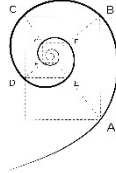




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI MILANO



**DOTTORATO DI MEDICINA MOLECOLARE E TRASLAZIONALE**

CICLO XXXIII

Anno Accademico 2019/2020

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**MED04**

**RUOLO DELLE INFEZIONI VIRALI NELLA  
DESTABILIZZAZIONE DELLA PLACCA  
ATEROSCLEROTICA CAROTIDEA**

Dottorando: Daniela P. MAZZACCARO

Matricola N°: R11994

TUTORE: Prof.ssa Nicoletta BASILICO

CO-TUTORE: Prof. Giovanni NANO

COORDINATORE DEL DOTTORATO: prof. Michele SAMAJA



## SOMMARIO

*Recentemente, molti studi hanno dimostrato che gli agenti virali possono essere coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi. Tuttavia, il ruolo degli stessi nella destabilizzazione delle placche aterosclerotiche non è ancora stato chiarito, e nemmeno i meccanismi molecolari sottostanti.*

*Sulla base dei dati attualmente disponibili in letteratura, abbiamo ipotizzato che gli agenti virali possano promuovere la destabilizzazione delle placche aterosclerotiche già presenti, attraverso un'infezione diretta o mediando una risposta immunitaria con cambiamenti sistemici e soprattutto locali nell'espressione delle citochine e chemochine pro-infiammatorie, e con conseguente attivazione di pathways molecolari che porterebbero alla sovraregolazione dell'espressione dei recettori scavenger sulla superficie dei macrofagi con maggiore affinità per le LDL ossidate (CD36 e Lectine-Like-oxLDL-receptor 1 – LOX-1).*

*Scopo dello studio è stato pertanto quello di studiare la presenza di materiale genetico di alcuni agenti virali nelle placche carotidee di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico di endarterectomia carotidea (CEA) presso l'IRCCS Policlinico San Donato (Unità Operativa di Chirurgia Vascolare), l'espressione di citochine infiammatorie locali e sistemiche e di PPAR- $\gamma$ , correlando i risultati ottenuti con la vulnerabilità della placca asportata.*

*Sono stati analizzati i dati di 50 pazienti (età media 73,7 + 8,8 anni), 31 dei quali con placca vulnerabile (62%). Le comorbidità dei pazienti con placca vulnerabile erano paragonabili a quelle dei pazienti con placca stabile. Il genoma del Citomegalovirus (CMV), Herpes-Simplex (HSV), Varicella Zoster (VZV) e Influenza Virus (IV) non è stato trovato in nessun campione vascolare. Al contrario, il genoma di Epstein-Barr (EBV) è stato trovato in due placche vulnerabili, in particolare in entrambi i casi è stato identificato nel "core" ma non nella rispettiva area di controllo. La determinazione sierologica delle IgM anti-EBV, CMV, HSV e VZV e delle IgA anti IV è stata negativa in tutti i casi, mentre per le IgG ha rivelato che tutti i pazienti erano stati esposti a EBV, il 98% a CMV, il 68% a VZV e il 12% a HSV. Nessun paziente è stato operato in una possibile*

*fase attiva dell'influenza e quasi la metà di loro (22/50, 44%) era stata vaccinata contro IV nei 6 mesi precedenti e risultava coperta da IgG. L'esposizione virale dei pazienti con placca vulnerabile non era significativamente diversa da quella dei pazienti con placca stabile. Tuttavia, l'82% dei pazienti non sottoposti a vaccinazione antinfluenzale (23/28) aveva una placca carotidea vulnerabile, rispetto al 36% dei pazienti vaccinati (8/22,  $P = 0,001$ ).*

*I livelli plasmatici delle citochine infiammatorie (in particolar modo TNF- $\alpha$  e IL-6) erano più alti nel sangue di pazienti con placca vulnerabile rispetto ai pazienti con placca non vulnerabile, tuttavia in maniera indipendente rispetto alle comorbidità, alle esposizioni agli agenti virali o alla vaccinazione antinfluenzale. L'espressione genica delle stesse citochine nella placca era maggiore nel "core" rispetto al controllo, soprattutto nelle placche vulnerabili. Anche in questo caso, non vi sono state differenze significative nell'espressione di tali citochine in base alle comorbidità o all'esposizione virale, tuttavia nei pazienti con placca vulnerabile l'espressione di TNF- $\alpha$  nel "core" era maggiore in coloro che non erano stati sottoposti alla vaccinazione antinfluenzale rispetto ai vaccinati, mentre per IL-10 si è osservato il contrario.*

*Nelle placche vulnerabili, inoltre, è stato osservato che PPAR- $\gamma$  tende ad essere più espresso nel "core" rispetto al controllo, e soprattutto nei pazienti che non si erano sottoposti alla vaccinazione antinfluenzale. Peraltro, nel gruppo di pazienti con placca vulnerabile, l'espressione genica di PPAR- $\gamma$  nel core delle placche è risultata direttamente correlata all'espressione genica di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. L'esame immunostochimico infine ha evidenziato una maggior presenza di CD36 e LOX-1 nel core delle placche vulnerabili rispetto a quelle definite come non vulnerabili.*

*Alla luce dei nostri risultati, non è pertanto attualmente possibile attribuire il ruolo di destabilizzatori della placca agli agenti virali analizzati. Tuttavia, è stata evidenziata una significativa differenza nell'incidenza di vulnerabilità di placca tra i pazienti sottoposti a vaccinazione antinfluenzale rispetto a quelli non vaccinati.*

## ABSTRACT

*Recently, many studies have shown that viral agents can be involved in the pathogenesis of atherosclerosis. However, their role in destabilizing atherosclerotic plaques has not yet been elucidated, and neither have their underlying molecular mechanisms.*

*On the basis of the data currently available in the literature, we hypothesized that viral agents can promote the destabilization of already present atherosclerotic plaques, through direct infection or by mediating an immune response with systemic and especially local changes in the expression of inflammatory cytokines and chemokines, and with consequent activation of molecular pathways that would lead to the upregulation of the expression of scavenger receptors with greater affinity for oxidized LDL (CD36 and Lectine-Like-oxLDL-receptor 1 - LOX-1) on the macrophages.*

*The aim of the study was therefore to investigate the presence of genetic material of some viral agents in the carotid plaques of patients undergoing carotid endarterectomy (CEA) at IRCCS Policlinico San Donato (Vascular Surgery Unit), the expression of local and systemic inflammatory cytokines and PPAR- $\gamma$ , correlating the results obtained with the vulnerability of the removed plaque.*

*Data from 50 patients (mean age  $73.7 \pm 8.8$  years) were analyzed, 31 of whom had a vulnerable plaque (62%). The comorbidities of patients with vulnerable plaque were comparable to those of patients with stable plaque. The genome of Cytomegalovirus (CMV), Herpes-Simplex (HSV), Varicella Zoster (VZV) and Influenza Virus (IV) was not found in any of the vascular sample, while the Epstein-Barr (EBV) genome was found in two vulnerable plaques, in particular in both cases it was identified in the "core" but not in their respective control area. The serological determination of anti-EBV, CMV, HSV, VZV IgM and anti-IV IgA was negative in all cases, while for IgG it revealed that all patients had been exposed to EBV, 98% to CMV, 68% to VZV and 12% to HSV. No patients were operated on in a possible active phase of influenza and nearly half of them*

(22/50, 44%) had been vaccinated against IV in the previous 6 months, and resulted protected by the IgG. The viral exposure of patients with vulnerable plaque was not significantly different from that of patients with stable plaque. However, 82% of patients not receiving influenza vaccination (23/28) had a vulnerable carotid plaque, compared with 36% of vaccinated patients (8/22,  $P=0.001$ ).

Plasma levels of inflammatory cytokines (particularly TNF- $\alpha$  and IL-6) were higher in patients with vulnerable plaque than in patients with non-vulnerable plaque, however independently of comorbidities, viral exposure or flu vaccination.

Gene expression of the same cytokines in the plaque was greater in the "core" than in the control, especially in vulnerable plaques. Again, there were no significant differences in the expression of these cytokines based on comorbidities or viral exposure, however in patients with vulnerable plaque the expression of TNF- $\alpha$  in the "core" was greater in those who had not received the influenza vaccination compared to those who did. For IL-10 the opposite was observed.

In addition, in vulnerable plaques, PPAR- $\gamma$  tended to be more expressed in the "core" than in the control, especially in patients who had not undergone influenza vaccination. Moreover, in the group of patients with vulnerable plaque, the gene expression of PPAR- $\gamma$  in the "core" of the plaques was found to be directly related to the gene expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10. Finally, the immunohistochemical examination revealed a greater presence of CD36 and LOX-1 in the "core" of the vulnerable plaques compared to stable ones.

In light of our results, it is therefore not currently possible to define a possible relation between plaque vulnerability and the viral agents analyzed. However, there was a significant difference in the incidence of plaque vulnerability among patients undergoing influenza vaccination compared to those not vaccinated.

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b><i>pag. 1</i></b>
<b>1.1. Struttura e funzione della parete arteriosa.....</b>	<b><i>pag. 1</i></b>
<b>1.2. La formazione della placca aterosclerotica.....</b>	<b><i>pag. 3</i></b>
<b>1.3. La placca vulnerabile: recettori scavenger, PPAR-<math>\gamma</math> e citochine.....</b>	<b><i>pag. 7</i></b>
<b>1.4. Ruolo degli agenti infettivi.....</b>	<b><i>pag. 12</i></b>
1.4.1. Citomegalovirus	
1.4.2. Herpes Simplex Virus	
1.4.3. Virus di Epstein Barr	
1.4.4. Varicella-Zoster-Virus	
1.4.5. Influenza Virus	
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b><i>pag. 18</i></b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b><i>pag. 20</i></b>
<b>3.1. La raccolta dei campioni.....</b>	<b><i>pag. 20</i></b>
<b>3.2. Analisi delle citochine e di PPAR-<math>\gamma</math>.....</b>	<b><i>pag. 22</i></b>
<b>3.3. Ricerca del materiale genetico virale nelle placche e sierologia anticorpale.....</b>	<b><i>pag. 27</i></b>
<b>3.4. Analisi istologica della placca.....</b>	<b><i>pag. 35</i></b>
<b>3.5. Analisi immunoistochimica.....</b>	<b><i>pag. 35</i></b>
<b>3.6. Analisi statistica.....</b>	<b><i>pag. 37</i></b>
<b>4. RISULTATI</b>	<b><i>pag. 39</i></b>
<b>4.1. Presenza del materiale genetico virale nelle placche carotidee e correlazione con la sierologia anticorpale.....</b>	<b><i>pag. 41</i></b>

<i>4.2. Livelli di espressione ematica delle citochine.....</i>	<i>pag. 42</i>
<i>4.3. Espressione genica delle citochine nelle placche.....</i>	<i>pag. 44</i>
<i>4.4. Espressione genica di PPAR-<math>\gamma</math> nelle placche.....</i>	<i>pag. 46</i>
<i>4.5. Espressione di LOX-1 e CD-36 nelle placche.....</i>	<i>pag. 48</i>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<i>pag. 52</i>
<b>6. CONCLUSIONE</b>	<i>pag. 61</i>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag. 62</i>
<b>8. LISTA DELLE ABBREVIAZIONI IN ORDINE ALFABETICO</b>	<i>pag. 68</i>
<b>9. PRODOTTI SCIENTIFICI</b>	<i>pag. 72</i>
<b>10. RINGRAZIAMENTI</b>	<i>pag. 73</i>



## 1. INTRODUZIONE

Le malattie cardiovascolari sono la più importante causa di morte nel mondo occidentale [1]. L'aterosclerosi è la principale causa di questa condizione patologica ed è caratterizzata dal progressivo accumulo di lipidi e di cellule infiammatorie come macrofagi e linfociti all'interno della parete vasale delle arterie di grandi e medie dimensioni, a costituire le cosiddette "placche aterosclerotiche" [2].

