non dimostri in maniera conclusiva un effetto dannoso della terapia con etanercept nei pazienti affetti da scompenso cardiaco, il rapporto di rischio per il peggioramento di insufficienza cardiaca si dimostra aumentato nello studio RENAISSANCE. In base a questi dati, è stato indicato di utilizzare etanercept con estrema cautela nei pazienti con concomitante insufficienza cardiaca lieve ed una controindicazione nei casi moderato-gravi.

Lo studio ATTACH (Anti-TNFα alpha Therapy Against Chronic Heart failure) era stato disegnato per valutare l'utilizzo di infliximab nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca prima di iniziare uno studio su larga scala (ATTACH 2).

Sono stati reclutati pazienti in classe NYHA III-IV, con una frazione di eiezione ≤35%, in terapia con farmaci convenzionali per lo scompenso cardiaco quali ACE-inibitori, diuretici e β-bloccanti, in condizioni cliniche stabili e senza gravi infezioni.

I pazienti sono stati divisi in tre gruppi: trattati con placebo, con infliximab 5 mg/kg o trattati con infliximab 10 mg/kg, somministrati in infusione endovenosa alla settimana 0, 2 e 6. Le valutazioni sono state effettuate alla settimana 14 e 28 dopo la randomizzazione.

L'obiettivo primario era lo studio delle condizioni cliniche; altri end points includevano la valutazione di *marker* sierologici di flogosi e questionari sulla qualità di vita.

Sono stati reclutati 150 pazienti: 49 hanno ricevuto placebo, 50 la dose più bassa di infliximab, 51 la dose più alta. Si è stimato che dopo l'ultima somministrazione del farmaco, i livelli terapeutici di infliximab si sarebbero mantenuti per 14 settimane.

In entrambi i gruppi trattati con infliximab si è assistito ad una soppressione dei *markers* di infiammazione (PCR e IL-6 sieriche). La valutazione della frazione di eiezione del ventricolo

Sh beerft

sinistro alla settimana 14 ha dimostrato un aumento in entrambi i gruppi trattati con infliximab che si è dimostrato statisticamente significativo rispetto al gruppo placebo (p=0.039); questa differenza tuttavia scompariva alla settimana 28.

Alla 14[^] settimana non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi trattati con infliximab ed il gruppo trattato con placebo per quanto riguardava il numero di pazienti che avevano presentato un miglioramento, peggioramento o non avevano mutato il loro stato clinico. Mentre alla 28[^] settimana veniva osservato un incremento della percentuale di pazienti con peggioramento clinico, in massima parte per morte o incremento delle ospedalizzazioni per scompenso cardiaco.

Gli eventi avversi riportati includevano capogiro ed ipotensione, con eventi avversi gravi nel 29% dei pazienti trattati con placebo contro il 23% dei pazienti trattati con la dose più bassa di infliximab ed il 44% dei pazienti trattati con la dose più alta, dovuti principalmente a peggioramento dell'insufficienza cardiaca.

La conclusione è stata che infliximab non migliora lo scompenso cardiaco cronico e la terapia con tale farmaco si associava ad un peggioramento dell'insufficienza cardiaca, che si manteneva anche dopo la sospensione del trattamento. In base a questi dati è stato concluso che la terapia con infliximab deve essere evitata nei pazienti con scompenso cardiaco classe NYHA III e IV (160).

Dopo questi risultati, tutti i farmaci anti-TNF α approvati successivamente per l'uso clinico, adalimumab, golimumab e certolizumab, sono stati etichettati come controindicati nei pazienti con scompenso cardiaco con le medesime restrizioni di infliximab ed etanercept.

Sh beerft

Malattia cardiovascolare, artrite reumatoide ed anti-TNFa

Numerosi studi di comunità hanno riscontrato un'aumentata frequenza di eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da artrite reumatoide rispetto alla popolazione sana (161). La relazione tra artrite reumatoide e malattia cardiovascolare sarebbe da ricercare nel processo immunoflogistico cronico presente in corso di malattia che determinerebbe un'aumentata e più precoce evoluzione del processo aterosclerotico (162). Gli eventi cardiovascolari rappresentano circa il 40% delle cause di morte nei pazienti affetti da artrite, e sono probabilmente attribuibili a fattori di rischio specifici della malattia (flogosi cronica e farmaci) che vanno ad aggiungersi ai fattori di rischio "tradizionali" per malattia cardiovascolare cui i pazienti sono esposti.

Alla luce dei dei risultati deleteri della terapia con anti-TNF α nei pazienti affetti da scompenso cardiaco e delle controindicazioni riportate in scheda tecnica, ed in considerazione dell'aumentato rischio per patologia cardiovascolare nei pazienti affetti da artrite, in ambito reumatologico vie è stata grande attenzione sull'utilizzo di questi farmaci.

Numerosi studi osservazionali basati su dati da Registri Nazionali di pazienti con artrite in trattamento con anti-TNFα hanno valutato l'incidenza di nuovi casi di patologia cardiovascolare, compreso lo scompenso, e di andamento di una precedente patologia cardiaca, con risultati inattesi.

In particolare nel 2004 Wolfe F, e coll. (163) hanno dimostrato in una coorte di oltre 13'000 pazienti affetti da artrite reumatoide una incidenza analoga ed una prevalenza minore di scompenso cardiaco nei pazienti trattati con anti-TNFα rispetto a coloro che ricevevano solo DMARD. Analogamente, l'analisi dei dati del Registro tedesco RABBIT non ha dimostrato differenze nell'incidenza e prevalenza di malattia cardiovascolare nei pazienti trattati con anti-TNFα, risconoscendo come fattori di rischio indipendente l'utilizzo di dosi elevate di steroidi e/o FANS (164). Mentre i dati provenienti dal Registro Inglese non solo non hanno dimostrato

Sol bearful

un'aumentata incidenza di infarto del miocardio, ma addirittura un effetto protettivo nei pazienti trattati con anti-TNF α che presentavano un buon controllo dell'artrite durante trattamento con anti-TNF α rispetto a coloro che ricevevano solo DMARD (165-167).

Più recentemente, Westlake S et al. in una estesa revisione sistematica della letteratura hanno evidenziato come i farmaci antagonizzanti il TNF α sembrerebbero ridurre il rischio di eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da artrite reumatoide ed in particolare non veniva riscontrato un incremento del rischio per scompenso cardiaco (168).

Questa discrepanza di efficacia della terapia con anti-TNF α , con un fallimento nei pazienti non reumatologici affetti da scompenso cardiaco ed una protezione sugli eventi cardiovascolari nei pazienti con artrite ha creato un vero e proprio "dilemma reumatologico".

Diverse spiegazioni sono state proposte, senza però trovare un comune accordo (169):

- i. l'effetto di infiliximab è almeno parzialmente dovuto alla capacità di legare il complemento alle cellule che esprimono TNFα transmembranario. La sua citotossicità diretta è importante nell'eliminare le cellule T attivate che hanno invaso la mucosa gastrointestinale dei pazienti affetti da morbo di Chron, ma sembra deleterio nello scompenso cardiaco dal momento che i miocardiociti potrebbero in questa condizione clinica esprimere in maniera aumentata il TNFα. La fissazione del complemento alle cellule miocardiche porterebbe a miocardite e a lisi.
- ii. studi sull'uomo hanno dimostrato che etanercept agisce come una proteina carrier che stabilizza il TNFα e porta all'accumulo di alte concentrazioni di TNFα immunoreattivo nella circolazione periferica. I complessi di etanercept- TNFα non rimangono legati strettamente, ma dissociano molto velocemente (620 ms). Un aumento dei livelli circolanti di TNFα legato ad etanercept, e rapide dissociazioni, possono aumentare la durata della bioattività del TNFα come antagonista stimolante e quindi peggiorare lo scompenso cardiaco. Mentre questi effetti biologici di etanercept



non risultano problematici nell'artrite reumatoide, nella quale il TNF α è incarcerato dentro le articolazioni e le concentrazioni circolanti di tale citochina sono basse (rispetto all'insufficienza cardiaca) o nulle, un aumento in circolo dei livelli della citochina biologicamente attiva in un paziente con insufficienza cardiaca può peggiorare la cardiopatia per le proprietà biologiche note di questa molecola;

- iii. studi sull'animale e sull'uomo suggeriscono anche che sesso e razza possono avere importanti implicazioni nella prognosi dei pazienti in terapia anti-citochinica;
- iv. come molti geni umani, anche il gene che codifica per il TNFα può contenere un polimorfismo in posizione 308 della regione del promotore. Questa transizione da G ad A in uno degli alleli del TNFα è associata con livelli aumentati di espressione del TNFα ed è frequentemente riscontrata in pazienti affetti da artrite reumatoide e lupus eritematoso sistemico. Purtroppo, gli studi in corso non hanno ancora dimostrato una chiara correlazione tra questo polimorfismo e lo sviluppo di insufficienza cardiaca, ma è possibile che la componente genetica giochi un ruolo nel modificare la risposta alle terapia anti-citochiniche;
- v. un'altra interessante ipotesi è che i farmaci antagonisti del TNFα possano avere interazioni farmacodinamiche con altri trattamenti farmacologici per lo scompenso cardiaco. Molti farmaci cardiovascolari sono metabolizzati dalla superfamiglia del citocromo (CYP) 450, tra cui CYP3A, CYP2D6, CUP1A2, CYP2C19 e CYP2C9. E' stata dimostrata una relazione inversa tra l'attività del CYP2C19 e le concentrazioni di TNFα nei pazienti con scompenso cardiaco. Poichè CYP2C19 è il maggiore *pathway* metabolico per il β-bloccante carvedilolo, questi risultati suggeriscono che un abbassamento del TNFα in maniera acuta possa aumentare il metabolismo CYP2C19-dipendente e diminuire in maniera significativa i livelli di β-bloccante;

Sh been h

vi. la prevalenza di cachessia cardiaca nei pazienti affetti da scompenso cardiaco si aggira intorno al 15%, e i livelli di TNFα in questi pazienti appaiono marcatamente aumentati. Il meccanismo apoptotico potrebbe rappresentare un potenziale *pathway* di deterioramento nelle malattie croniche, e il TNFα si è rivelato un suo importante modulatore. Un peggioramento della classe NYHA è correlato in maniera lineare con gli aumenti di livello del TNFα. I trial potrebbero essersi concentrati in maniera selettiva su pazienti con alti livelli di TNFα, cachessia cardiaca, classe NYHA IV e una marcata diminuzione della capacitò di esercizio. Ciò è supportato dal fatto che il 3% della popolazione dello studio RENEWAL e il 5% dello studio ATTACH erano in classe IV, e questi pazienti hanno mostrato un miglioramento statisticamente significativo rispetto al gruppo trattato con placebo.

vii. numerosi studi sperimentali suggeriscono che livelli fisiologici di TNFα promuovono risposte citoprotettive nel cuore in corso di ischemia acuta. Inoltre, livelli fisiologicamente bassi di questa citochina giocherebbero un ruolo importante nel *remodelling* e nella capacità di riparazione tissutale. A tal proposito è stato ipotizzato un effetto di "precondizionamento" esercitato dal TNFα sui cardiomiociti, analogamente a quanto avviene con brevi periodi di ipossia nel danno da ischemia-riperfusione. E' possibile che le terapie con antagonisti del TNFα diminuiscano le concentrazioni di TNFα a livelli troppo bassi per i processi riparativi cardiaci, meccanismi con i quali si spiegherebbero i peggioramenti di scompenso cardiaco e l'aumentata mortalità.