Il processo di formazione di tali lesioni è differente a seconda dell'età, della genetica e dello stato fisiologico dell'individuo interessato. Inoltre, un ruolo chiave giocano fattori comportamentali e lo stile di vita di ciascun individuo, che possono portare alla presenza di una serie di patologie e fattori di rischio pro-aterosclerotici, quali in particolar modo l'ipertensione arteriosa sistemica, le dislipidemie, l'iperglicemia e l'abitudine al fumo di sigaretta [2]. Tuttavia, i precisi meccanismi molecolari sottostanti tale processo patogenetico sono tuttora oggetto di indagine. Inoltre, a parità di fattori di rischio, ancora non è chiaro come mai in alcuni soggetti si sviluppino lesioni aterosclerotiche più prone a scatenare eventi clinici acuti.

### **1.1. Struttura e funzione della parete arteriosa**

Le arterie sono organi cavi, la cui parete è costituita da tre strati concentrici sovrapposti ("tonache"), ognuno dei quali svolge una precisa funzione: la tonaca intima, la tonaca media e la tonaca avventizia (Figura 1).

- *Tonaca Intima.* La tonaca intima rappresenta lo strato più interno della parete vasale, e si estende dalla superficie luminale alla lamina elastica interna. La tonaca intima normalmente è costituita da un monostrato di cellule endoteliali con pochi leucociti,

fibrocellule muscolari lisce e fibre connettive, che appoggiano su una lamina basale. Quest'ultima fornisce inoltre le giunzioni focali per la connessione tra l'endotelio e la lamina elastica interna, tra i quali si frappongono alcune cellule del tessuto connettivo subendoteliale. Le cellule endoteliali risentono delle variazioni del flusso sanguigno, della pressione e della tensione di ossigeno nell'ambiente, attraverso specifici metaboliti cellulari attivati dai recettori su di essi presenti. Agonisti come la trombina, il fattore piastrinico e la bradichinina, ad esempio, aumentano i livelli di calcio intracellulare nella cellula endoteliale, attraverso cambiamenti accoppiati al recettore del metabolismo del fosfoinositolo. L'attivazione dei canali ionici induce eventi cellulari attraverso un sistema di generazione di secondi messaggeri che consente alle cellule endoteliali di regolare tono, infiammazione ed emostasi. Inoltre, le cellule endoteliali producono mediatori biologici (come ad esempio citochine e chemochine) che, attraverso determinati pathways molecolari, influenzano l'emostasi, l'immunogenicità, il rimodellamento vascolare e la vasoreattività.

- *Tonaca media*. La tonaca media è costituita da fibrocellule muscolari lisce, fibre collagene (soprattutto III e IV) e fibre elastiche, disposte su più strati concentrici, la cui composizione reciproca varia a seconda del calibro e della funzione delle arterie. Nelle arterie di grosso calibro (ad es. l'aorta), deputate a sopportare grosse pressioni di lavoro e che hanno una funzione prevalentemente propulsiva, le fibre elastiche sono predominanti. Al contrario, le arterie di piccolo e medio calibro hanno la funzione di regolare le resistenze periferiche attraverso la variazione del proprio diametro; le fibre muscolari sono pertanto più sviluppate.

In condizioni fisiologiche le fibrocellule muscolari lisce della tonaca media contribuiscono a regolare l'attività motoria dei vasi, sono in grado di sintetizzare vari tipi di collagene, proteoamminoglicani ed elastina, e sono dotate di recettori per le lipoproteine circolanti a bassa densità (Low-Density Lipoprotein, LDL).

- *Tonaca avventizia*. La tonaca avventizia è lo strato più esterno che avvolge i vasi arteriosi. È formata da connettivo fibrillare e/o elastico con cellule di origine mesenchimale e contiene una rete di *vasa vasorum* e di nervi che modulano il tono e la contrazione delle fibrocellule muscolari [3].

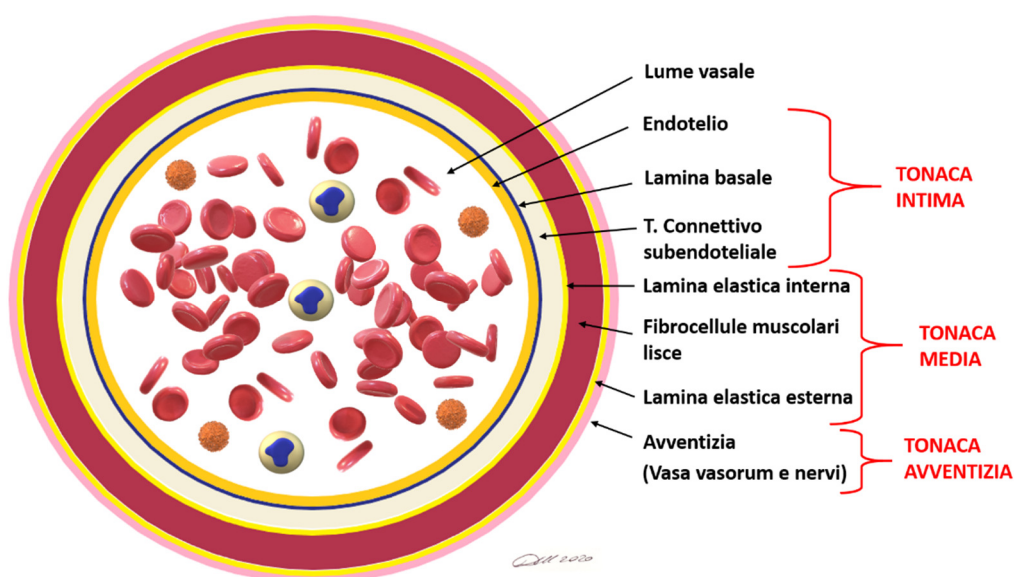


Figura 1. Struttura a tonache sovrapposte della parete vascolare.

### 1.2. La formazione della placca aterosclerotica

Sebbene l'evoluzione morfologica dell'aterosclerosi sia stata descritta in dettaglio, i suoi processi patofisiologici sono meno chiari. La teoria più pervasiva dell'aterogenesi è l'ipotesi di risposta al danno introdotta da

Virchow e più recentemente promossa da Ross [4]. Questa teoria attribuisce un ruolo chiave all'attivazione di vie di segnale pro-infiammatorie, l'espressione di citochine/chemochine e un aumentato stress ossidativo in favore della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), meglio conosciuti come "radicali liberi". Questi ultimi, in particolar modo, hanno un ruolo chiave nei meccanismi di ossidazione delle LDL, considerate ormai l'elemento di innesco e sviluppo del processo aterosclerotico [5].

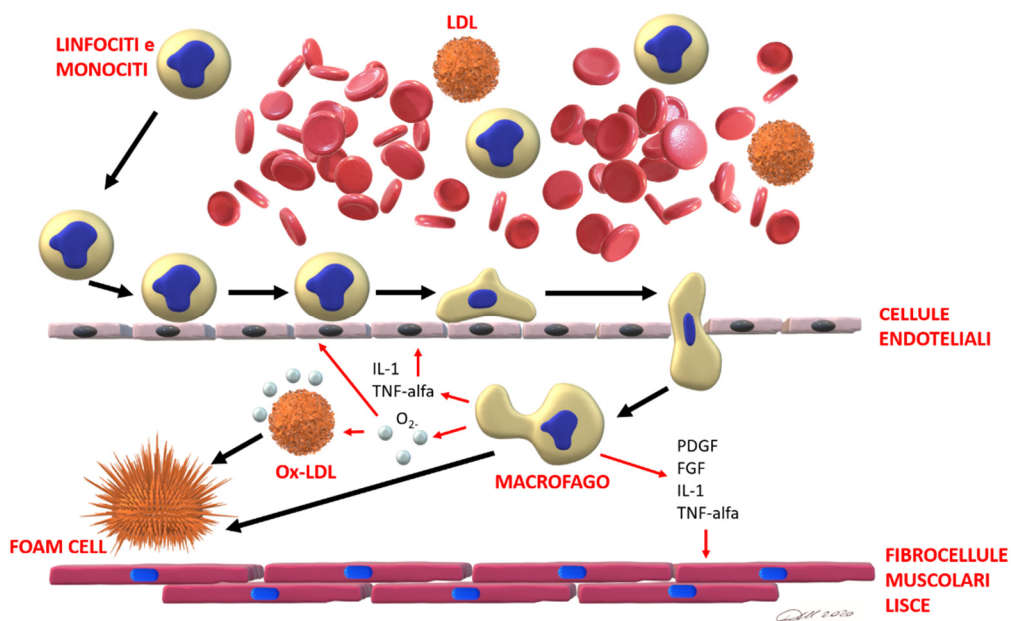
Lesioni meccaniche, chimiche, virali, reologiche o immunologiche possono agire localmente sulla parete arteriosa, stimolando le cellule endoteliali e i leucociti a sintetizzare in risposta le selectine. Queste ultime sono glicoproteine transmembrana che mediano le interazioni adesive intercellulari, e in modo particolare tra i leucociti (neutrofili, monociti e linfociti) e l'endotelio stesso.

Una volta adesi all'endotelio, i leucociti rotolano lungo la superficie endoteliale, entrando in contatto con ulteriori chemochine che promuovono il legame tra le integrine presenti sulla superficie degli stessi leucociti e i ligandi endoteliali, come ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare-1) e VCAM-1 (molecola di adesione cellulare-vascolare 1). Questo processo provoca il rilascio di contenuti lisosomiali e granulari, la produzione massiva di metaboliti reattivi dell'ossigeno e una condizione di aumentata permeabilità dell'endotelio mediata da ossido nitrico (NO), prostaciline, PDGF (platelet-derived growth factor), angiotensina II ed endotelina.

In conseguenza di tale danno endoteliale, le LDL si infiltrano nello spazio subendoteliale assieme ai monociti, che si differenziano in macrofagi; questi ultimi si polarizzano sotto l'effetto di alcuni fattori trascrizionali ed elaborano citochine pro-infiammatorie (come IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), fattori di crescita e una serie di molecole che formano un ambiente ossidativo,

nel quale avviene l'ossidazione delle LDL, che vengono poi fagocitate dai macrofagi a formare le cellule schiumose. In particolare, il meccanismo di ossidazione delle LDL è mediato da ioni metallici, da enzimi (lipo-ossigenasi, mieloperossidasi), da fenomeni di glicazione, e dal superossido nitrico ( $\text{ONOO}^-$ ), quest'ultimo formatosi dall'ossidazione del NO rilasciato dall'endotelio danneggiato.

Nello spazio subendoteliale si infiltrano inoltre altre lipoproteine e linfociti T. La migrazione di questi ultimi, può modulare ulteriormente la risposta della parete arteriosa attraverso la produzione stimolata da ulteriori linfocine e fattori di crescita da parte di cellule muscolari lisce e macrofagi, con conseguente alterazione della struttura e della funzione della tonaca intima. Inoltre, sotto lo stimolo di PDGF e del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF 2), le cellule muscolari lisce migrano dalla tonaca media all'intima, e a loro volta stimolano l'iperproduzione di collagene, fibronectina e glicoproteine che contribuiscono alla formazione dell'ateroma iperplastico (Figura 2).



*Figura 2. Processo di reclutamento e adesione dei linfociti e dei monociti alla parete vasale, migrazione degli stessi attraverso l'endotelio e differenziazione in macrofagi; internalizzazione delle LDL e loro ossidazione da parte dei radicali liberi dell'Ossigeno ( $O_2$ ) prodotti dai macrofagi (ox-LDL) e formazione delle cellule schiumose ("foam cell"). PDGF= fattore di crescita derivante dalle piastrine; FGF= fattore di crescita dei fibroblasti.*

Da un punto di vista strutturale, la placca si localizza pertanto nella tonaca intima. Essa presenta un nucleo centrale costituito da lipidi, macrofagi, leucociti, collagene, fibre elastiche e proteoglicani (core lipidico), ricoperto da un cappuccio fibroso di cellule muscolari lisce e tessuto connettivo denso. Tra il core lipidico e il cappuccio fibroso si trova la cosiddetta "spalla", un'area cellularizzata costituita da macrofagi, cellule muscolari lisce e linfociti T.

Il rilascio delle metalloproteinasi di matrice da parte delle cellule T attivate può anche contribuire all'assottigliamento e alla rottura del cappuccio fibroso, elementi chiave per l'innescare di un evento trombotico acuto [6].

I siti anatomici ove più frequentemente si localizzano le placche aterosclerotiche sono le arterie coronarie, le carotidi, l'aorta, le arterie iliache e le arterie femorali (Figura 3).

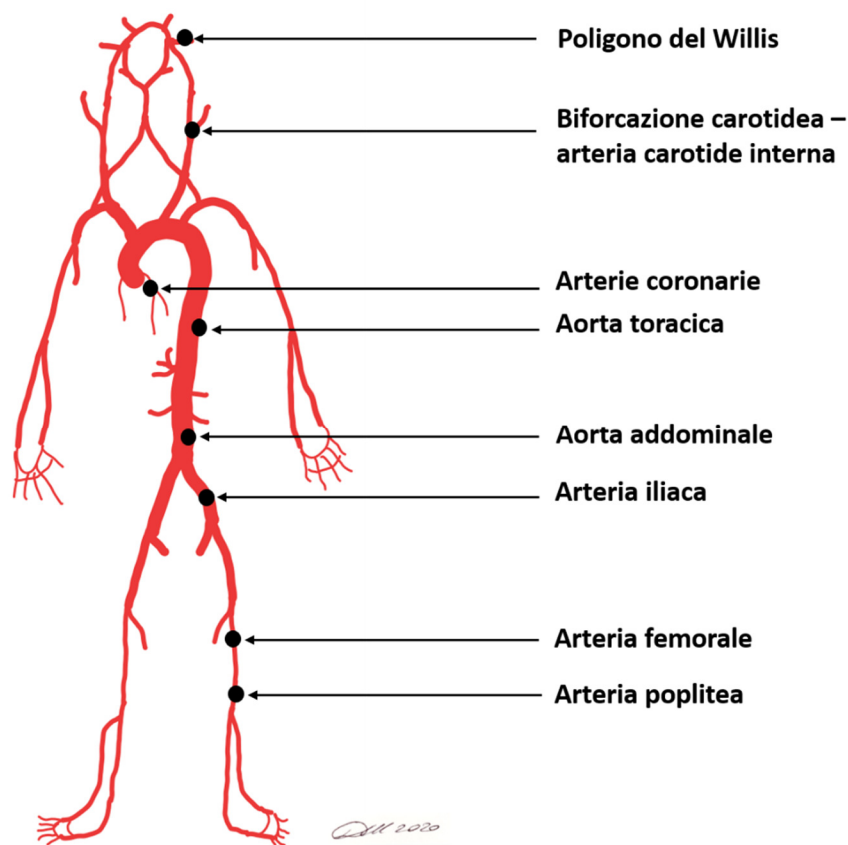


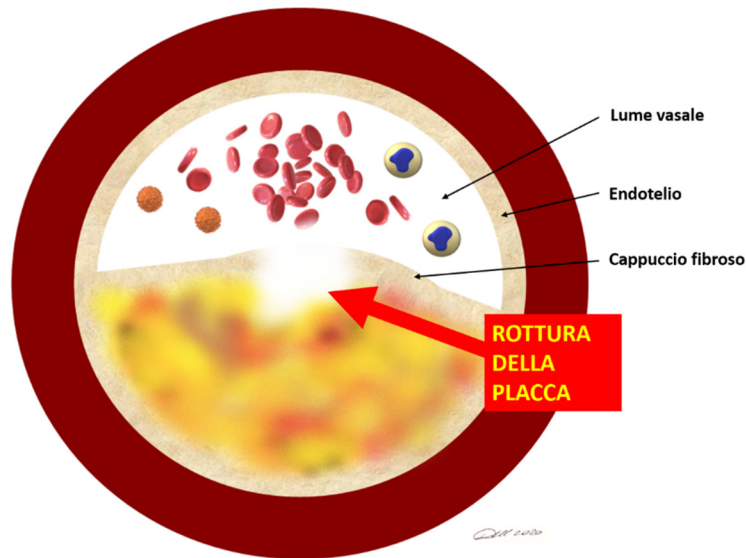
Figura 3. Siti preferenziali di localizzazione delle placche aterosclerotiche.

### **1.3. La placca vulnerabile: recettori scavenger, PPAR- $\gamma$ e citochine**

Le proporzioni relative delle componenti del core lipidico, nonché lo spessore del cappuccio fibroso, variano nelle differenti placche, dando luogo a lesioni che possono essere più o meno vulnerabili, ossia prone a rompersi occludendo acutamente il vaso interessato, oppure a frammentarsi sotto la spinta del torrente ematico, con conseguente embolizzazione delle sue parti nel circolo periferico.

Il *core* delle placche vulnerabili, spesso necrotico, è costituito maggiormente da materiale lipidico (prevalentemente colesterolo e suoi esteri), in forma libera o contenuto dalle cellule che lo hanno fagocitato, ossia i monociti circolanti attivati in macrofagi a formare le “cellule

schiumose”. Nel *core* si trovano inoltre altri detriti cellulari e trombi in stato di organizzazione [3] (Figura 4).



*Figura 4. Placca aterosclerotica vulnerabile. Si noti la rottura del cappuccio fibroso con conseguente esposizione del materiale nel “core” della placca alla circolazione ematica.*

È stato dimostrato uno stretto legame tra l'attivazione dei processi infiammatori e la stabilità della placca [7].

In particolar modo, le LDL ossidate (oxLDL) costituiscono un importante stimolo antigenico per la regolazione della risposta immunitaria nell'aterosclerosi, attraverso un'azione sull'endotelio, sui fibroblasti, sulle piastrine e sui macrofagi, mediata da alcuni recettori, tra cui i più studiati sono LOX-1 e CD36.

LOX-1 (LDLreceptor-1 ossidato simile alla lectina), è una glicoproteina di membrana da 50 kDa che funge da recettore, oltre che per le ox-LDL, per le lipoproteine modificate, per le piastrine attivate e per i prodotti finali della glicazione avanzata. Il legame di LOX-1 con le ox-LDL induce infatti nelle cellule endoteliali e nei macrofagi l'attivazione di NF-kB attraverso



una maggiore produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno e una varietà di risposte cellulari aterogeniche tra cui la riduzione del rilascio di ossido nitrico (NO), e l'adesione dei monociti. LOX-1 espresso non costituzionalmente sui macrofagi stimola la formazione di cellule schiumose e la generazione di metalloproteinasi, che contribuiscono all'instabilità della placca e alla formazione del trombo [8].

CD36 è una glicoproteina multifunzionale che funge da recettore per una vasta gamma di ligandi di natura proteica o lipidica, nonché di molecole associate ai patogeni, con conseguente attivazione dell'angiogenesi, della risposta infiammatoria e del metabolismo degli acidi grassi. In particolare, da un lato il legame con le ox-LDL innesca la cascata infiammatoria attivando l'inflammasoma NLRP3, con produzione di citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mediata dal fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B [9]. Dall'altro lato, lo stesso legame tra le ox-LDL e CD36 comporta l'attivazione di un pathway molecolare mediato dalla trascrizione di PPAR- $\gamma$ .

Quest'ultimo, è un isotipo dei recettori attivati da proliferatori perossisomiali (Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) che appartengono alla famiglia dei recettori nucleari di fattori di trascrizione attivati dai ligandi. Dopo attivazione, i PPARs eterodimerizzano con i recettori nucleari dell'acido 9-cis-retinoico (RXR) per legarsi ad uno specifico elemento del DNA (PPAR Response Element, PPRE) e modulare la trascrizione di alcuni geni target. In particolar modo, PPAR- $\gamma$  è espresso costitutivamente a livello endoteliale e nei macrofagi differenziati. Tra i geni target di PPAR- $\gamma$  vi sono il gene AP2 specifico per il tessuto adiposo, il gene di trasporto degli acidi grassi, la proteina legante gli acidi grassi, FAT/CD36, l'acil-CoA sintasi, GLUT4, la glucochinasi, la fosfoenolpiruvato carbossichinasi, le proteine disaccoppianti 1, 2 e 3, alcuni geni coinvolti nella segnalazione

dell'insulina, e l'espressione delle citochine proinfiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  [10]. Tra i vari ligandi di PPAR- $\gamma$  in vitro, le ox-LDL internalizzate mediante CD36 sono responsabili di una importante risposta di attivazione della trascrizione del gene dello stesso CD36, con un conseguente loop di autoregolazione positiva considerato pro-aterogenico [11]. Tuttavia, diversi meccanismi post-trascrizionali influiscono sulla funzione regolatoria di PPAR- $\gamma$  (sumoilazione, fosforilazione, acetilazione, ubiquitinazione). Inoltre, oltre ad attivare i geni bersaglio, PPAR- $\gamma$  può anche interferire con NF- $\kappa$ B, l'attivatore trascrizionale di STAT e la proteina di attivazione 1 (AP-1) in modo non legante il DNA, con un meccanismo di segnalazione che porta all'inibizione della trascrizione dei geni della risposta infiammatoria.

Le ox-LDL parallelamente possono legare i Toll-like Receptors e indurre la trascrizione delle citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ .

Infine, ci sono attuali evidenze che le ox-LDL possano modulare la risposta delle linfocellule T, con richiamo di CD4+ e CD8+, nonché delle linfocellule B.

L'esagerata risposta ai virus (ed in particolare ai virus respiratori), nota anche come "tempesta di citochine", e il danno endoteliale diretto indotto da alcuni agenti virali, possono rappresentare un importante stimolo per innescare la produzione di specie reattive dell'ossigeno con conseguente ossidazione delle LDL.

Tra le citochine principalmente coinvolte nel fenomeno della "tempesta di citochine" vi sono:

- TNF-alfa: è una delle principali citochine della "risposta di fase acuta", appartiene alla sottofamiglia citochinica dei *Tumor Necrosis Factors*. È prodotta principalmente dai macrofagi, ma anche da linfociti T CD4+, dalle cellule NK, dai granulociti e dai neuroni (sebbene in minor misura). Induce la febbre, la morte

programmata delle cellule per apoptosi, e stimola la produzione cellulare di IL-1 e IL-6 (nella “tempesta citochinica” in risposta alla sepsi). È stato dimostrato che la progressione aterosclerotica della placca si correla con un aumento locale dell’espressione di TNF-alfa sia a livello plasmatico che all’interno della placca. Tuttavia, il suo ruolo nella destabilizzazione delle placche non è ancora stato indagato [12].

- IL-1 beta: appartiene alla sottofamiglia citochinica delle *Interleuchine* ed è una citochina proinfiammatoria prodotta dalla serie mieloide. IL-1 beta accelera il processo aterosclerotico ma ancora non è chiaro il suo ruolo nella destabilizzazione della placca [13].
- IL-6: appartiene alla sottofamiglia citochinica delle *Interleuchine* e può avere sia un ruolo pro-infiammatorio che anti-infiammatorio nella patogenesi di alcuni disordini autoimmuni. Secondo alcuni studi, il ruolo protettivo o patogenetico di IL-6 nell’aterosclerosi dipende dallo stadio della malattia [12].
- IL-8: appartiene alla sottofamiglia citochinica delle *Interleuchine*, ed è una potente citochina pro-infiammatoria. Alcuni studi hanno dimostrato la presenza di IL-8 all’interno delle placche aterosclerotiche, e recentemente Yang e coll. [14] hanno evidenziato che l’utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-IL-8 riduce il livello di questa interleuchina nelle placche, con conseguente soppressione dell’infiltrazione dei macrofagi e possibile incremento della stabilità della placca.
- RANTES (o CCL5): appartiene alla sottofamiglia citochinica delle *Chemochine* ed è prodotta dai Linfociti T. Alcuni studi hanno già evidenziato una correlazione lineare tra i livelli plasmatici di espressione di RANTES e l’aterosclerosi [15]. Inoltre, uno studio

condotto da Lv YB e Coll. nel 2014 ha dimostrato che RANTES potrebbe essere un indicatore di vulnerabilità della placca nei conigli [16].