Appare comunque chiaro che i meccanismi d'azione del TNF α ed il suo ruolo sulla performance cardiaca non sono ancora del tutto definiti, e comunque l'assioma che elevati livelli di TNF α siano sempre deleteri non è sempre valido.

Sh bearful

5. SCOPO DELLO STUDIO

Gli obiettivi del nostro studio sono stati:

- valutare in un modello in vitro gli effetti del TNFα sulla vitalità dei cardiomiociti e verificare l'esistenza di "precondizionamento" mediato dal TNFα;
- determinare gli effetti del precondizionamento in relazioni a stimoli tossici di natura ossidativa ed apoptotica;
- quantificare i livelli di recettore solubile del TNF tipo 1 e 2 (sTNFR1 e -2) e la loro influenza sul precondizionamento da TNFα;
- valutare i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la possibile interferenza del precondizionamento da TNFα sulla loro produzione in vitro;
- stimare i livelli di materiale genomico e Caspasi-3 attivata quali espressioni di apoptosi e la possibile interferenza del precondizionamento da TNFα sulla loro produzione in vitro.

Sol bearful

6. MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Sono state utilizzate cellule della linea H9c2 derivate da cuore di embrione di ratto (Figura 3) (American Type Culture Collection-CRL 1446), già usata come modello sperimentale in diversi studi di cardiotossicità (285-289). Sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO2, in terreno di coltura completo (Dulbecco's modified minimum essential medium arricchito con L-glutamina 4 mM, sodio bicarbonato 18 mM, sodio piruvato 1 mM, penicillina 100 U/ml, streptomicina 1 ng/ml e siero fetale bovino inattivato 10%).

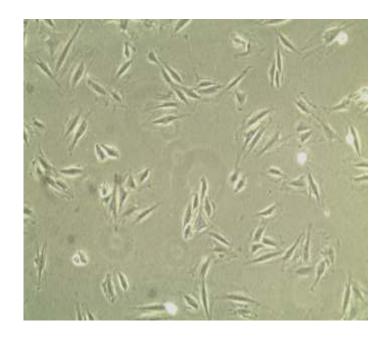


Figura 3: Cellule H9c2.

Tutti i saggi effettuati in questo studio sono stati effettuati in rigorose condizioni di comparabilità della densità cellulare: venivano seminate 50.000 cellule per ogni disco di polisterene della superficie di 961 mm2 e mantenute per 24 ore in 1 ml di terreno di coltura.

Soh bearly

Al momento di effettuare gli esperimenti, il terreno veniva rimosso, le cellule venivano sottoposte a lavaggio per due volte con PBS (phosphate buffered saline) e venivano reincubate in terreno di coltura senza siero fetale bovino inattivato con l'aggiunta dei diversi agenti di *stress* di seguito riportati.

MTT test e curve di vitalità

La vitalità cellulare è stata misurata attraverso saggio colorimetrico mediante spettrofotometro della riduzione dell'MTT [3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] a formazano (Figura 4), quale indicatore della funzionalità mitocondriale.

Tale reazione viene impedita in presenza di antimicina A, un inibitore della catena di trasporto degli elettroni (Figura 5). Il test è stato effettuato direttamente sulle colture cellulari, e la vitalità è stata espressa come percentuale di riduzione dell'MTT rispetto ai controlli negativi trattati con sola antimicina A.

Le cellule H9c2 sono state esposte ai seguenti stimoli: i) TNF α ricombinante di ratto (Sigma-Aldrich) 0.001-1000 ng/ml; ii) perossido di idrogeno somministrato in bolo ($H_2O_2-0.001-1000$ μ M) o indotta a livello intracellulare mediante l'inibizione della catalasi con aminotriazolo (AT -0.01-1000 mM); iii) etoposide (ETO -0.001-1000 μ M), un induttore di apoptosi mediante inibizione della topoisomerasi II.

Dopo aver determinato la concentrazione inibente il 50% della vitalità cellulare (IC_{50}) dei singoli composti testati, è stata identificata una concentrazione sub-tossica di TNF α che è stata identificata come dose precondizionante e con la quale si è proceduto a pre-trattare le cellule prima di riesporle alle medesime condizioni descritte in precedenza.

Sol beerfly

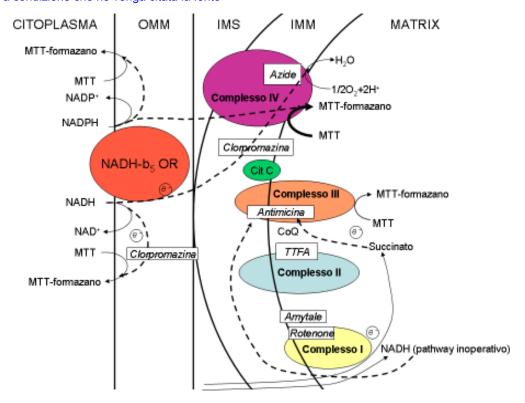


Figura 4: Schematizzazione della formazione di formazano a partire da MTT (170).

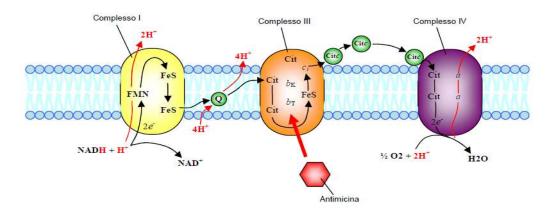


Figura 5: Meccanismo di azione dell'Antimicina A.

Sh bearly

Determinazione dei recettori solubili tipo 1 e 2 per il TNFa.

I livelli di recettore solubile del TNFα tipo 1 e 2 nei sovranatanti delle colture cellulari sono stati valutati mediante il kit Quantikine® Mouse sTNF RI/TNFRSF1A e sTNF RI/TNFRSF1B Immunoassay Human (R&D System), rispettivamente.

I kits commerciali, altamente specifici per topo e ratto, sono basati sul principio quantitativo di immunoenzimatica "a *sandwich*": l'anticorpo policlonale specifico per sTNFR 1 o 2 prerivestiva i pozzetti delle micropiastre e l'aggiunta nei pozzetti dei campioni in esame determina l'immobilizzazione dei sTNFRs presenti.

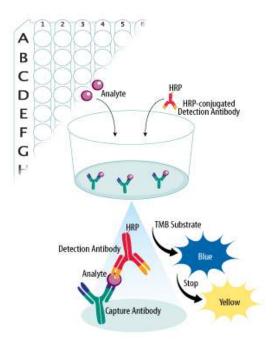


Figura 6: Meccanismo di dosaggio dei recettori solubili per il TNFα tipo 1 e 2 (sTNFR-1 e - 2) attraverso il kit ELISA Quantikine Mouse sTNF RI/RII TNFRSF1A (R&D System).

In base alle istruzioni del produttore, le micropiastre pre-rivestite con l'Ab per il sTNFR1 o -2, venivano incubate con i sovranatanti delle colture cellulari, assieme agli standards ed i controlli, per 2 h a temperatura ambiente. In seguito, le piastre venivano lavate per eliminare legami aspecifici e quindi incubate con il secondo Ab per il sTNFR1 o -2 coniugato con

Sol bearly

perossidasi per ulteriori 2 ore a temperatura ambiente. Dopo i successivi lavaggi, le micropiastre venivano incubate con il substrato (perossido di idrogeno e tetrametilbenzidina) per 30 minuti, con cambiamento di colore proporzionale alla quantità di sTNFRs catturati dal *sandwich* di anticorpi. L'aggiunta di una soluzione di acido cloridrico arrestava la reazione e la densità ottica veniva letta tramite variazione dell'assorbanza della soluzione a 450 nm. Dalla comparazione con gli standards veniva ricavata la concentrazione dei sTNFR1 e -2 presenti nei sovranatanti con una sensibilità < 5 pg/mL.

Dosaggio della diclorofluoresceina

La formazione di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) è stata misurata attraverso un metodo basato sulla captazione sequenziale a livello cellulare di DCFH-DA (2'7'-diclofluoresceina-diacetato), la sua de-acetilazione a mezzo di esterasi cellulari e la sua ossidazione da DCFH a DCF indotta da H₂O₂ e perossidasi o tracce di ferro (171).

Le cellule sono state esposte per 40 minuti a 10 μM di DCFH-DA in terreno di coltura senza siero fetale bovino inattivato; successivamente, il terreno è stato rimosso e rimpiazzato da terreno "serum-free" addizionato con IC₅₀ di TNFα, H₂O₂ ed ETO, in cui le cellule sono rimaste incubate per 24 ore. Al termine le cellule sono state raschiate e lisate con H2O con l'aggiunta di 1 mM di 4-idrossitempo per prevenire ulteriori ossidazioni di DCFH a DCF durante la rottura cellulare e l'omogeneizzazione (171). Gli omogenati sono stati estratti con volume 2:1 di (1:1) CHCl3/CH3OH, e 100 μl della fase superiore sono stati analizzati a mezzo di cromatografo liquido ad alta prestazione (HPLC) Hewlett Packard 1100 system (Palo Alto, CA). Gli estratti sono stati iniettati in una colonna Inertsil ODS-4 RP C-18 (250x4.6 mm, 5 μ/GL Sciences Inc.) alla temperatura di 25°C. I campioni sono stati eluiti ad un flusso 1 ml/min con un gradiente lineare in 10 minuti da 88% di NaH2PO4 50 mM pH 4 –

Sol bearful

12% di CH3CN a 35% NaH2PO4 – 65% CH3CN, seguiti da 10 minuti di eluizione con 35% di NaH2PO4 – 65% CH3CN. Il picco di fluorescenza della DCF (eccitazione a 488nm / emissione a 525 nm) è stato identificato con cromatografia con uno standard di DCF (tempo di ritenzione = 14.6 minuti) ed è stato quantificato in confronto ad una curva standard appropriata. I risultati sono stati rapportati ai milligrammi di proteine (dosate con il metodo dell'acido bicinconinico) presenti nel lisato cellulare. Il limite minore di rilevazione della DCF era di $1 \times 10^{-3} \, \mu M$, tre volte sotto i livelli di DCF ritrovati nelle cellule non trattate (Figura 7).