Queste citochine pro-infiammatorie inducono l'attività protrombotica e l'apoptosi nella placca. Inoltre, i macrofagi attivati e i linfociti T già presenti producono a loro volta metalloproteinasi e citochine che indeboliscono il cappuccio fibroso. Quando questo cappuccio non può più resistere alla forza meccanica della pressione sanguigna su di esso esercitata, nella placca si formano fessure superficiali che espongono al torrente circolatorio la superficie interna, innescando rapidamente l'attivazione piastrinica e la cascata della coagulazione, con formazione di un trombo che può occludere l'arteria nel sito di rottura della placca o embolizzare occludendo il lume di un sito arterioso a valle.

Per contrastare tutti questi segnali pro-infiammatori e distruttivi dei tessuti, alcuni macrofagi e cellule T producono molecole anti-infiammatorie che contrastano l'infiammazione vascolare e riducono il rischio di rottura della placca. Tra questi, il fattore di crescita trasformante beta ( $TGF-\beta$ ) e l'interleuchina-10 (IL-10) inibiscono l'infiammazione e l'attivazione delle cellule immunitarie [17].

#### ***1.4. Ruolo degli agenti infettivi.***

Negli ultimi anni, ci sono state evidenze sempre crescenti di come le infezioni (in particolar modo quelle virali) possano essere causa di innesco e progressione del processo aterosclerotico mediante meccanismi di infiammazione della parete arteriosa (Tabella 1) [18].

**Tabella 1. Meccanismi di effetto dei principali virus coinvolti nello sviluppo e progressione della malattia aterosclerotica e localizzazione del sito aterosclerotico.**

<b>Virus</b>	<b>Effetto</b>	<b>Localizzazione della lesione aterosclerotica</b>
CMV	Diretto, indiretto	Aorta addominale, a. femorale, a. carotide
HSV-1, HSV-2	Diretto, indiretto	Aorta addominale, a. coronarie, a. carotide
EBV	Diretto, indiretto	Aorta addominale, a. coronarie, a. carotide
VZV	Diretto, indiretto	Vasi cerebrali
Influenza A	Diretto, indiretto	A. coronarie

*CMV= Citomegalovirus; HSV= Herpes Simplex Virus; EBV= Epstein-Barr Virus; VZV= Varicella-Zoster Virus. Tratto da Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018;37:2227.*

In alcuni casi, i virus vengono isolati all'interno delle placche. In questa situazione, il meccanismo patogenetico ipotizzato è sia effetto diretto (verosimilmente per legame con l'endotelio), sia di attivazione di una risposta immunitaria innata. Altre volte (come nel caso dei pazienti con HIV), l'azione virale è indirettamente mediata dall'effetto di biomarcatori infiammatori acuti che agiscono sulla parete arteriosa e che potenziano l'infiammazione cronica che è già presente all'interno della placca [18]. Tuttavia, il ruolo degli agenti infettivi nel processo di destabilizzazione delle placche aterosclerotiche, è ancora oggetto di studio. Di seguito vengono brevemente descritti i principali agenti infettivi coinvolti nel processo dell'aterosclerosi.

### 1.4.1. Citomegalovirus

Il Citomegalovirus (CMV) appartiene al gruppo degli herpesvirus, ed è un virus estremamente diffuso a livello mondiale. Si tratta di un virus il cui genoma è costituito da un'unica molecola lineare di DNA a doppio filamento. Infetta il suo ospite tramite i liquidi biologici e colpisce diversi tipi cellulari, causando un'infezione che, nell'individuo immunocompetente, decorre prevalentemente in forma asintomatica. In alcuni casi, come è tipico per la famiglia degli herpesvirus, il genoma virale si integra in quello della cellula ospite, dando luogo ad una infezione latente ma quiescente fino a riattivazione del virus stesso.

Le evidenze attualmente disponibili sulla presenza del CMV nelle placche aterosclerotiche umane sono ambigue. Molti studi riportano, a seguito di infezione, la presenza del DNA virale nelle placche aterosclerotiche in una percentuale che varia dal 30% al 90% dei casi. Alcuni studi, al contrario, dimostrano che non esiste alcuna associazione tra CMV e aterosclerosi [18].

Ulteriori studi invece riportano che i rapidi incrementi di alcune citochine plasmatiche pro-infiammatorie e pro-aterosclerotiche, come l'interferone-gamma e il TNF-alfa, possano supportare l'ipotesi del coinvolgimento di un meccanismo indiretto, più che di un danno mediato direttamente dal virus [18].

Infine, alcuni autori hanno dimostrato che il CMV può avere un ruolo anche nella rottura della placca. In particolare, il virus nel suo stato latente nei monociti infiltranti potrebbe essere riattivato quando queste cellule si differenziano in macrofagi, con conseguente stimolazione della produzione di citochine infiammatorie, chemochine e alterazione dell'equilibrio delle metalloproteinasi della matrice (MMP) [19].

### **1.4.2. Herpes Simplex Virus**

Gli Herpes Simplex Virus (HSV) sono grandi herpesvirus con genoma costituito da DNA lineare a doppio filamento. HSV (HSV-1 e HSV-2) infetta generalmente fibroblasti o cellule epiteliali, provocandone la lisi, nonché i neuroni, questi ultimi in modo latente.

Il ruolo degli HSV nella patogenesi delle placche aterosclerotiche è stato dimostrato fin dai primi anni Novanta, quando uno studio ha evidenziato che le cellule endoteliali infette da HSV esprimono una molecola di adesione (GMP140) capace di mediare infiammazione e danno endoteliale [18]. Inoltre, HSV può incrementare il processo di internalizzazione delle LDL ossidate nelle cellule endoteliali [19], tipiche delle placche più instabili.

HSV-2 ha un effetto pro-trombotico e pro-aterogenico nelle cellule dell'ospite, sebbene il suo ruolo nella destabilizzazione delle placche aterosclerotiche sia ancora da definire.

HSV-6 e HSV-7 sono virus molto diffusi e quasi tutti gli individui li contraggono nella prima infanzia, sviluppando la Sesta Malattia. Entrambi i virus hanno tropismo per i linfociti T CD4+, che sono tipicamente ritrovati nelle lesioni aterosclerotiche maggiormente instabili.

Non è stata tuttavia ancora dimostrata la presenza di HSV-7 nelle placche aterosclerotiche, mentre HSV-6 è stato talvolta isolato in alcuni tessuti vascolari [20]. Tuttavia, il ruolo di entrambi i virus nella destabilizzazione della placca è tuttora oggetto di studio.

### **1.4.3. Virus di Epstein-Barr**

Il virus di Epstein-Barr (EBV) o Human Herpesvirus 4 (HHV-4) è costituito da una molecola lineare di DNA a doppio filamento, appartenente alla

famiglia degli herpesvirus. Le cellule colpite di preferenza dall'EBV sono i linfociti B e i monociti. EBV è responsabile della mononucleosi infettiva ed è coinvolto nella genesi di alcuni tumori epiteliali e di alcuni tipi di linfoma (linfoma di Burkitt, linfoma di Hodgkin), dal momento che persiste in maniera asintomatica nei linfociti B dell'ospite [21].

L'associazione tra l'infezione di EBV e la patogenesi dell'aterosclerosi è contraddittoria, sebbene alcuni studi abbiano dimostrato la presenza del DNA di EBV nelle placche aterosclerotiche [22]. Resta ancora da stabilire il ruolo di EBV nella destabilizzazione di tali placche.

#### **1.4.4. Varicella Zoster Virus**

Varicella-Zoster Virus (VZV) è un virus a DNA che fa parte della famiglia dei virus dell'herpes simplex, e come tale anch'esso può sopravvivere nelle cellule dell'ospite in uno stato di latenza. L'infezione primaria da VZV causa la varicella, malattia tipica dell'età infantile. La riesposizione o la riattivazione di VZV nell'età adulta, in condizioni di depressione del sistema immunitario è causa di herpes zoster (conosciuto anche come "Fuoco di Sant'Antonio") [23].

Diversi studi hanno dimostrato l'associazione tra VZV e l'aterosclerosi dei vasi cerebrali [24]. Il meccanismo con cui VZV agirebbe si verificherebbe, secondo alcuni autori, attraverso un danno dei tessuti vascolari mediato sia dall'infezione della parete vascolare, sia dall'attivazione della cascata infiammatoria sistemica per cross-reazione dei complessi antigene-anticorpo con alcuni fosfolipidi di membrana [25].

Resta ancora da stabilire il ruolo di VZV nella destabilizzazione delle placche aterosclerotiche.



#### 1.4.5. Influenzavirus

L'influenzavirus (in particolare Influenzavirus A) è un virus appartenente alla famiglia degli Orthomyxoviridae, costituito da un genoma a RNA a singolo filamento. Ne esistono diversi sottotipi, in accordo con le possibili combinazioni tra le diverse forme di emoagglutinina (H, da H1 a H18) e di neuraminidasi (N, da N1 a N11).

Gli studi sul ruolo del virus dell'Influenza A nell'aterosclerosi sono pochi, sebbene vi siano alcuni lavori che hanno dimostrato che il vaccino antinfluenzale ha un effetto protettivo contro le malattie cardiovascolari [26]. È noto che l'infezione influenzale provochi l'attivazione e il danneggiamento dell'endotelio attraverso una "tempesta di citochine", con iperproduzione e secrezione del fattore di necrosi tumorale (TNF), di interleuchina 6 (IL-6) e di interleuchina 1 beta (IL-1b), distruzione delle giunzioni strette dell'endotelio, incremento della permeabilità vascolare e formazione delle cellule schiumose attraverso una riprogrammazione epigenetica dei monociti, o mediante una sovra-regolazione dei segnali delle integrine [27].

Tuttavia, attualmente non vi sono studi che abbiano riportato la presenza del genoma influenzale o di proteine associate all'interno delle placche aterosclerotiche.

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Sulla base dei dati attualmente disponibili in letteratura, si è ipotizzato che gli agenti virali possano promuovere la destabilizzazione delle placche aterosclerotiche già presenti, attraverso un'infezione diretta o mediando una risposta immunitaria che porterebbe a cambiamenti sistemici ma soprattutto locali nell'espressione delle citochine e chemochine pro-infiammatorie, con conseguente aumento del reclutamento dei monociti macrofagi e sovraregolazione dell'espressione dei recettori scavenger sulla superficie dei macrofagi con maggiore affinità per le LDL ossidate (CD36 e Lectine-Like-oxLDL-receptor 1, LOX-1) attraverso un pathway molecolare di attivazione mediato da PPAR- $\gamma$  (Figura 5).

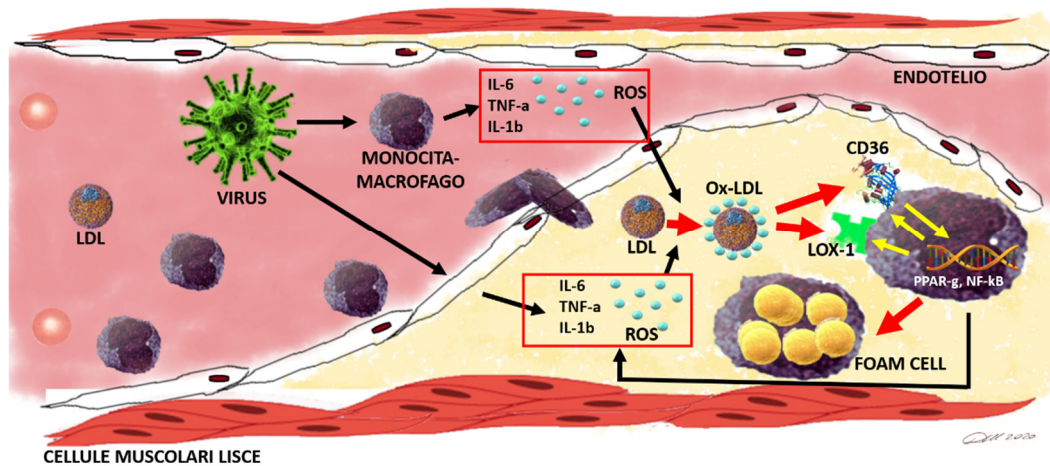


Figura 5. Meccanismo ipotizzato nella destabilizzazione delle placche aterosclerotiche da parte degli agenti virali.

Scopo dello studio è stato pertanto quello di studiare la presenza di materiale genetico di alcuni agenti virali coinvolti nel processo di aterosclerosi, la presenza di citochine infiammatorie circolanti e l'espressione genica delle stesse citochine e di PPAR- $\gamma$  nelle placche carotidee aterosclerotiche di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico

di endoarteriectomia carotidea (CEA) presso l'IRCCS Policlinico San Donato (Unità Operativa di Chirurgia Vascolare), correlando i risultati ottenuti con la vulnerabilità della placca asportata e con l'esposizione dei pazienti agli agenti virali analizzati.

### **3. MATERIALI E METODI**

Il presente lavoro è frutto di uno studio monocentrico spontaneo di base con arruolamento prospettico, che è stato condotto in collaborazione tra l'Unità Operativa di Chirurgia Vascolare dell'IRCCS Policlinico San Donato, il Laboratorio di ricerca della Biobanca BioCor dell'IRCCS Policlinico San Donato, il Servizio di Anatomia Patologica e Citodiagnostica dell'IRCCS Policlinico San Donato e il Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche dell'Università degli Studi di Milano.

Tale studio ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico dell'Ospedale San Raffaele in data 18/07/2019 (numero del registro dei pareri del CE: 131/int/2019).

#### ***3.1. La raccolta dei campioni***

I dati sono stati raccolti a partire dal 18/07/2019, su pazienti adulti (età  $\geq 18$  anni) che hanno fornito il proprio consenso alla partecipazione allo studio, afferenti alla Unità Operativa di Chirurgia Vascolare dell'IRCCS Policlinico San Donato per essere sottoposti ad intervento di endoarteriectomia carotidea per stenosi carotidea significativa (in accordo con le Linee Guida Internazionali: pazienti asintomatici con stenosi carotidea  $\geq 80\%$  sec. ECST e pazienti sintomatici per eventi neurologici con stenosi  $\geq 70\%$  sec. ECST [28]). Sono stati esclusi dallo studio i pazienti minorenni, le donne in stato di gravidanza/allattamento e i pazienti che non hanno fornito il proprio consenso alla partecipazione allo studio.

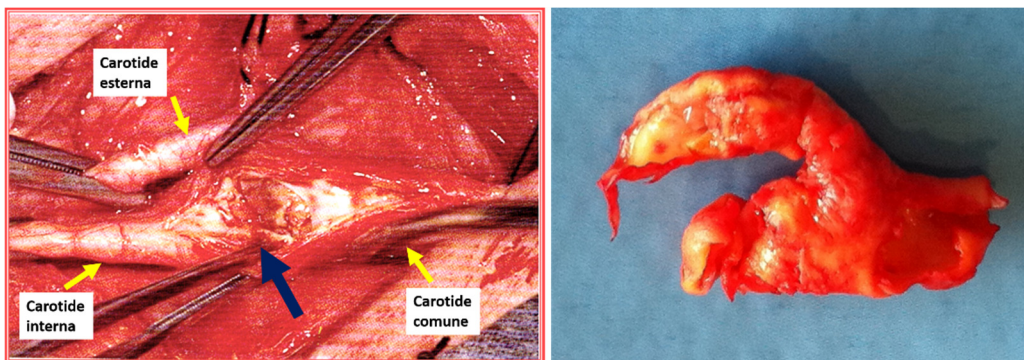
Dalle cartelle cliniche sono stati raccolti i seguenti dati in forma anonima:

- anagrafici (età, sesso);
- comorbilità (presenza di fattori di rischio cardiovascolari: ipertensione

arteriosa, fumo, dislipidemia, cardiopatia ischemica, BPCO, diabete mellito; insufficienza renale cronica, storia di eventi ischemici cerebrovascolari);

- storia di esecuzione della vaccinazione antinfluenzale;
- clinici (peso, altezza);

Come da pratica clinica, i pazienti sono sottoposti all'intervento di endoarteriectomia carotidea, ossia di rimozione chirurgica della placca aterosclerotica condizionante la stenosi significativa dell'arteria carotide interna (Figura 6).



*Figura 6. A sinistra: immagine intraoperatoria dell'intervento chirurgico di endoarteriectomia con asportazione della placca aterosclerotica (freccia blu) dalla biforcazione carotidea. A destra: particolare della placca aterosclerotica rimossa "a stampo".*

All'ingresso in sala operatoria, a ciascun Paziente sono stati prelevati 4 ml di sangue in 4 provette con anticoagulante EDTA, da un accesso venoso periferico già posizionato per l'intervento chirurgico indipendentemente dallo studio. Tali campioni ematici, insieme ai campioni di placca aterosclerotica asportata durante l'intervento, sono stati conservati e processati in modo appropriato per le singole analisi. I dati raccolti sono stati inseriti in un database elettronico dedicato, e

opportunamente analizzati.

Il sangue raccolto in provette Vacutainer viene lasciato coagulare per 30-45 minuti a temperatura ambiente (RT). Le provette vengono centrifugate a 1500 x g a RT per 15 minuti. Questa velocità, tempo e temperatura faranno minimizzare la contaminazione piastrinica del campione che può influire sulle successive analisi del campione stesso. Il siero viene raccolto assicurandosi di non rompere il coagulo, suddiviso in aliquote da 0,5 ml e conservate a -80°.

Utilizzando uno stereomicroscopio, dal pezzo biotico di placca carotidea che giunge in laboratorio viene separata l'area core-placca dall'area no-placca. Se la dimensione del pezzo lo consente, ciascuna area viene poi suddivisa in 3 parti:

- 1) un pezzo core-placca e un pezzo no-placca vengono posti in RNAlater a 4°C overnight. Il giorno successivo i pezzi vengono tolti dall'RNAlater e conservati a -80°C.
- 2) un pezzo core-placca e un pezzo no-placca vengono congelati direttamente in azoto liquido e conservati in azoto liquido.
- 3) un pezzo core-placca e un pezzo no-placca vengono posti in formalina tamponata per 24h e successivamente inclusi in paraffina.

### ***3.2. Analisi delle citochine e di PPAR- $\gamma$***

La determinazione delle citochine nel plasma è stata effettuata utilizzando i kit R&D Systems® seguendo il protocollo indicato dalla casa produttrice.

In particolar modo, sono state analizzate le seguenti citochine: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e RANTES (CCL5).

Nella placca, è stata valutata l'espressione di TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, RANTES (CCL5) e di PPAR- $\gamma$ .

### Retrotrascrizione

L'espressione delle citochine è stata analizzata sia nel "core" della placca sia in una porzione adiacente considerata come controllo interno.

L'RNA estratto è stato sottoposto a retrotrascrizione mediante l'utilizzo del kit QuantiTec Reverse Trascrizione (Qiagen, Germania). 500ng di RNA sono stati trattati e incubati per due minuti a 42°C con il buffer gDNA Wipeout buffer 7x al fine di eliminare il DNA genomico.

Viene poi effettuata la reazione di retrotrascrizione e la composizione della miscela utilizzata è riportata nella Tabella 2.

**Tabella 2: composizione mix di retrotrascrizione**

Reverse-transcription master mix	1 $\mu$ l
Quantiscript RT buffer, 5x	4 $\mu$ l
RT primer Mix	1 $\mu$ l
Template RNA (intero volume reazione precedente)	14 $\mu$ l
Volume finale	20 $\mu$ l

La reazione prevede un'incubazione di 30 minuti a 42°C e 3 minuti a 95°C, per inattivare l'enzima. Il cDNA così ottenuto viene conservato a -80°C per le successive analisi.

### Real time PCR chimica SYBR Green

L'espressione delle citochine IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL-5, IL-10, PPAR $\gamma$  e TNF- $\alpha$  viene quantificata mediante un saggio di Real Time PCR, con chimica

SYBR Green. La reazione di amplificazione viene condotta in un volume finale di 20 $\mu$ l, contenente 0,7 $\mu$ M del primer forward, 0,7 $\mu$ M del primer reverse e 2 $\mu$ l del cDNA, mediante l'utilizzo dello strumento Rotor-Gene G (Qiagen). La composizione della mix di amplificazione e le sequenze dei primer sono riportate rispettivamente nelle tabelle 3 e 4. L'espressione delle citochine è stata normalizzata rispetto all'espressione di quattro geni housekeeping, la B actina, RPL13, RPL23 e UBC.

**Tabella 3: composizione della mix di amplificazione mediante chimica SYBR green**

MIX	[ ]stock	[ ]finale	1X
Master Mix QuantiNova SYBR Green (Qiagen)	2X	1X	10 $\mu$ l
Forward Primer	100 $\mu$ M	0,70 $\mu$ M	0,14 $\mu$ l
Reverse Primer	100 $\mu$ M	0,70 $\mu$ M	0,14 $\mu$ l
cDNA			2 $\mu$ l
H2O			7,72 $\mu$ l



**Tabella 4: sequenze primer per la Real Time PCR**

<b>Primer</b>	<b>Sequenza 5'-3'</b>	<b>Riferimento per la Sequenza</b>
<b>IL-6 Fw</b>	GTAGCCGCCCCACACAGACAGCC	
<b>IL-6 Rev</b>	GCCATCTTTGGAAGGTTTC	
<b>IL1<math>\beta</math> Fw</b>	ATGCACCTGTACGATCACTGA	
<b>IL1 <math>\beta</math> Rev</b>	ACAAAGGACATGGAGAACACC	
<b>CCL5 Fw</b>	GAGTATTTCTACACCAGTGGCAAG	
<b>CCL5 Rev</b>	TCCCGAACCCATTTCTTCTCT	
<b>b-actina Fw</b>	TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC	
<b>b-actina Rev</b>	GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC	
<b>IL10 Fw</b>	AGAACCTGAAGACCCTCAGGC	
<b>IL10 Rev</b>	CCACGGCCTTGCTCTTGTT	

---

stage of lung cancer.  
(Wang e Coll. 2011)

---

<b>PPAR<math>\gamma</math></b> <b>Fw</b>	TTGTCACGGAACACGTGCA
<b>PPAR<math>\gamma</math></b> <b>Rev</b>	GGAGCGGGTGAAGACTCATG
<b>TNF<math>\alpha</math></b> <b>Fw</b>	CCACTTCGAAACCTGGGATTC
<b>TNF<math>\alpha</math></b> <b>Rev</b>	TTAGTGGTTGCCAGCACTTCA
<b>RPL23</b> <b>Fw</b>	TCC GGA TTT CCT TGG GTC TT
<b>RPL23</b> <b>Rev</b>	TGT TCA GCC GTC CCT TGA TC
<b>RPL13</b> <b>Fw</b>	GAA CTG AAA CTG GCC
<b>RPL13</b> <b>Rev</b>	TGC CGA CTG ATT CCA
<b>UBC Fw</b>	GAT CGC TGT GAT CGT CAC TTG ACA A
<b>UBC Rev</b>	AGT CAG ACA GGG TGC GCC CA

---

Il profilo termico della reazione prevede una denaturazione iniziale di 10 minuti a 95°C e in seguito 45 cicli caratterizzati da tre diverse fasi: la denaturazione a 95°C per 10 secondi, l'appaiamento dei primer a 60°C per 15 secondi e l'allungamento del filamento complementare sintetizzato a 72°C per 20 secondi.