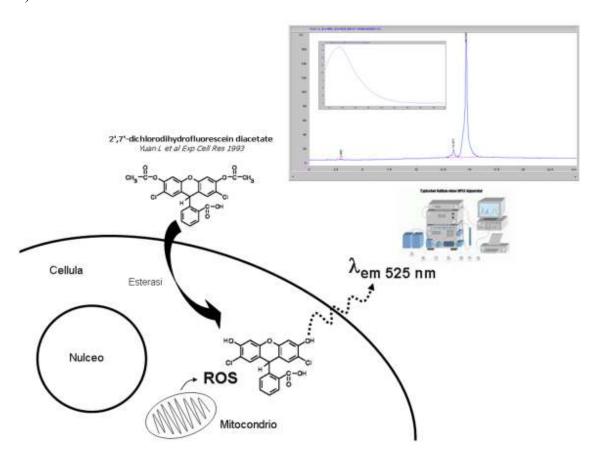


Figura 7: Principi e metodo di dosaggio della DCF.

Shorefor he

Dosaggio della malondialdeide

La malondialdeide (MDA), un prodotto della lipoperossidazione, è stata testata attraverso la miscelazione di 200 μl di omogenati cellulari con 7.5 μl di butilidrossitoluene 2% e 400 μl di acido tiobarbiturico allo 0.75%. Dopo riscaldamento a 100°C per 15 minuti le miscele sono state raffreddate in ghiaccio ed estratti con 600 μl di n-butolo. Sono stati analizzati 100 μl della fase organica con una colonna Inertsil C-18 (250 x 4.6 mm, 5 μ/GL Sciences Inc.). I campioni sono stati eluiti al flusso di 1 ml/min per un totale di 20 minuti, di cui 10 minuti di gradiente lineare da 100% di NaH2PO4 50 mM a pH 4 a 50% di CH3CN – 50% NaH2PO4, seguiti da 10 minuti di eluizione isocratica con 50% CH3CN – 50% NaH2PO4. L'addotto di MDA con acido tiobarbiturico (tempo di ritenzione 9,3 minuti) è stato rilevato fluorimetricamente (eccitazione a 515 nm ed emissione 550 nm). Il contenuto di MDA è stato quantificato in confronto ad una curva standard facendo reagire l'acido tiobarbiturico con concentrazioni note di MDA, preparate con idrolisi acida di 1,1,3,3-tetrametossipropano (limite di rivelazione 1x10-3 μM. (Figura 8). I risultati sono stati rapportati ai milligrammi di proteine (dosate con il metodo dell'acido bicinconinico) presenti nel lisato cellulare.



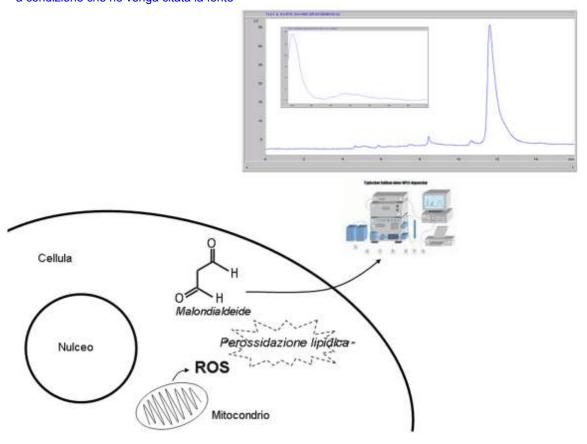


Figura 8: Principi e metodo di dosaggio della MDA.

Sh bearful

Determinazione dei complessi DNA-istoni clivati

La presenza di materiale genomico nei sovranatanti e nei lisati delle colture cellulari è stata valutata mediante il sistema *Cell Death Detection ELISAPLUS* (*Roche Diagnostics*).

Tale kit commerciale è basato sul principio quantitativo di immunoenzimatica "a *sandwich*": l'anticorpo monoclonale di topo diretto contro il DNA (a singola e doppia elica) e gli istoni (H1, H2A, H2B, H3 e H4) permette di rilevare specificatamente i mono- e gli oligonucleosomi (quantità di complessi di DNA/istoni clivati) (Figura 9).

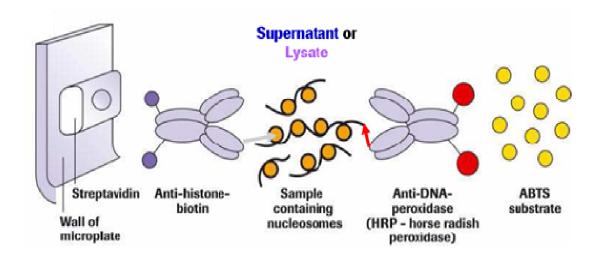


Figura 9: Meccanismo di dosaggio del materiale genomico attraverso il kit Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche Diagnostics).

Sh bearly

In accordo con le istruzioni del produttore, i campioni (sovranatante e lisato cellulare) venivano incubati nei pozzetti della micropiastra con un mix di anticorpi anti-istone biotinilato, anti-DNA con perossidasi e soluzione di incubazione (BSA 1%, Tween 0,5% ed EDTA 1mM in PSB), per 2 ore.

Gli anticorpi presenti nei campioni in esame si legavano quindi ai componenti istone e DNA dei nucleosomi, e gli immunocomplessi venivano quindi fissati alla micropiastra tramite l'interazione streptavidina-biotina. Dopo il periodo di incubazione gli anticorpi non legati venivano rimossi durante i lavaggi.

I complessi legati alla perossidasi, rimasti nella piastra, venivano incubati per 30 minuti con ABTS (2,2'-Azino-di[3-etilbenzotiazoline-solfonato]), determinando un cambiamento di colore proporzionale alla quantità di nucleosomi catturati dal *sandwich* di anticorpi. La densità ottica veniva letta tramite variazione dell'assorbanza della soluzione a 405 nm.

La quantità di complessi nucleosomici nel sovranatante è espressione della morte per necrosi cellulare (materiale genomico in sospensione, seguente a rottura della membrana cellulare) mentre la quantità di complessi nucleosomici nel lisato cellulare è indicativa della morte per apoptosi (materiale genomico intracellulare).

Sh bearfu

Determinazione della Caspasi-3 attivata

L'attività della Caspasi-3 nei sovranatanti e nei lisati delle colture cellulari è stata valutata mediante il kit *Caspase 3 Activity Assay (Roche Diagnostics*).

Il kit utilizzato è un test immuno-enzimatico fluorimetrico (FIENA) per determinazione quantitativa specifica dell'attività della Caspasi-3 in vitro, in piastre di microtitolazione (Figura 10).

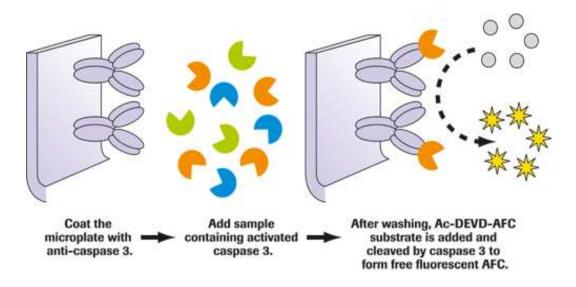


Figura 10: Meccanismo di dosaggio della Caspasi-3 attivata attraverso il kit ELISA Caspase 3 Activity Assay (Roche Diagnostics).

Sol bearfu

Secondo le istruzioni del produttore, le micropiastre venivano incubate con l'Ab monoclonale verso la Casapse-3 per 1 h a 37°C. L'Ab veniva bloccato al fondo delle piastre mediante il tampone di "bloccaggio" per 30 minuti. In seguito, le piastre venivano lavate per eliminare legami aspecifici. Quindi venivano aggiunti i sovranatanti e i lisati delle colture cellulari ed incubati per 1 ora a temperatura ambiente. Al termine, in seguito ai lavaggi, veniva aggiunto un substrato peptidico sintetico marcato con 7-amino-4-trifluoromethylcoumarina (AFC), formando un composto fluorogeno che produce una fluorescenza blu all'esposizione alla luce (max eccitazione: ~ 400 nm). Quando l'AFC attaccato al substrato viene clivato dalla Caspasi-3 attivata staccando il substrato dall'AFC si produce una fluorescenza gialla (Max di emissione: ~ 505 nm). Dalla differenza di fluorescenza tra Tempo 0 e dopo 2 ore di incubazione del composto substrato-AFC, si ha una stima diretta dell'attività della Casapsi-3.



7. RISULTATI

Le cellule H9c2, trattate con dosi crescenti di TNF α , hanno mostrato una curva di vitalità (riportata in Figura 11) con una concentrazione inibente il 50% della vitalità cellulare (IC₅₀) di TNF α di 0.06±0.03 ng/ml.

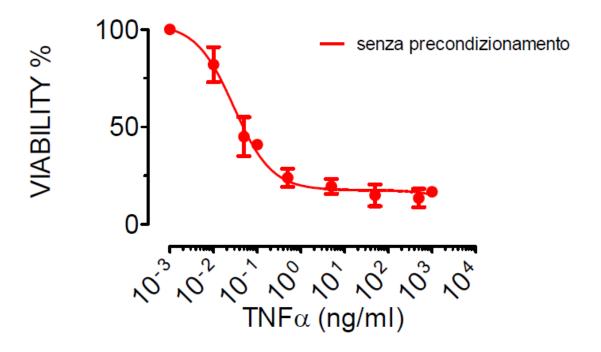


Figura 11: Curva di tossicità del TNF α .