La quantificazione dell'espressione delle diverse citochine è stata effettuata mediante il metodo comparativo Ct e la differenza di espressione nei campioni biologici è stata calcolata mediante la

quantificazione relativa (RQ).

$$\Delta Ct \text{ citochina} = Ct \text{ citochina} - Ct \text{ media dei geni housekeeping}$$
$$\Delta Ct \text{ medio citochina} = \Sigma Ct \text{ citochina} / \text{numero di campioni}$$
$$\text{Espressione RQ} = 2^{-(\Delta Ct \text{ campione} - \Delta Ct \text{ controllo})}$$

### ***3.3. Ricerca del materiale genetico virale nelle placche e sierologia anticorpale***

È stato ricercato il materiale genetico di EBV, CMV, HSV, VZV e Influenza A nelle placche dei pazienti, sia nel “core” della placca, corrispondente al punto di massima stenosi, sia in una porzione adiacente di endotelio rimosso per necessità tecnica durante l'intervento e considerato il controllo “sano”.

#### **Estrazione del DNA e RNA**

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen, Germania), che prevede la combinazione ottimizzata di una lisi meccanica, chimica ed enzimatica per l'omogeneizzazione del tessuto e permette di avere una resa elevata in breve tempo.

In breve, una porzione di 5-30 mg di placca viene ridotta in piccoli frammenti mediante l'utilizzo di un bisturi e trasferita in un Tissue Disruption Tube (fornito dal kit) contenente una componente mobile che favorisce la disgregazione del tessuto durante l'agitazione. Vengono quindi addizionati i buffer di lisi e gli enzimi (proteinasasi K e RNAasi A) forniti dal kit e il campione viene incubato in ThermoMixer (Eppendorf, Italia) a 1000 rpm, 56°C per almeno 10 minuti e fino ad 1 ora nel caso in cui il lisato non sia sufficientemente omogeneo. Il campione viene

fatto adsorbire sulla membrana di silice di una colonnina QIAamp Mini Spin Column, lavato ed eluito in 50 µl di H<sub>2</sub>O DNasi-free; la concentrazione dell'RNA isolato viene quantificata mediante NanoPhotometer NP80 (Implen, Germania).

Per l'estrazione dell'RNA con RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Germania) sono stati utilizzati circa 70 mg di placca. Il tessuto sminuzzato mediante l'utilizzo del bisturi viene incubato con il buffer di lisi e proteinasi K (forniti dal kit) a 56°C, 1000 rpm in ThermoMixer (Eppendorf, Italia) overnight. Al campione viene quindi aggiunto QIAzol Lysis Reagent e cloroformio e, dopo agitazione per 15 secondi, il campione viene posto in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugato a 12000 g a 4°C per 15 minuti, con la formazione di tre fasi: una acquosa trasparente superiore contenente l'RNA, una opaca e proteica nel mezzo e infine una organica rosa inferiore contenente il DNA. Alla fase acquosa superiore raccolta si aggiunge un pari volume di etanolo al 70% e si miscela il tutto. Il campione viene quindi trasferito in una colonna e centrifugato a 10000 rpm per 20 secondi. Si aggiungono quindi il buffer di lavaggio AW1 e in seguito viene effettuata un'incubazione con la DNAsi per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi il campione viene eluito in 30 µl di acqua RNasi free e la concentrazione viene quantificata al NanoPhotometer NP80 (Implen, Germania).

#### Real Time PCR quantitativa (qPCR)

La reazione di amplificazione del genoma di quattro Herpes virus, Varicella Zoster virus (VZV), Citomegalovirus (HCMV), Epstein Barr virus (EBV), Herpes Simplex virus 1 (HSV-1), è stata svolta utilizzando lo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germania). Il DNA isolato dai tessuti è stato utilizzato a concentrazione massima di 60 ng/µL. Ai 15

$\mu$ L mix di reazione (costituita da master mix, coppie di primer forward e reverse, acqua nucleasi-free, TaqMan probe) si aggiungono poi 5  $\mu$ L di DNA (Tabella 5).

**Tabella 5. Dettagli della modalità di realizzazione della qPCR**

MIX	STOCK	FINALE	VOLUME FINALE ( $\mu$ L)
<b>QuantiNova Probe Master Mix (Qiagen)</b>	2X	1X	10
<b>Primer forward</b>	80 $\mu$ M	400 nM	0,10
<b>Primer reverse</b>	80 $\mu$ M	400 nM	0,10
<b>TaqMan Probe</b>	100 $\mu$ M	200 nM	0,04
<b>H<sub>2</sub>O</b>			4,76
<b>DNA</b>	Max 50 ng/ $\mu$ L		5
<b>Volume Finale</b>			20

Per ciascun saggio vengono inoltre allestiti controlli positivi, costituiti da DNA di ciascun target virale a concentrazione nota (standard molecolari) e controlli negativi costituiti da mix e acqua nucleasi-free. Il ciclo termico utilizzato è indicato in Tabella 6.

**Tabella 6. Specifiche del ciclo termico utilizzato.**

Ciclo	Specifiche del ciclo
Denaturazione	Riscaldamento @ 95 °C, 10min
	Fase 1: Mantenimento @ 95 °C, 10s

	Fase 2: Mantenimento @ 60°C, 45s, acquisizione al Cycling A [verde]
--	---

L'hold stage corrisponde alla fase iniziale di denaturazione del DNA e viene effettuato a 95°C per 10 min. Seguono poi i 40 cicli costituiti da 10 secondi a 95°C e 60°C per 45 secondi per l'annealing dei primer (Tabella 7), l'estensione del filamento complementare e la rilevazione della fluorescenza.

**Tabella 7. Sequenze dei primer forward e reverse e della TaqMan probe per ciascun virus ricercato**

<b>VIRUS</b>	<b>PRIMERS e PROBE</b>	<b>SEQUENZA</b>
	VZV Forward	ACA AAA ACA CCC GAC TCG AAA
	VZV Reverse	TCT ATT GGC ACG CAA CTC AAC T
	VZV Probe	5'- FAM - ACC AGA TCC CGA CGA AGC GTG C – 3' TAMRA
	HCMV Forward	CGC TCA CAT GCA AGA GTT AAT CTT T
	HCMV Reverse	AAC TCG GTA AGT CTG TTG ACA TGT ATG
	HCMV Probe	5'- FAM - CTC TAT CTG ACA TAC ACA AGT AAA TCC ACG TCC CA – 3' TAMRA

<b>EBV</b>	EBV Forward	CCA GGA AGC GGG TCT ATG G
	EBV Reverse	CCT TGG GCC CTG ACC TTT
	EBV Probe	5'- FAM - TGG CTG CGC TGC TGC TAT CTT TAG AGG – 3' TAMRA
	HSV-1 Forward	CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C
	HSV-1 Reverse	GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A
	HSV-1 Probe	5'- FAM - CCG CCG AAC TGA GCA GAC ACC CGC GC – 3' TAMRA

La ricerca di materiale genetico di Influenza virus è stata eseguita presso il laboratorio di riferimento della regione Lombardia per la sorveglianza virologica dell'influenza, Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, coordinato dalla Prof.ssa Elena Pariani, utilizzando il protocollo redatto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization - WHO information for molecular diagnosis of influenza virus - Publication date: July 2017. Available online [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/molecular\\_diagnosis/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/)).

Per l'identificazione del genoma dei virus influenzali di tipo A e B nei campioni è stata utilizzata una multiplex real-time one-step RT-PCR con chimica TaqMan, la quale permette di rilevare in un'unica reazione entrambi i target d'interesse.

I geni target di interesse per l'identificazione dei virus influenzali di tipo A e B sono rispettivamente il gene M e il gene NS. Il saggio di real-time PCR è stato condotto utilizzando i reagenti del kit Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR (New England Biolabs). In Tabella 8 sono descritti i primers utilizzati per la ricerca dei virus influenzali di tipo A e B.

**Tabella 8. Sequenze dei primer forward e reverse e della TaqMan probe per i virus influenzali**

<b>VIRUS</b>	<b>PRIMERS e PROBE</b>	<b>SEQUENZA</b>
	IV-A Forward	5'- GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C -3'
	IV-A Reverse	5'- AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA -3'
	IV-A Probe	FAM- TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-BHQ1
	IV-B Forward	5'- TCC TCA AYT CAC TCT TCG AGC G -3'
	IV-B Reverse	5'- CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG -3'
	IV-B Probe	HEX- CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG-BHQ1

La miscela di reazione è stata preparata seguendo la tabella sottostante (Tabella 9):



**Tabella 9. Reagenti e relativi concentrazioni e volumi per la preparazione della miscela di reazione per la rilevazione dei virus influenzali di tipo A e B mediante saggio real-time one-step RT-PCR.**

<b>Reagenti della miscela di reazione e concentrazioni</b>	<b>Volume per singolo campione (μl)</b>
<i>Luna Universal probe One-Step Reaction Mix (2X)</i>	10
<i>Flu A-Forward (40 μM)</i>	0,4
<i>Flu A-Reverse (40 μM)</i>	0,4
<i>Flu A-Probe (10 μM)</i>	0,4
<i>Flu B-Forward (40 μM)</i>	0,4
<i>Flu B-Reverse (40 μM)</i>	0,4
<i>Flu B-Probe (10 μM)</i>	0,4
<i>Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)</i>	1,0
<i>Nuclease-free water</i>	1,6

In ogni pozzetto della piastra di reazione sono stati inoculati 15 μl di miscela di reazione e 5 μl di RNA precedentemente estratto. Nella seduta analitica, oltre all'RNA dei campioni in studio, vengono inseriti un controllo negativo (costituito da acqua al posto del campione) e un controllo positivo (corrispondente ad un campione precedentemente risultato positivo per il target ricercato) per entrambi i virus influenzali indagati.

La reazione è stata condotta utilizzando lo strumento *StepOnePlus Real-time PCR System (Thermofisher)* secondo il seguente profilo termico (Tabella 10):

**Tabella 10. Profilo termico del saggio multiplex real-time one-step RT-PCR per la rilevazione dei virus influenzali di tipo A e B.**

Fase	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
<i>Retrotrascrizione</i>	55°C	10 min	1
<i>Denaturazione iniziale e attivazione dell'enzima</i>	95°C	1 min	1
<i>Denaturazione</i>	95°C	10 sec	
<i>Estensione/Annealing*</i>	55°C	30 sec	

\*raccolta dati di fluorescenza

Per validare la seduta analitica si devono verificare i seguenti requisiti:

- il controllo positivo deve presentare una curva di amplificazione con valore di Ct corrispondente all'atteso ( $Ct=30\pm 1$ );
- il controllo negativo non deve presentare alcuna curva di amplificazione.

Un campione viene considerato positivo per il virus influenzale di tipo A se presenta una curva di amplificazione con profilo ad S (in scala lineare) e  $Ct < 40$  per il rispettivo gene target (M) con fluorescenza in FAM.

Un campione viene considerato positivo per il virus influenzale di tipo B se presenta una curva di amplificazione con profilo ad S (in scala lineare) e  $Ct < 40$  per il rispettivo gene target (NS) con fluorescenza in HEX.

La ricerca degli anticorpi diretti contro EBV, CMV, HSV, VZV (IgM ed IgG) e Influenza Virus (IgA, IgG) è stata condotta sui campioni di siero dei pazienti, con metodica ELISA e secondo le istruzioni d'uso descritte negli appositi kit di analisi.