Soh beerfly

Abbiamo quindi identificato una concentrazione di TNF α sub-tossica (0.01 ng/ml), pari alla media degli IC₅₀ dei singoli esperimenti sottraendo due volte l'errore standard medio (SEM); tale concentrazione identifica una vitalità cellulare del 95% ed è stata scelta come "concentrazione di precondizionamento".

Dopo esposizione a 0.01 ng/ml di TNF α "overnight", le cellule esposte nuovamente a concentrazioni crescenti di TNF α hanno dimostrato una curva di vitalità spostata verso destra, come riportato in Figura 12, con IC₅₀ dopo precondizionamento pari a 3.6 \pm 2.2 ng/ml (p<0.01).

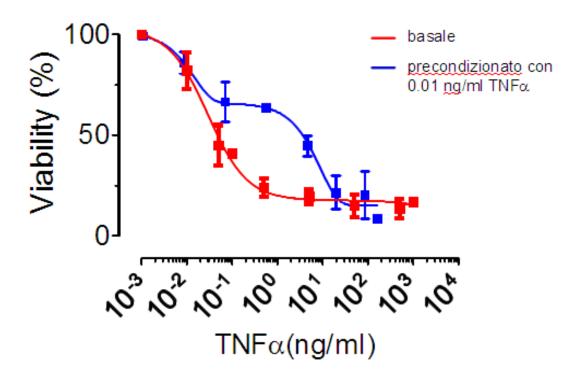


Figura 12: Curva di tossicità del TNF α senza e con precondizionamento con dosi non tossiche di TNF α .

Sh bearfu

Abbiamo quindi esposto le cellule ai diversi stimoli (H_2O_2 , AT ed ETO) identificando le curve di vitalità e le relative IC₅₀ prima e dopo precondizionamento con TNF α , ottenendo i risultati mostrati in Tabella IV.

Tabella IV: IC₅₀ di TNF α , H₂O₂, AT ed ETO senza e con precondizionamento con dosi subtossiche di TNF α

	IC ₅₀ in condizioni basali	IC_{50} dopo precondizionamento con $0.01~$ ng/ml di TNF $lpha$	P
$TNF\alpha$	$0.06 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$	$3.6 \pm 2.2 \text{ ng/ml}$	< 0.01
H_2O_2	$90 \pm 25 \mu M$	$205 \pm 22~\mu M$	0.01
Aminotriazolo	$42.5 \pm 2.4 \text{ mM}$	$130.6 \pm 25 \text{ mM}$	0.01
Etoposide	$1 \pm 0.3 \mu M$	$191.7 \pm 2.8 \ \mu M$	< 0.0001

Sol bearfu

Il "precondizionamento" da TNF α ha, dunque, mostrato un fattore autoprotettivo di circa 130 volte, di circa 3 volte nei confronti di H_2O_2 e AT e di quasi 200 volte verso ETO, come mostrato in Figura 13.

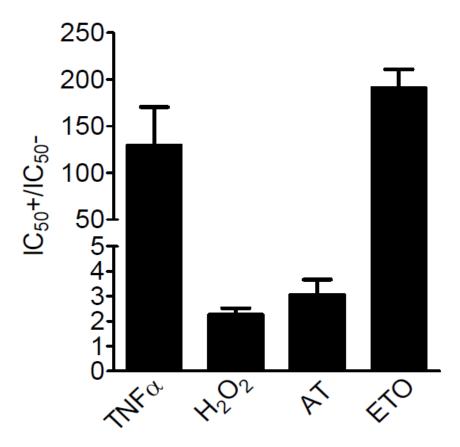


Figura 13: Fattori di protezione indotti da precondizionamento con dosi non-tossiche di $TNF\alpha$ su stimoli tossici con $TNF\alpha$, H_2O_2 , AT ed ETO.

Sh bearly

Il dosaggio dei recettori solubili del TNFα nei sovranatanti delle colture di H9c2 in condizioni basali ha dimostrato livelli significativamente più altri di sTNR2 rispetto al sTNFR1 (9.8±0.01 vs 7.2±0.01 pg/ml - p<0,01). Dopo precondizionamento i livelli dei sTNFR1 e -2 si incrementavano mediamente del 5% rispetto al basale, raggiungendo livelli di 7.5±0.02 e 10.3±0.01 pg/ml, rispettivamente (Figura 14).

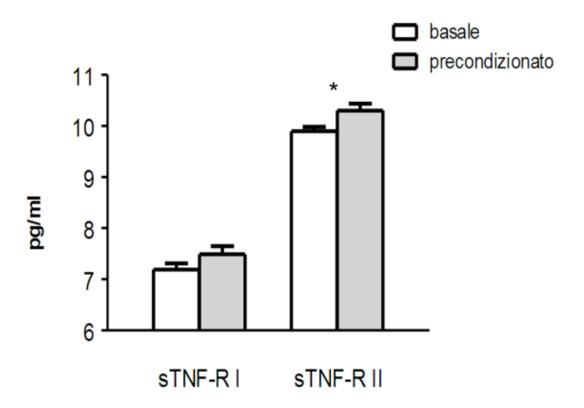


Figura 14: Dosaggio dei recettori solubili del TNF α tipo 1 e 2 (sTNFR1 e sTNF2) nel sovranatante senza e con precondizionamento con dosi sub-tossiche di TNF α . * p=0.01

La bearfu

La quantificazione dei complessi nucleosomici nel sovranatante, espressione di morte cellulare per necrosi, ha dimostrato in condizioni basali livelli di 0.96 ± 0.4 A.U. nelle colture cellulari non trattate, mentre dopo trattamento con IC₅₀ di TNF α , H₂O₂ ed ETO ha dimostrato livelli di 1 ± 0.6 A.U., 6.5 ± 2.2 A.U. e 1.8 ± 0.8 A.U., rispettivamente. In seguito a precondizionamento, le cellule venivano esposte ad i medesimi stimoli ed i livelli di nucleosomi nel sovranatante sono risultati 0.5 ± 0.1 A.U. per il TNF α , 1 ± 0.4 per l'H₂O₂, e 0.2 ± 0.1 per l'ETO (Figura 15).

Nucleosomi nel sovranatante

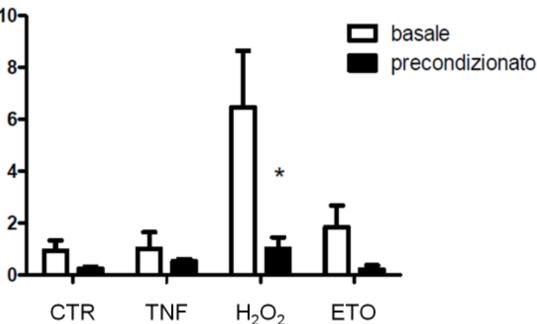


Figura 15: Dosaggio di nucleosomi nel sovranatante senza e con precondizionamento con dosi sub-tossiche di TNF α . * p=0.01

Sol bearly

Il precondizionamento da TNF α determinava quindi un fattore protettivo da necrosi autoindotta di circa 3 volte, di oltre 9 volte per l' H_2O_2 e di oltre 5 volte per l'ETO (Figura 16).

FATTORE DI PROTEZIONE - NECROSI

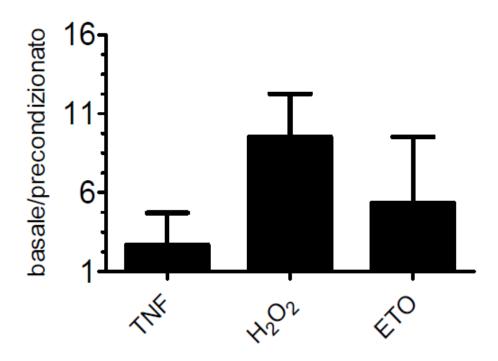


Figura 16: Fattore di protezione indotto da dosi non-tossiche di TNF α sulla necrosi da TNF α , H_2O_2 ed ETO.

Soh bearfu

La valutazione dei livelli di ROS, attraverso il dosaggio della DCF in condizioni standard ha dimostrato un incremento dei livelli di DCF, rispetto alle cellule non trattate, di $+0.004\pm0.001$ nmol/mgProt., $+0.026\pm0.006$ nmol/mgProt. E $+0.025\pm0.012$ nmol/mgProt., dopo trattamento con IC₅₀ di TNF α , H₂O₂ ed ETO, rispettivamente. In seguito a precondizionamento con TNF α , abbiamo riscontrato una riduzione dei livelli di DCF rispetto ai controlli, che raggiungeva la significatività statistica solo nelle cellule trattate con H₂O₂ (0.01 \pm 0.003 nmol/mgProt. – p<0.05) (Figura 17).

DELTA DCF VS CONTROLLO equipode 0.04 0.03 0.02 0.01 TNF\alpha H2O2 ETO

Figura 17: Differenze di dosaggio della DCF rispetto al basale dopo condizionamento con TNF α , H_2O_2 ed ETO senza e con precondizionamento con dosi non-tossiche di TNF α . * p<0.05

Sol bearly

La valutazione della lipoperossidazione mediante quantificazione della MDA ha dimostrato in condizioni standard un incremento dei livelli di MDA, rispetto alle cellule non trattate, di $+0.11\pm0.08$ nmol/mgProt. per il TNF α , $+0.85\pm0.59$ nmol/mgProt. per l'H₂O₂, e $+0.15\pm0.11$ nmol/mgProt. per l'ETO. Dopo precondizionamento con TNF α , si assisteva a riduzione dei livelli di MDA dopo trattamento con i diversi stressors ed analogamente alla DCF la significatività statistica veniva raggiunta solo per la variazione rispetto ad H₂O₂ (-0.13 ± 0.05 nmol/mgProt. -p<0.05) (Figura 18).

DELTA MDA VS CONTROLLO

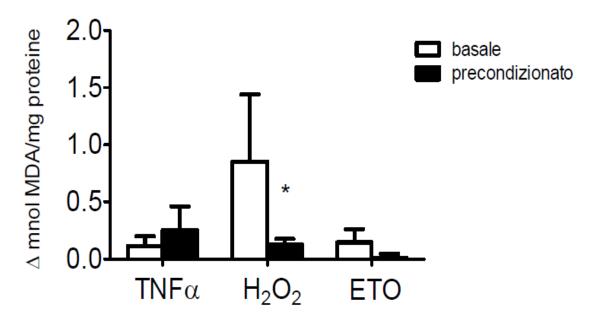


Figura 18: Differenze di dosaggio della MDA rispetto al basale dopo condizionamento con TNF α , H₂O₂ ed ETO senza e con precondizionamento con dosi non-tossiche di TNF α . * p<0.05

In assoluto sono stati dimostrati bassi livelli di lipoperossidazione indotti da IC_{50} di $TNF\alpha$, H_2O_2 ed ETO. Pertanto le cellule sono state trattate con Fe-NH4-citrato (25 μ M e 100 μ M) al fine di valutare se il nostro saggio sperimentale era in grado di valutare sicuri eventi lipoperossidativi (Figura 19).

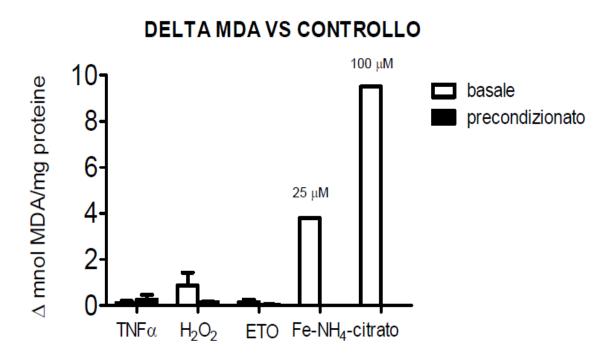


Figura 19: Differenze di dosaggio della MDA rispetto al basale dopo condizionamento con $TNF\alpha$, H_2O_2 , ETO e Fe-NH4-citrato.

La valutazione dell'apoptosi, mediante quantificazione dei livelli di complessi nucleosomici nei lisati cellulari, ha dimostrato che dopo somministrazione di IC_{50} di $TNF\alpha$, H_2O_2 ed ETO, vi era, rispettivamente, un incremento dei nucleosomi di $+1.3\pm0.5$ A.U., $+0.7\pm0.2$ A.U. e $+1.7\pm0.6$ A.U. Dopo precondizionamento da $TNF\alpha$, non si assisteva ad una variazione significativa dei livelli di nucleosomi, pur presentandosi un trend più basso nelle cellule trattate con ETO ($+1.0\pm0.6$) (Figura 20).

FOLD INCREASE - NUCLEOSOMI NEL LISATO

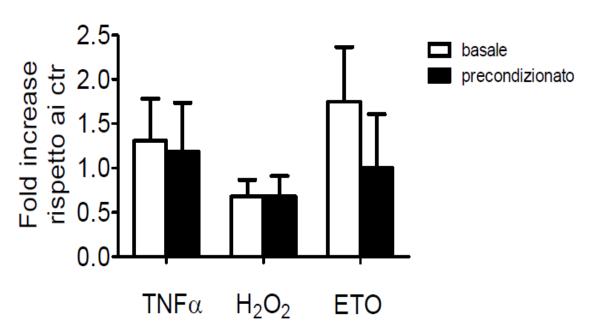


Figura 20: Fold increase rispetto al basale del dosaggio di nucleosomi nel lisato dopo condizionamento con TNF α , H₂O₂ ed ETO senza e con precondizionamento con dosi subtossiche di TNF α .

La valutazione dell'attività della Caspasi-3 ha dimostrato, in condizioni standard, un'attività aumentata rispetto alle cellule non trattate di 2.6 ± 1.6 , 1.3 ± 0.5 e 2.1 ± 1.4 , nelle cellule trattate rispettivamente con IC₅₀ di TNF α , H₂O₂ ed ETO. Dopo precondizionamento da TNF α abbiamo riscontrato livelli più bassi di attività caspasica maggiormente evidenti per TNF α (+1±0.2) ed ETO (+1±0.3), anche se la differenza non raggiungeva la significatività statistica (Figura 21).

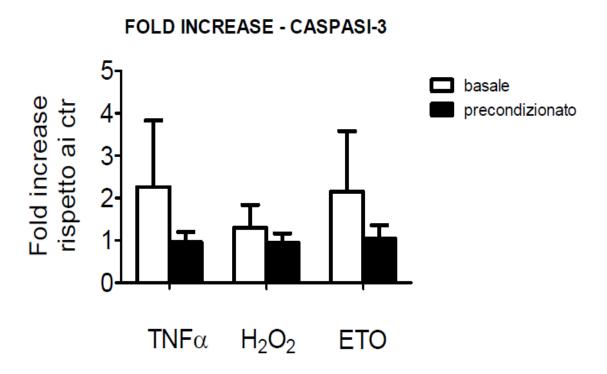


Figura 21: Fold increase rispetto al basale del dosaggio di caspasi-3 attivata dopo condizionamento con TNF α , H₂O₂ ed ETO senza e con precondizionamento con dosi nontossiche di TNF α .

Valutando il fattore di protezione indotto dal precondizionamento da TNF α sull'apoptosi abbiamo riscontrato una protezione di oltre 3 volte nei confronti dello stesso TNF α , di circa 2 volte nei confronti di H_2O_2 e di oltre 4 volte nei confronti dell'ETO (Figura 22).

FATTORE DI PROTEZIONE APOPTOSI (NUCLEOSOMI LISATO + CASPASI-3)

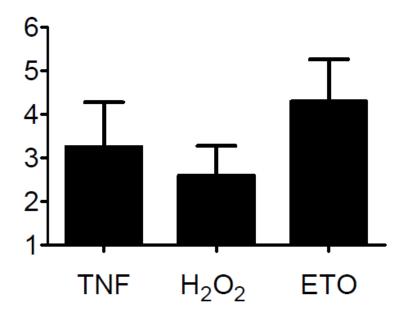


Figura 22: Fattore di protezione indotto da dosi non-tossiche di TNF α sull'apoptosi da TNF α , H_2O_2 ed ETO.

Show been h

8. DISCUSSIONE

Il nostro studio conferma l'esistenza di un precondizionamento da TNF α in grado di proteggere i cardiomiociti sia dalla riesposizione al TNF α stesso che da agenti ossidanti come H_2O_2 ed AT o agenti apoptotici come ETO. Dai dati a nostra disposizione il principale effetto citotossico del TNF α sarebbe determinato dall'induzione di apoptosi e, verosimilmente, in accordo con altri autori, l'interazione con i recettori del TNF α (TNFR1 e 2) e l'attivazione della cascata apoptotica da essi mediata, riveste un ruolo rilevante ai fini dell'effetto protettivo.

Inoltre il dosaggio dei sTNFR 1 e 2, da una parte ha confermato che il nostro modello sperimentale è in grado di valutare efficacemente il danno mediato da TNF α , in quanto le H9c2 esprimono il recettore per tale citochina, dall'altra dimostrano che il precondizionamento indurrebbe il rilascio di sTNFRs che andrebbe a prevenire l'ulteriore legame di TNF α con attivazione cellulare. Inoltre abbiamo dimostrato che il precondizionamento da TNF α sarebbe in grado di indurre un incremento prevalente del sTNR2, come a dimostrare una sua superiore attivazione.

In effetti diversi studi in letteratura hanno ipotizzato un effetto cellulare duplice del TNFα, in base a quale recettore venga attivato. Il recettore TNFR1 attiva un *pathway* intracellulare che prevede l'attivazione di NfKB, possiede un *death domain* che innesca la cascata apoptotica ed è in grado di attivare la PLA2 e la via infiammatoria dell'acido arachidonico. D'altra parte il TNFR2 sembrerebbe mediare prevalentemente segnali di attivazione e proliferazione cellulare, svolgendo un ruolo protettivo sulla vitalità della cellula. Diversi studi in modelli animali in vivo, hanno dimostrato che topi *knock-out* per il gene che codifica per TNFR1 presentavano una protezione maggiore sullo scompenso indotto sperimentalmente, rispetto agli animali *knock-out* per TNFR2 che presentavano invece una maggiore mortalità.

Sh been h

Pertanto è possibile ipotizzare che il precondizionamento cardiomiocitario da TNF α possa: i) interferire con l'ulteriore attivazione del TNFR1/2; ii) condizionare l'azione intracellulare di ROS; iii) interferire con l'attivazione della cascata caspasica da parte di ulteriori stimoli apoptotici.

In effetti dal dosaggio dei livelli di H_2O_2 intracellulare misurata attraverso DCF e della lipoperossidazione attraverso MDA, abbiamo riscontrato che il precondizionamento da TNF α è in grado di ridurre le concentrazioni di ROS e la lipoperossidazione cellulare, soprattutto nei confronti di agenti ossidativi.

Difformemente a quanto ipotizzato finora, abbiamo riscontrato che l'ETO, farmaco altamente utilizzato in chemioterapia, appartenente alla famiglia degli inibitori della Topoisomerasi II, è in grado di aumentare i livelli di ROS cellulari. Il suo meccanismo d'azione ritenuto finora prevalente, era la stabilizzazione dei complessi clivabili tra Topoisomerasi II e DNA, che entrando in collisione con i sistemi di replicazione del DNA determinano la rottura dell'anello a doppia elica con induzione del *pathway* intrinseco della cascata caspasica. Evidentemente, il farmaco è in grado di determinare morte cellulare anche attraverso il rilascio di ROS, in accordo con alcuni autori che hanno ipotizzato una perturbazione della funzione mitocondriale, alla base del rilascio di elevati livelli di ROS (172).

Pertanto tali dati spiegherebbero il motivo di una così elevata protezione (circa 200 volte) del precondizionamneto da TNF α sul danno da ETO, come dimostrato dai nostri test di vitalità cellulare con MTT. Infatti l'effetto citoprotettivo cumulativo della riduzione di ROS e dell'attivazione delle caspasi, sarebbe probabilmente alla base delle differenze di protezione cellulare indotta dal TNF α dopo trattamento con ETO, H_2O_2 , AT e lo stesso TNF α .

La determinazione dei livelli dei complessi nucleosomici e dell'attività caspasica, quali espressioni dell'induzione di apoptosi dei diversi stimoli tossici utilizzati ad IC₅₀, ha

Sh been h

evidenziato, pur non raggiungendo la significatività statistica, una riduzione dei livelli di nucleosomi e dell'attivazione della cascata caspasica nelle cellule pretrattate con dosi non tossiche di TNF α , confermando un effetto citoprotettivo, risultato della riduzione dei *marker* di apoptosi.