### ***3.4. Analisi istologica della placca***

Le colorazioni istologiche ed immunoistochimiche sono state effettuate su sezioni di tessuto core-placca e no-placca fissate in formalina ed incluse in paraffina.

Dai blocchetti di paraffina sono state tagliate sezioni di uno spessore di 6  $\mu\text{m}$  (istologia) e di 4  $\mu\text{m}$  (immunoistochimica) e raccolte su vetrini portaoggetto Superfrost per garantire la completa aderenza delle fettine sui vetrini.

Le sezioni sono state deparaffinate mediante immersione in xilene (due immersioni di 10 minuti ciascuna) e successivamente reidratate attraverso la scala discendente di alcool (100°, 100°, 95°, 80°, 70°) e portate in acqua distillata.

Le sezioni deparaffinate e portate all'acqua distillata vengono immerse in ematossilina di Mayer per 5 minuti e successivamente vengono lavate in acqua corrente per 15 min. Vengono poi immerse in eosina alcolica per 2 min. Si procede infine con la disidratazione delle sezioni attraverso la scala ascendente di alcol (70°, 80°C, 90°C, 100°C, 100°C), due passaggi in xilene (8 minuti) e montaggio in montante sintetico DPX.

### ***3.5. Analisi immunoistochimica***

Le colorazioni immunoistochimiche per lo studio della espressione in situ di CD36 e LOX-1 sono state effettuate su sezioni di tessuto core-placca e no-placca fissate in formalina ed incluse in paraffina.

Dai blocchetti di paraffina sono state tagliate sezioni di uno spessore di 5  $\mu\text{m}$  raccolte su vetrini portaoggetto Superfrost per garantire la completa aderenza delle fettine sui vetrini.

Le sezioni sono state deparaffinate mediante immersione in xilene (due

immersioni di 10 minuti ciascuna) e successivamente reidratate attraverso la scala discendente di alcool (100°, 100°, 95°, 80°, 70°) e portate in acqua distillata.

E' stata utilizzata la metodica immunostochimica indiretta, secondo cui il legame antigene-anticorpo primario viene rilevato con un anticorpo secondario biotinilato a cui si lega l'avidina coniugata ad un enzima catalizzatore (la perossidasi di rafano, HRP). Per localizzare le perossidasi è stato utilizzato il cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) che in presenza dell'enzima produce un precipitato di colore marrone visibile al microscopio ottico.

Poiché la fissazione in formalina determina la formazione di legami crociati tra il fissativo e i gruppi attivi delle proteine, causando il mascheramento di molti siti antigenici, i preparati vengono sottoposti a smascheramento termico in tampone citrato.

Le sezioni sono state incubate in perossido di idrogeno 3% per 10 minuti a temperatura ambiente (RT) per evitare falsi positivi dovuti alla reazione del cromogeno con le perossidasi endogene.

Dopo 3 lavaggi in tampone fosfato pH 7.4 (PBS) di 2 minuti, si procede allo smascheramento dei siti antigenici ottenuto con l'immersione dei vetrini in tampone citrato (pH 6.0) in forno a microonde per due cicli da 5 minuti a 700W, intervallati da un passaggio a RT di 5 minuti. I vetrini vengono poi lasciati raffreddare a temperatura ambiente per circa 20 minuti. Le sezioni vengono incubate con il siero normale di cavallo (NHS) per 20 min a RT e successivamente incubate con l'anticorpo primario: rabbit anti-CD36 [epr6573] (Abcam) diluito 1:500 in camera umida over night a 4°C; rabbit anti LOX-1 (Abcam) diluito 1:700 in camera umida over night a 4°C. Le sezioni vengono riportate a RT per circa 15 minuti, lavate in PBS 3x5 minuti ed incubate per 30 minuti a RT con l'anticorpo secondario biotinilato (Vectastain élite ABC kit). Dopo

lavaggio in PBS 3x5 minuti, si procede con l'incubazione con il complesso avidina-biotina coniugato con l'enzima perossidasi (Vectastain élite ABC kit). In seguito a lavaggio la reazione enzimatica viene sviluppata con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza del cromogeno DAB. I nuclei sono stati controcolorati con ematossilina di Harris. Si procede infine con la disidratazione delle sezioni attraverso la scala ascendente di alcol (70°, 80°C, 90°C, 100°C, 100°C), due passaggi in xilene (8 minuti) e montaggio in montante sintetico DPX.

### **3.6. Analisi statistica**

Il calcolo statistico delle dimensioni del campione è stato eseguito sulla scorta dei risultati pubblicati da Badacz et al. [29], che hanno valutato i livelli di citochine ematiche in pazienti con placca carotidea definita come “vulnerabile” alla valutazione ecografica preoperatoria, confrontati con un gruppo di pazienti con placca carotidea “non vulnerabile”.

In particolare, in questo studio sono stati arruolati prospetticamente 103 pazienti con malattia carotidea sintomatica, suddivisi in 36 con placca vulnerabile e 67 con placca non vulnerabile; sono stati poi valutati i livelli di RANTES, IL-6 e della metalloproteinasi 9, e correlati con la vulnerabilità della placca. Prendendo a riferimento i risultati di IL-6, il valore mediano riportato era di 5.09 pg/mL per i pazienti con placca vulnerabile e 3.76 pg/mL per i pazienti con placca non vulnerabile. Ipotizzando una varianza di 1.5, è stato stimato che una dimensione del campione di 21 pazienti per gruppo (pertanto almeno 42 pazienti in totale) raggiunge l'80% di potenza per avere una differenza tra le medie di IL-6 circolante nei due gruppi di almeno 1.3 con una deviazione standard di 1.5, con un livello di significatività (alfa) al 5% considerando una correzione per il test Mann-Whitney bilaterale non parametrico.

I risultati sono stati analizzati con l'aiuto del software statistico Stata® 16.1 (StataCorp LLC, Texas, USA). La normalità della distribuzione delle variabili continue è stata testata mediante il test di Shapiro-Wilk. Le variabili continue sono riportate con  $\text{media} \pm 2 \times \text{deviazione standard (DS)}$  in caso di distribuzione gaussiana, altrimenti viene riportata la mediana e il range interquartile (IQR). Le variabili categoriche sono riportate come numero e percentuale corrispettiva.

Il T-test di Student a due code, il test di Chi-Quadro, il test One-Way ANOVA e l'analisi di regressione lineare e logistica sono state utilizzate come appropriato per valutare le differenze di risultati tra i due gruppi e valutare l'eventuale associazione tra le variabili. Considerando il livello di significatività alfa precedentemente descritto, valori di P inferiori a 0.5 sono stati considerati statisticamente significativi.

#### 4. RISULTATI

Sono stati arruolati 50 pazienti (età media  $73.7 \pm 8.8$  anni), di cui 17 donne (34%).

Come riportato in Tabella 11, i pazienti erano prevalentemente affetti da ipertensione arteriosa (86%), dislipidemia (68%) ed erano pregressi fumatori (34%).

Tredici di essi (26%) avevano avuto sintomi neurologici legati alla stenosi carotidea (attacchi ischemici transitori) nei 3 mesi precedenti all'intervento.

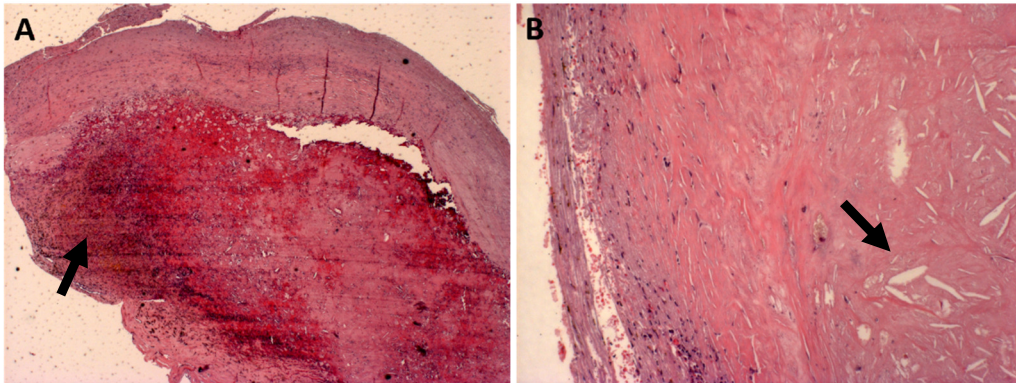
**Tabella 11. Variabili cliniche e demografiche della popolazione**

<b>Variabile clinica, n (%)</b>	<b>N=50</b>
Età (media $\pm$ 2DS)	73.7 $\pm$ 8.8 anni
Sesso femminile	17 (34%)
BMI (media $\pm$ 2DS)	24.2 $\pm$ 1.2
Diabete Mellito	15 (30%)
Insufficienza Renale Cronica	4 (8%)
Ipertensione arteriosa	43 (86%)
Cardiopatía ischemica	13 (26%)
BPCO	7 (14%)
Dislipidemia	34 (68%)
Fumo pregresso	17 (34%)
Sintomaticità della lesione	13 (26%)

*BMI=Body Mass Index; BPCO= broncopneumopatia cronica ostruttiva*

L'analisi istologica ha rivelato la presenza di placche vulnerabili in 31 pazienti (62%), mentre nei restanti 19 casi la placca era caratterizzata dalla presenza di uno spesso cappuccio di fibrocellule muscolari lisce,

scarso infiltrato macrofagitario e abbondanti depositi di calcio e quindi definita come “stabile” (Figura 7 A e B).



*Figura 7. A sinistra preparato istologico di placca vulnerabile (A), a destra preparato istologico di placca stabile (B). Nell'immagine A si noti il core emorragico (freccia nera), in contrapposizione ai depositi di calcio sparsi nello spesso strato di fibrocellule muscolari lisce dell'immagine B (freccia nera). Ingrandimento con microscopio ottico a 2.5x e colorazione con ematossilina-eosina.*

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei due gruppi di pazienti sono riportate in tabella 12, dove si evidenzia una sostanziale similitudine di rappresentazione dei fattori di rischio cardiovascolare per entrambi i gruppi.

**Tabella 12. Confronto delle caratteristiche cliniche e dei fattori di rischio dei pazienti arruolati**

<b>Caratteristiche cliniche</b>	<b>Placca vulnerabile (n=31)</b>	<b>Placca non vulnerabile (n=19)</b>	<b>P</b>
Età (media $\pm$ 2DS)	72.3 $\pm$ 8.9	76.1 $\pm$ 8.3	0.12
Sesso femminile	9 (29.1%)	8 (42.1%)	0.34
Diabete Mellito	9 (29.1%)	6 (31.6%)	0.84



BMI (media $\pm$ 2DS)	24.2 $\pm$ 1.3	24.1 $\pm$ 1.2	0.87
Insufficienza Renale Cronica	3 (9.7%)	1 (5.3%)	0.57
Iperensione arteriosa	25 (80.7%)	18 (94.7%)	0.16
Cardiopatìa ischemica	9 (29.1%)	4 (21.1%)	0.53
BPCO	2 (10.5%)	5 (16.1%)	0.58
Dislipidemia	19 (61.3%)	15 (78.9%)	0.19
Fumo pregresso	9 (29.1%)	8 (42.1%)	0.34
Sintomaticità della lesione	9 (29.1%)	4 (21.1%)	0.53

*BMI=Body Mass Index; BPCO= broncopneumopatia cronica ostruttiva*

Tutti i valori di P non sono statisticamente significativi.

#### ***4.1. Presenza del materiale genetico virale nelle placche carotìdee e correlazione con la sierologia anticorpale***

Il materiale genetico dei virus esaminati è stato cercato in due siti del campione vascolare, e cioè nel “core” della placca e nella porzione di vaso circostante rimosso nella procedura chirurgica, che è stato considerato il controllo interno.