Il mancato raggiungimento della significatività statistica potrebbe essere imputato alla ridotta numerosità del campione, nella valutazione di un processo biologico multifattoriale come quello apoptotico. Inoltre il modello di valutazione dell'apoptosi da noi utilizzato, anche se altamente sensibile e specifico, potrebbe aver sottostimato l'evento apoptosi, in quanto la prolungata esposizione delle cellule agli stimoli tossici ha potuto determinare la rottura della membrana cellulare con rilascio nel sovranatante dei complessi nucleosomici e perdita dell'attivazione della Caspasi-3.

Comunque il precondizionamento da TNF α si è confermato funzionare anche come fattore di protezione da apoptosi, con lo stesso trend evidenziato con il test mitocondrio specifico dell'MTT, evidenziando un maggior effetto nei confronti di stimoli prevalentemente pro-apoptotici come l'ETO e lo stesso TNF α .

Sol bearfu

9. CONCLUSIONI

Possiamo quindi concludere che:

- 1. il TNFα rappresenta un importante agente tossico per la vitalità cardiomiocitaria, con un probabile effetto predominante pro-apoptotico, ed in minor misura ossidativo;
- viene confermata l'esistenza di un effetto precondizionante citoprottetivo esercitato da basse concentrazioni di TNFα, che agisce sia nei confronti di agenti ossidativi, che di apoptotici, ma anche auto-protettivo;
- il precondizionamento sembrerebbe mediato, almeno in parte, da un maggiore rilascio di sTNF-Rs che andrebbe ad interferire con l'ulteriore legame di TNFα con i recettori di membrana in grado di trasdurre il segnale;
- il meccanismo di citoprotezione indotta da TNFα si esplicherebbe sia attraverso una maggiore resistenza nei confronti di ROS che in una minore attivazione della cascata apoptotica;
- 5. i nostri risultati ci permettono di ipotizzare che un'abolizione dei livelli circolanti di TNFα in corso di scompenso cardiaco congestizio, mediante l'utilizzo di farmaci antagonizzanti il TNFα, potrebbe interferire con il "precondizionamento" citoprotettivo svolto da questa citochina, aumentando la vulnerabilità cellulare nei confronti di agenti di natura ossidativa e apoptotica, di per se già elevati in corso di scompenso cardiaco;
- 6. modelli traslazionali si rendono necessari per poter approfondire gli effetti del precondizionamento in vivo e nell'uomo.

Sh beerfly

10. BIBLIOGRAFIA

- 1. Hunt SA; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). J Am Coll Cardiol. 2005;46:e1-82
- 2. Scholte op Reimer WJM, Gitt AK, Boersma E, Simoons ML (eds.). Cardiovascular Diseases in Europe. Euro Heart Survey 2006. Sophia Antipolis; European Society of Cardiology; 2006
- 3. Goldberg LR: Heart Failure. Ann Intern Med 2010;152:ITC61-ITC616
- 4. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's principles of internal medicine, 16/e. McGraw-Hill 2005
- 5. Dioguardi N, Sanna GP. Moderni aspetti di semeiotica medica. Società Editrice Universo 2002
- 6. Afeltra A, Amoroso A, Costantino S, Picardi A, Vettore L. Semeiotica pratica. Centro Scientifico Editore 2004
- 7. Morrison LK, Harrison A, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Maisel A. Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. J Am Coll Cardiol 2002;39:202-209
- 8. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A,Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA; Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med 2002;347:161-167

Sh been h

- 9. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PW, Vasan RS. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. Circulation 2004;109:594-600
- 10. Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, Clopton P, Alberto J, Hlavin P, Maisel AS. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. J Am Coll Cardiol 2001;37:379-385
- 11. De Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. Lancet 2003;362:316-322
- 12. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). N Engl J Med 1987;316:1429-1435
- 13. The SOLVD investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection factions and congestive heart failure. N Engl J Med 1991;325:293-302
- 14. The SOLVD investigators. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fraction. N Engl J Med 1992;327:685-691
- 15. Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, Deedwania PC, Ney DE, Snavely DB, Chang PI. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). Lancet 1997;349:747-752
- 16. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klinger GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial-the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. Lancet 2000;355:1582-1587
- 17. Cohn JN, Tognoni G. A randomised trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. N Engl J Med 2001;345:1667-1675

Show for the

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 18. Maggioni AP, Anand I, Gottlieb SO, Latini R, Tognoni G, Cohn JN; ValHeFT Investigators (Valsartan Heart Failure Trial). Effects of valsartan on morbidity and mortality in patients with heart failure not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors. J Am Coll Cardiol 2002;40:1414-1421
- 19. Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Pfeffer MA, Swedberg K; CHARM Investigators and Committees. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-convertingenzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. Lancet 2003;362:772-776
- 20. Loeb HS, Johnson G, Henrick A, Smith R, Wilson J, Cremo R, Cohn JN. Effect of enalapril, hydralazine plus isosorbide dinitrate, and prazosin on hospitalization in patients with chronic congestive heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. Circulaton 1993;87:78-87
- 21. Johnson G, Carson P, Francis GS, Cohn JN. Influence of prerandomization (baseline) variables on mortality and on the reduction of mortality by enalapril. Veterans Affairs Cooperative Study on Vasodilator Therapy of Heart Failure (V-HeFT II). V-HeFT VA Cooperative Studies Group. Circulation 1993;87:132-139
- 22. Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, Carson P, D'Agostino R Jr, Ferdinand K, Taylor M, Adams K, Sabolinski M, Worcel M, Cohn JN; AfricanAmerican Heart Failure Trial Investigators. Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. N Engl J Med 2004;351:2049-2057
- 23. Dargie HJ. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. Lancet 2001;357:1385-1390
- 24. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. N Engl J Med 1996;334:1349-1355

Show been h

- 25. CIBIS Investigators and Committees. A randomised trial of beta-blockers in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). Circulation 1994;90:1765-1773
- 26. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. Lancet 1999;353:9-13
- 27. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervetion Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). Lancet 1999;353:2001-2007
- 28. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. N Engl J Med 2001;344:1651-1658
- 29. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomised Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med 1999;341:709-717
- 30. The Digitalis Investigation Group. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. N Engl J Med 1997;336:525-533
- 31. Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. Cur Dir Autoimmun 2010;11:1-26
- 32. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology; 4[^] edizione, 2000, W.B. Saunders Company
- 33. Vinay DS, Kwon BS. TNF superfamily: costimulation and clinical applications. Cell Biol Int 2009;33:453-465
- 34. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Annu Rev Immunol 1992;10:411-452
- 35. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Jackson-Bernitsas D, Ahn KS, Sethi G, Ichikawa H. TNF blockade: an inflammatory issue. Ernst Schering Res Found Workshop 2006:161-186

Sol beerfly

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 36. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. Front Biosci 2008;13:5094-5107
- 37. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of celebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. Clin Microbiol Rev 2001;14:810-820
- 38. Jacobs M, Samarina A, Grivennikov S, Botha T, Allie N, Fremond C, Toghe D, Vasseur V, Rose S, Erard E, Monteiro A, Quesniaux V, Ryffel B. Reactivation of tuberculosis by tumor necrosis factor neutralization. Eur Cytokine Netw 2007;18:5-13
- 39. Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Tanscriptional control of the TNFgene. Current Dir Autoimmun 2010;11:27-60
- 40. Newell CI, Deisseroth AB, Lopez-Berestein G. Interaction of nuclear proteins with an AP-1/CRE-like promoter sequence in the human TNF a gene. J Leukoc Biol 1994;56:27-35
- 41. Diaz B, Lopez-Berestein G. A dstinct element involved in lipopolysaccharide activation of the tumor necrosis factor- promoters in monocytes. J Interferon Cytokine Res 2000;20:741-748
- 42. Steer JH, Kroeger KM, Abraham LJ, Joyce DA. Glucocorticoids suppress tumor necrosis factor alpha expression by human monocytic THP-1 cells by suppressing transactivation through adjacent NF- B and c-Jun-activating transcription factor-2 binding sites in the promoter. J Biol Chem 2000;275:18432-18440
- 43. Sato H, Watanabe A, Tanaka T, Koitabashi N, Arai M, Kurabayashi M, Yokoyama T. Regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter by angiotensin II and lipopolysaccharide in cardiac fibroblasts: different cisacting promoter sequences and trascriptional factors. J Mol Cell Cardiol 2003;35:1197-1205
- 44. Hayakawa J, Mittal S, Wang Y, Korkmaz KS, Adamson E, English C, Ohmichi M, McClelland M, Mercola D. Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. Mol Cell 2004;16:521-535

Sol bearfu

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 45. Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, Natarajan R. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatiory gene trascription under diabetic conditions. J Biol Chem 2004;279:18091-18097
- 46. Kasper LH, Fukuyama T, Biesen MA, Boussouar F, Tong C, de Pauw A, Murray PJ, van Deursen JM, Brindle PK. Contitional knockout mice reveal distinct functions for the global trascriptional coactivators CBP and p300 in T-cell development. Mol Cell Biol 2006;26:789-809
- 47. Xu W, Fukuyama T, Ney PA, Wang D, Rehg J, Boyd K, van Deursen JM, Brindle PK. Global transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 are highly essential collectively but not individually in peripheral B cells. Blood 2006;107:4407-4416
- 48. Ranjbar S, Rajsbaum R, Goldfeld AE. Transactivator of transcription from HIV type I subtype E selectively inhibits TNF gene expression via interference with chromatin remodeling of the TNF locus. J Immunol 2006;176:4182-4190
- 49. Ramirez-Carrozzi VR, Nazarian AA, Li CC, Gore SL, Sridharan R, Imbalzano AN, Smale ST. Selective and antagonistic functions od SWI/SNF and Mi-2 nucleosome remodelling complexes during an inflammatory response. Genes Dev 2006;20:282-296
- 50. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature 2007;447:407-412
- 51. Mellor J, Dudek P, Clynes D. A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation. Curr Opin Genet Dev 2008;18:116-122
- 52. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nat Rev Genet 2009;10:295-304
- 53. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. Cell 2007;128:707-719
- 54. Vlantis K, Pasparakis M. Role of TNF in pathologies induced by nuclear factor B deficiency. Curr Dir Autoimmunity 2010;11:80-93

Sh beerfly

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 55. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A toxic form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 1988;53:45-53
- 56. Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that realases tumornecrosis factor-alpha from cells. Nature 1997;385(6618):729-733
- 57. Vandenabeele P, Declerq W, Bayaert R, Fiers W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. Trend Cell Biol 1995;5:392-399
- 58. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science 2002;296:1634-1635
- 59. Varfolomeev E, Vucic D. (Un)expected roles of cIAPs in apoptotic and NFkB signaling pathway. Cell Cycle 2008;7:1511-1521
- 60. Ermolaeva Ma, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermohle O, Kranidioti K, Kollias G, Tschopp J, Pasparakis M. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. Nat Immunol 2008;9:1037-1046
- 61. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. Oncogene 2007:26:3214-3226
- 62. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequencial signaling complexes. Cell 2003;114:181-190
- 63. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell 1995;83:793-802
- 64. Grell M, Becke FM, Wajant H, Mannel DN, Scheurich P. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. Eur J Immunol 1998;28:257-263

Show been h

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 65. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci 2001;4:1116-1122
- 66. Pasparakis M, Alexopoulu L, Espiskopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. J Exp Med 1996;184:1397-1411
- 67. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. Nature 1993;364:798-802
- 68. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell 1993;73:457-467
- 69. Pasparakis M, Kousteni S, Peschon J, Kollias G. Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precurors into splenic follicles. Cell Immunol 2000;201:33-41
- 70. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. EMBO J 1991:10:4025-4031
- 71. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulaton of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. Immunity 1999;10:387-398
- 72. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:11294-11298

Sol bearful

- 73. Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, Brakebush C, Wallach D, Bauer J, Lassmann H, Kollias G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. J Exp Med 2004;200:367-376
- 74. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gadina M, Karenko L, Pettersson T, McCarthy J, Frucht DM, Aringer M, Torosyan Y, Teppo AM, Wilson M, Karaarslan HM, Wan Y, Todd I, Wood G, Schlimgen R, Kumarajeewa TR, Cooper SM, Vella JP, Amos CI, Mulley J, Quane KA, Molloy MG, Ranki A, Powell RJ, Hitman GA, O'Shea JJ, Kastner DL. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. Cell 1999;97:133-144
- 75. Grewal IS, Grewal KD, Wong FS, Picarella DE, Janeway CA Jr, Flavell RA. Local expression of transgene encoded TNF alpha in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. J Exp Med 1996;184:1963-1974
- 76. Kontoyiannis D, Kollias G. Accelerated autoimmunity and lupus nephritis in NZB mice with an engineered heterozygous deficiency in tumor necrosis factor. Eur J Immunol 2000;30:2038-2047
- 77. Cope A, Ettinger R, McDevitt H. The role of TNF alpha and related cytokines in the development and function of the autoreactive T-cell repertoire. Res Immunol 1997;148:307-312
- 78. Green EA, Eynon EE, Flavell RA. Local expression of TNF-alpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentagion of islet antigens. Immunity 1998;9:733-743
- 79. Muller-Ehmsen J, Schwinger R. TNF and congestive heart failure: therapeutic possibilities. Expert Opin Ther Targets 2004;8:203-209
- 80. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. N Engl J Med 1984;311:819-823

Sh beerfly

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 81. Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G IV. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. Circulation 1992;85:790-804
- 82. Helin K, Stoll M, Meffert S, Stroth U, Unger T. The role of angiotensin receptors in cardiovascular diseases. Ann Med 1997;29:23-29
- 83. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med 1990;323:236-241
- 84. Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myiocardium after endotoxin administration. J Clin Invest 1995;95:1042-1052
- 85. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. Annu Rev Physiol 2003;65:81-101
- 86. Palmieri EA, Benincasa G, Di Rella F, Casaburi C, Monti MG, De Simone G, Chiariotti L, Palombini L, Bruni CB, Sacc & L, Cittadini A. Differential expressione of TNF alpha, IL-6 and IGF-1 by graded mechanical stress in normal rat myocardium. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;282:H926-H934
- 87. Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N, Mann DL. Load-dependent and –indipendent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. Circulation 2002;105:2192-2197
- 88. Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kB (NF-kB) transcription factor. Mol Cell Biochem 2000;212:155-169
- 89. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3rd, Zentella A, Albert JD, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 1986;234:470-474

Show been h

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 90. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. Circulation 1998;97:1382-1391
- 91. Pagani FD, Baker LS, His C, Knox M, Fink MP, Visner MS. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-α in conscious dogs. J Clin Invest 1992;90:389-398
- 92. Murray Dr, Freeman GL. Tumor necrosis factor-α induces a biphasic effect on myocardial contractily in conscious dogs. Circ Res 1996;78:154-160
- 93. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-α. Circ Res 1997;81:627-635
- 94. Dibbs ZI, Diwan A, Nemoto S, DeFreitas G, Abdellatif M, Carabello BA, Spinale FG, Feuerstein G, Sivasubramanian N, Mann DL. Targeted overexpression of transmembrane tumor necrosis factor provokes a concentric cardiac hypertrophic phenotype. Circulation 2003;108:1002-1008
- 95. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protecs the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:5456-5461
- 96. Misra A, Haudek SB, Knuefermann P, Vallejo JG, Chen ZJ, Michael LH, Sivasubramanian N, Olson EN, Entman ML, Mann DL. Nuclear factor-kB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. Circulation 2003;108:3075-3078
- 97. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. Circulation 1995;92:1487-1493

Show here

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 98. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present and the foreseeable future. Circ Res 2002;91:988-998
- 99. Oral H, Dorn GW, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-α in the adult mammalian cardiac myocyte. J Biol Chem 1997;272:4836-4842
- 100. Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF α receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF α inhibition of L-type Ca2+current and Ca2+ transients. FEBS Lett 1995;376:24-30
- 101. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte β -adrenergic responsivness. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:6753-6757
- 102. Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor α-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signalling cascade in cardiac cell death. J Clin Invest 1996;98:2854-2865
- 103. Yokoyama T, Nakano M, Badnarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor-α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. Circulation 1997;95:1247-1252
- 104. Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, Feldman AM. Myocardial extracellular matrix remodelling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor- α can ben modulated by anti-tumor necrosis factor α therapy. Circulation 1997;95:1247-1252
- 105. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypotesis. J Card Fail 1996;2:243-249

Sol beerfly

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 106. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokines receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). Circulation 2001;103:2055-2059
- 107. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). J Am Coll Cardiol 1996;27:1201-1206
- 108. Aukrust P, Ueland T, Lein E. Cytokine netowork in congestive heart failure seconday to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1999;83:376-382
- 109. Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kirlin PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretsky E, Yusuf S. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). Circulation 1990;82:1724-1729
- 110. Wei GC, Sirois MG, Qu R, Liu P, Rouleau JL. Sabacute and chronic effects of quinapril on cardiac cytokine expression, remodelling, and function after muocardial infarction in the rat. J Cardiovasc Pharmacol 2002;39:842-850
- 111. Gullestad L, Aukrust P, Ueland T, Espevik T, Yee G, Vagelos R, Frøland SS, Fowler M. Effect of high- versus low-dose angiotensin converting enzyme inhibition on cytokine levels in chronic heart failure. J Am Coll Cardiol 1999;34:2061-2067
- 112. Gurlek A, Kilickap M, Dincer I, Dandachi R, Turkak H, Oral D. Effect of losartan on circulating TNFα levels and left ventricule systolic performance in patients with heart failure. J Cardiovasc Risk 2001;8:279-282
- 113. Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR, Freeman GL. b-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide and remodelling. Circulation 2000;101:2103-2109
- 114. Lin J, Ziring D, Desai S, Kim S, Wong M, Korin Y, Braun J, Reed E, Gjertson D, Singh RR. TNF-alpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. Clin Immunol 2008;126:13-30

Sel beerfly

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 115. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action. Pharmacol Ther 2008;117:244-279
- 116. Wong M, Ziring D, Korin Y, Desai S, Kim S, Lin J, Gjertson D, Braun J, Reed E, Singh RR. TNFalpha in human diseases: mechanisms and future directions. Clin Immunol 2008;126:121-136
- 117. Fossati G, Nesbitt AM. In vitro complement-dependent cytoxicity and antibody-dependent cellular citotoxicity by the anti-TNF agents adalimumab, etanercept, infliximab, and certolizumab pegol (CDP870). Am J Gastroenterol 2005;100:S287
- 118. Lugering A, Schmidt M, Lugering N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Chron's disease by using a caspase-dependent pathway. Gastroenterology 2001;121:1145-1157
- 119. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H. Binding activities of infliximab and etanercept to transmembrane tumor necrosis factor alpha. Gastroenterology 2004;126:934-935
- 120. Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, Tsukamoto H, Harashima S, Kikuchi Y, Otsuka J, Okamura S, Fujita Y, Harada M. Infliximab induces potent antiinflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. Gastroenterology 2005;128:376-392
- 121. Shen C, Van Assche G, Ruugeerts P, Ceuppens JL. Caspase activation and apoptosis induction by adalimumab: demonstration in vitro and in vivo in a chimeric mouse model. Inflamm Bowl Dis 2006;12:22-28
- 122. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. J Pharmacol Exp Ther. 2002;30:418-426
- 123. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 2003;124:1774-1785

Sel beerfly

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 124. Arora T, Padaki R, Liu L, Hamburger AE, Ellison AR, Stevens SR, Louie JS, Kohno T. Differences in binding and effector functions between classes of TNF antagonists. Cytokine. 2009;45:124-131
- 125. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, Brown D, Robinson M, Bourne T. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. Inflamm Bowel Dis. 2007;13:1323-1332
- 126. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Tamimoto Y, Kimoto Y, Uchino A, To K, Harashima S, Hatta N, Harada M. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. Arthritis Rheum. 2008;58:1248-1257
- 127. Kaymakcalan Z, Sakorafas P, Bose S, Scesney S, Xiong L, Hanzatian DK, Salfeld J, Sasso EH. Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. Clin Immunol. 2009;131:308-316
- 128. Nestorov I. Clinical pharmacokinetics of tumor necrosis factor antagonists. J Rheumatol Suppl. 2005;74:13-18
- 129. Furst DE, Wallis R, Broder M, Beenhouwer DO. Tumor necrosis factor antagonists: different kinetics and/or mechanisms of action may explain differences in the risk for developing granulomatous infection. Semin Arthritis Rheum. 2006;36:159-167
- 130. Sfikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. Curr Dir Autoimmun. 2010;11:180-210
- 131. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Cawkwell GD, Silverman ED, Nocton JJ, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Whitmore J, Finck BK. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. N Engl J Med. 2000;342:763-769

Show been h

- 132. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Jones OY, Schneider R, Olson JC, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Lange M, Finck BK, Burge DJ; Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. Long-term efficacy and safety of etanercept in children with polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis: interim results from an ongoing multicenter, open-label, extended-treatment trial. Arthritis Rheum. 2003;48:218-226
- 133. Ruperto N, Lovell DJ, Cuttica R, Wilkinson N, Woo P, Espada G, Wouters C, Silverman ED, Balogh Z, Henrickson M, Apaz MT, Baildam E, Fasth A, Gerloni V, Lahdenne P, Prieur AM, Ravelli A, Saurenmann RK, Gamir ML, Wulffraat N, Marodi L, Petty RE, Joos R, Zulian F, McCurdy D, Myones BL, Nagy K, Reuman P, Szer I, Travers S, Beutler A, Keenan G, Clark J, Visvanathan S, Fasanmade A, Raychaudhuri A, Mendelsohn A, Martini A, Giannini EH; Paediatric Rheumatology International Trials Organisation; Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of infliximab plus methotrexate for the treatment of polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2007;56:3096-3106
- 134. Lovell DJ, Ruperto N, Goodman S, Reiff A, Jung L, Jarosova K, Nemcova D, Mouy R, Sandborg C, Bohnsack J, Elewaut D, Foeldvari I, Gerloni V, Rovensky J, Minden K, Vehe RK, Weiner LW, Horneff G, Huppertz HI, Olson NY, Medich JR, Carcereri-De-Prati R, McIlraith MJ, Giannini EH, Martini A; Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group; Pediatric Rheumatology International Trials Organisation. Adalimumab with or without methotrexate in juvenile rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 2008;359:810-820
- 135. Horneff G, Ebert A, Fitter S, Minden K, Foeldvari I, Kümmerle-Deschner J, Thon A, Girschick HJ, Weller F, Huppertz HI. Safety and efficacy of once weekly etanercept 0.8 mg/kg in a multicentre 12 week trial in active polyarticular course juvenile idiopathic arthritis. Rheumatology (Oxford). 2009;48:916-919
- 136. Quartier P, Taupin P, Bourdeaut F, Lemelle I, Pillet P, Bost M, Sibilia J, Koné-Paut I, Gandon-Laloum S, LeBideau M, Bader-Meunier B, Mouy R, Debré M, Landais P, Prieur AM. Efficacy of etanercept for the treatment of juvenile idiopathic arthritis according to the onset type. Arthritis Rheum. 2003;48:1093-1101

Sol beerfly

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 137. Kimura Y, Pinho P, Walco G, Higgins G, Hummell D, Szer I, Henrickson M, Watcher S, Reiff A. Etanercept treatment in patients with refractory systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2005;32:935-942
- 138. Horneff G, Schmeling H, Biedermann T, Foeldvari I, Ganser G, Girschick HJ, Hospach T, Huppertz HI, Keitzer R, Küster RM, Michels H, Moebius D, Rogalski B, Thon A; Paediatric Rheumatology Collaborative Group. The German etanercept registry for treatment of juvenile idiopathic arthritis. Ann Rheum Dis. 2004;63:1638-1644
- 139. Davis JC Jr, Van Der Heijde D, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg DO, Kivitz A, Fleischmann R, Inman R, Tsuji W; Enbrel Ankylosing Spondylitis Study Group. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. Arthritis Rheum. 2003;48:3230-3236
- 140. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Krause A, Schneider M, Söensen H, Zeidler H, Thriene W, Sieper J. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. Lancet. 2002;359:1187-1193
- 141. van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, Sieper J, Dijkmans BA, Braun J, Dougados M, Reveille JD, Wong RL, Kupper H, Davis JC Jr; ATLAS Study Group. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2006;54:2136-2146
- 142. Inman RD, Davis JC Jr, Heijde D, Diekman L, Sieper J, Kim SI, Mack M, Han J, Visvanathan S, Xu Z, Hsu B, Beutler A, Braun J. Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. Arthritis Rheum. 2008;58:3402-3412
- 143. Tzelepis GE, Kalliakosta G, Tzioufas AG, Sfikakis PP, Mandros C, Boki KA, Roussos C, Moutsopoulos HM. Thoracoabdominal motion in ankylosing spondylitis: association with standardised clinical measures and response to therapy. Ann Rheum Dis. 2009;68:966-971

Sh been h

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 144. Braun J, Baraliakos X, Listing J, Sieper J. Decreased incidence of anterior uveitis in patients with ankylosing spondylitis treated with the anti-tumor necrosis factor agents infliximab and etanercept. Arthritis Rheum. 2005;52:2447-2451
- 145. Reich K, Nestle FO, Papp K, Ortonne JP, Evans R, Guzzo C, Li S, Dooley LT, Griffiths CE; EXPRESS study investigators. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. Lancet. 2005;366:1367-1374
- 146. Mease PJ, Ory P, Sharp JT, Ritchlin CT, Van den Bosch F, Wellborne F, Birbara C, Thomson GT, Perdok RJ, Medich J, Wong RL, Gladman DD. Adalimumab for long-term treatment of psoriatic arthritis: 2-year data from the Adalimumab Effectiveness in Psoriatic Arthritis Trial (ADEPT). Ann Rheum Dis. 2009;68:702-709
- 147. Kavanaugh A, McInnes I, Mease P, Krueger GG, Gladman D, Gomez-Reino J, Papp K, Zrubek J, Mudivarthy S, Mack M, Visvanathan S, Beutler A. Golimumab, a new human tumor necrosis factor alpha antibody, administered every four weeks as a subcutaneous injection in psoriatic arthritis: Twentyfour-week efficacy and safety results of a randomized, placebo-controlled study. Arthritis Rheum. 2009;60:976-986
- 148. Mease PJ, Kivitz AJ, Burch FX, Siegel EL, Cohen SB, Ory P, Salonen D, Rubenstein J, Sharp JT, Tsuji W. Etanercept treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy, and effect on disease progression. Arthritis Rheum. 2004;50:2264-2272
- 149. Gladman DD. Adalimumab, etanercept and infliximab are equally effective treatments for patients with psoriatic arthritis. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008;4:510-511
- 150. Kyle S, Chandler D, Griffiths CE, Helliwell P, Lewis J, McInnes I, Oliver S, Symmons D, McHugh N; British Society for Rheumatology Standards Guidelines Audit Working Group (SGAWG). Guideline for anti-TNF-alpha therapy in psoriatic arthritis. Rheumatology (Oxford). 2005;44:390-397

Sol bearfu

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 151. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. N Engl J Med. 1997;337:1029-1035
- 152. Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S, Honiball PJ, Rutgeerts P, Mason D, Bloomfield R, Schreiber S; PRECISE 1 Study Investigators. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. N Engl J Med. 2007;357:228-238
- 153. Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OØ, Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ; PRECISE 2 Study Investigators. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. N Engl J Med. 2007;357:239-250
- 154. Rispo A, Scarpa R, Di Girolamo E, Cozzolino A, Lembo G, Atteno M, De Falco T, Lo Presti M, Castiglione F. Infliximab in the treatment of extraintestinal manifestations of Crohn's disease. Scand J Rheumatol. 2005;34:387-391
- 155. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, Tremaine WJ, Johnson T, Diehl NN, Zinsmeister AR. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Gastroenterology. 2001;121:1088-1094
- 156. Jänerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, Blomquist L, Karén P, Grännò C, Vilien M, Ström M, Danielsson A, Verbaan H, Hellström PM, Magnuson A, Curman B. Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. Gastroenterology. 2005;128:1805-1811
- 157. Sfikakis PP, Theodossiadis PG, Katsiari CG, Kaklamanis P, Markomichelakis NN. Effect of infliximab on sight-threatening panuveitis in Behcet's disease. Lancet. 2001;358:295-296
- 158. Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, Martin Mola E, Pavelka K, Sany J, Settas L, Wajdula J, Pedersen R, Fatenejad S, Sanda M; TEMPO (Trial of Etanercept and Methotrexate with Radiographic Patient Outcomes) study investigators. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. Lancet 2004;363:675-681

Sol bearful

- Tesi di dottorato in Scienze della plasticità d'organo e della rigenerazione tissutale per il recupero funzionale, di Fabio Cacciapaglia, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/05/2012. La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte
- 159. Sfikakis PP. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. Curr Dir Autoimmun. 2010;11:180-210
- 160. A.P. Coletta, A.L. Clark, P. Banarjee, J.G.F. Cleland. Clinical trials update: RENEWAL (RENAISSANCE and RECOVER) and ATTACH. The European Journal of Heart Failure 2002;4:559–561
- 161. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1994;37:481-494
- 162. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2001;358:903-911
- 163. Wolfe F, Michaud K. Heart failure in rheumatoid arthritis: rates, predictors, and the effect of anti-tumor necrosis factor therapy. Am. J. Med. 2004;116:305-311
- 164. Listing J, Strangfeld A, Kekow J, Schneider M, Kapelle A, Wassenberg S, Zink A. Does tumor necrosis factor alpha inhibition promote or prevent heart failure in patients with rheumatoid arthritis? Arthritis Rheum. 2008;58:667-677
- 165. Jacobsson LT, Turesson C, Gülfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, Geborek P. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 2005;32:1213-1218
- 166. Dixon WG, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL; British Society for Rheumatology Biologics Register Control Centre Consortium, Silman AJ, Symmons DP; British Society for Rheumatology Biologics Register. Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. Arthritis Rheum. 2007;56:2905-2912
- 167. Kremer JM, Reed G, White B, Baumgartner S, Lin S. An analysis of risk factors and effect of treatment on the development of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. [FRI0074] Ann Rheum Dis 2006;65(Suppl II):307

Sol beerfly

- 168. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Curzen N, Kiely P, Quinn M, Choy E, Ostor AJK, Edwards CJ. Tumour necrosis factor antagonists and the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. Rheumatology 2011;50:518-531
- 169. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Shoenfeld Y, Ferraccioli G. TNF-alpha, rheumatoid arthritis, and heart failure: a rheumatological dilemma. Autoimmun Rev. 2005;4:153-161
- 170. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys. 1993;303:474-482
- 171. Salvatorelli E, Menna P, Cascegna S, Liberi G, Calafiore AM, Gianni L, Minotti G. Paclitaxel and docetaxel stimulation of doxorubicinol formation in the human heart: implications for cardiotoxicity of doxorubicin-taxane chemotherapies. J Pharmacol Exp Ther. 2006;318:424-433
- 172. Dumay A, Rincheval V, Trotot P, Mignotte B, Vayssière JL. The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. Free Radic Biol Med. 2006;40:1377-1390

Sal bearly