Il genoma virale di CMV, HSV, VZV ed Influenza Virus non è stato trovato in nessun campione vascolare. Al contrario, il genoma virale di EBV è stato trovato in due campioni vascolari, in particolar modo in entrambi i casi è stato individuato nel “core” ma non nell’endotelio di controllo.

Peraltro, le placche contenenti il genoma di EBV erano state definite come “vulnerabili” all’analisi istologica.

La determinazione sierologica delle IgG anti EBV, CMV, HSV e VZV ha rivelato che tutti i pazienti erano stati esposti all’EBV, tutti tranne uno al CMV, il 68% a VZV e una minor percentuale a HSV (Tabella 13). Nessun paziente è stato operato in fase attiva di malattia influenzale, e quasi la metà dei pazienti (22/50, 44%) erano stati sottoposti a vaccinazione anti-

influenzale entro i 6 mesi precedenti l'intervento e risultavano coperti da IgG. Le IgM e IgA erano negative in tutti i casi.

Le esposizioni virali dei pazienti con placca vulnerabile non erano significativamente differenti rispetto ai pazienti con placca non vulnerabile (Tabella 13). Tuttavia, la vaccinazione antinfluenzale è risultata associata ad una minor incidenza di vulnerabilità della placca, dal momento che l'82% dei pazienti non vaccinati (23/28) aveva una placca carotidea vulnerabile, contro il 36% dei pazienti vaccinati (8/22, P=0.001).

**Tabella 13. Esposizione agli agenti virali nel gruppo di pazienti con placca carotidea vulnerabile versus non vulnerabile.**

<b>VIRUS (sieroprevalenza)</b>	<b>Placca vulnerabile (n=31)</b>	<b>Placca non vulnerabile (n=19)</b>	<b>P</b>
HSV (6/50, 12%)	2/31 (6.4%)	4/19 (21.1%)	0.18
EBV (100%)	31/31 (100%)	19/19 (100%)	1
VZV (34/50, 68%)	20/31 (64.5%)	14/19 (73.7%)	0.55
CMV (49/50, 98%)	30/31 (96.7%)	19/19 (100%)	1

*HSV=Herpes Simplex Virus; EBV=Epstein-Barr Virus; VZV=Varicella-Zoster Virus; CMV= CitoMegalovirus*

*I valori di P sono riportati nella colonna più a destra. L'esposizione agli agenti virali è stata valutata attraverso determinazione sierologica delle IgG per HSV, EBV, VZV e CMV*

#### **4.2. Livelli di espressione ematica delle citochine**

Tra le citochine analizzate, è stato osservato che TNF- $\alpha$  tende ad essere significativamente più alto nel sangue di pazienti con placca vulnerabile rispetto ai pazienti con placca non vulnerabile (73.6 $\pm$ 238.2 vs 3.9 $\pm$ 13.1

pg/ml,  $P=0.01$ ), così come pure IL-6 ( $45.9 \pm 103.6$  vs  $10.1 \pm 25.3$  pg/ml,  $P=0.01$ ). Anche IL-1 $\beta$ , IL-8 e CCL5 tendono ad essere più alti nel sangue di pazienti con placca vulnerabile, sebbene i valori di  $P$  non siano significativi ( $P=0.97$ ,  $0.30$  e  $0.64$  rispettivamente, Tabella 14).

I valori di IL-10 ematica invece sono risultati sostanzialmente nulli, al di sotto dei limiti di sensibilità del test, in entrambi i gruppi.

**Tabella 14. Valori medi dei livelli ematici di citochine nel gruppo di pazienti con placca carotidea vulnerabile versus non vulnerabile.**

Citochina	Placca vulnerabile (n=31)	Placca non vulnerabile (n=19)	P
TNF- $\alpha$	$73.6 \pm 238.2$ pg/ml	$3.9 \pm 13.1$ pg/ml	<b>0.01</b>
IL-1 $\beta$	$3.1 \pm 6$ pg/ml	$1.6 \pm 5.1$ pg/ml	0.97
IL-8	$5.9 \pm 12.7$ pg/ml	$1.4 \pm 2.5$ pg/ml	0.30
IL-6	$45.9 \pm 103.6$ pg/ml	$10.1 \pm 25.3$ pg/ml	<b>0.01</b>
CCL5	$13658.9 \pm 6578.3$ pg/ml	$13153.7 \pm 7015.2$ pg/ml	0.64

*I valori di P significativi sono riportati in grassetto.*

I livelli ematici di tutte le citochine non sono risultati essere influenzati dall'età, né dal sesso o dalla presenza dei fattori di rischio cardiovascolare quali il diabete o l'abitudine al fumo di sigaretta.

L'analisi ANOVA non ha mostrato differenze significative nei livelli di citochine ematiche tra il gruppo di pazienti con placca vulnerabile e quello con placca non vulnerabile in base all'esposizione virale e nemmeno in base all'esecuzione o meno della vaccinazione antinfluenzale.

### 4.3. Espressione genica delle citochine nelle placche

Nella placca sono stati analizzati in particolar modo i livelli di espressione genica di TNF- $\alpha$ , IL-10, CCL5, IL-6 e IL1- $\beta$ , tenendo in considerazione i valori medi ottenuti dai risultati forniti dai quattro geni *housekeeping* utilizzati.

È stato pertanto osservato che TNF- $\alpha$  tende ad essere significativamente più espresso nel core, rispetto al controllo sano appaiato, sia nel gruppo di pazienti con placca vulnerabile (Rq  $3.3 \pm 5.4$  vs  $1.4.1 \pm 1.8$ ,  $P=0.02$ , Tabella 15) che nel gruppo di pazienti con placca non vulnerabile (Rq  $3.1 \pm 2.6$  vs  $1.3 \pm 0.9$ ,  $P=0.04$ ). Anche IL-1 $\beta$ , IL-6 e CCL5 sono significativamente più espressi nel core rispetto al controllo, ma soltanto nel gruppo di pazienti con placca vulnerabile, mentre l'espressione di IL-10 non varia significativamente in entrambi i gruppi.

**Tabella 15. Livelli di espressione genica delle citochine (riportate come “quantità relativa”, Rq, valori medi  $\pm$  2DS) con differenza tra “core” versus controllo sano rispettivamente appaiato, sia nel gruppo di pazienti con placca carotidea vulnerabile che non vulnerabile.**

Citochina	Placca vulnerabile			Placca non vulnerabile		
	Core	Controllo	P	Core	Controllo	P
TNF- $\alpha$	$3.3 \pm 5.4$	$1.4 \pm 1.8$	<b>0.02</b>	$3.1 \pm 2.6$	$1.3 \pm 0.9$	<b>0.04</b>
IL-1 $\beta$	$3.7 \pm 2.8$	$1.8 \pm 1.5$	<b>0.004</b>	$3.6 \pm 4$	$1.7 \pm 2.1$	0.12
IL-10	$1.5 \pm 1.6$	$1.3 \pm 1.5$	0.45	$1.7 \pm 2.4$	$1.1 \pm 1.0$	0.46
IL-6	$15.6 \pm 22.6$	$6.1 \pm 10.2$	<b>0.001</b>	$8.2 \pm 10.8$	$11.2 \pm 32.9$	0.73
CCL5	$1.4 \pm 1.1$	$0.7 \pm 0.6$	<b>0.01</b>	$1.2 \pm 1.1$	$0.9 \pm 0.5$	0.31

*I valori di P significativi sono riportati in grassetto.*

L'analisi ANOVA non ha mostrato differenze significative nell'espressione delle citochine a livello delle placche (sia nel “core” che nel “controllo”) tra

il gruppo di pazienti con placca vulnerabile e quello con placca non vulnerabile, ad eccezione di una iniziale significatività per l'espressione di IL-6, maggiore nel core delle placche vulnerabili rispetto al core di quelle non vulnerabili ( $15.6 \pm 22.6$  vs  $8.2 \pm 10.8$ ,  $P=0.05$ , Tabella 16).

Non vi sono state differenze significative nell'espressione di tali citochine in base all'esposizione virale, tuttavia nel gruppo dei pazienti con placca vulnerabile l'espressione di TNF- $\alpha$  e IL-6 nel "core" era maggiore nei pazienti che non erano stati sottoposti alla vaccinazione antinfluenzale rispetto a quelli che l'avevano eseguita, e nel caso di TNF- $\alpha$  in maniera statisticamente significativa, mentre per IL-10 si è osservato il contrario (Tabella 17).

Inoltre, all'analisi di regressione, nessun fattore di comorbidità è risultato influenzare in modo significativo l'espressione delle citochine analizzate.

**Tabella 16. One-Way ANOVA per l'espressione genica delle citochine nel "core" e nel controllo sano nel gruppo di pazienti con placca carotidea vulnerabile *versus* non vulnerabile. I valori di P significativi sono riportati in grassetto.**

Citochina	Core (vulnerabile <i>versus</i> non vulnerabile, P)	Controllo (vulnerabile <i>versus</i> non vulnerabile, P)
TNF- $\alpha$	0.64	0.75
IL-1 $\beta$	0.34	0.54
IL-10	0.22	0.75
IL-6	<b>0.05</b>	0.83
CCL5	0.21	0.18

**Tabella 17. Espressione genica delle citochine nel “core” delle placche carotidee vulnerabili nei pazienti vaccinati *versus* non vaccinati contro il virus influenzale (valori espressi come Rq, media $\pm$ 2DS).**

Citochina	Pazienti vaccinati	Pazienti non vaccinati	P
TNF- $\alpha$	1.8 $\pm$ 1.3	7.4 $\pm$ 1.1	<b>0.02</b>
IL-1 $\beta$	3.3 $\pm$ 2.5	4.9 $\pm$ 3.5	0.19
IL-10	2.8 $\pm$ 2.5	1 $\pm$ 0.9	<b>0.009</b>
IL-6	13.7 $\pm$ 21.9	21.1 $\pm$ 25.3	0.22
CCL5	1.2 $\pm$ 1	1.6 $\pm$ 1.6	0.45

*I valori di P significativi sono riportati in grassetto nell'ultima colonna.*

#### **4.4. Espressione genica di PPAR- $\gamma$ nelle placche**

Nelle placche vulnerabili, è stato osservato che PPAR- $\gamma$  tende ad essere più espresso nel *core* rispetto al controllo, sebbene non in maniera significativa (Rq mediano di 2.7 vs 1.2, P=0.85). Nelle placche non vulnerabili invece non si sono registrate sostanziali differenze tra *core* e controllo (Rq mediano di 1.4 vs 1.3, P=0.34). L'espressione di PPAR- $\gamma$  poi tendeva ad essere maggiore nel *core* dei pazienti che avevano una placca vulnerabile rispetto a quelli che avevano una placca non vulnerabile, sebbene in maniera statisticamente non significativa (P=0.44), e non sono state registrate differenze sostanziali tra i controlli delle placche vulnerabili e quelle vulnerabili.

L'analisi ANOVA ha mostrato inoltre che l'espressione genica di PPAR- $\gamma$  era significativamente maggiore, nei pazienti con placca vulnerabile e prevalentemente nel *core*, nei soggetti che non si erano sottoposti alla vaccinazione antinfluenzale, rispetto a quelli vaccinati (Rq mediano 3.9

versus 2.5,  $P=0.05$ ). Non sono state individuate correlazioni statisticamente significative né con l'esposizione virale dei pazienti, né con i fattori di rischio cardiovascolare.

Infine, nel gruppo di pazienti con placca vulnerabile, l'espressione genica di PPAR- $\gamma$  nel *core* delle placche è risultata correlata all'espressione genica di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, con una relazione di tipo positivo (Tabella 18), pur escludendo un campione che presentava livelli estremamente elevati di PPAR- $\gamma$  (Figura 8). Non si sono osservate correlazioni significative nel gruppo di pazienti con placca non vulnerabile.

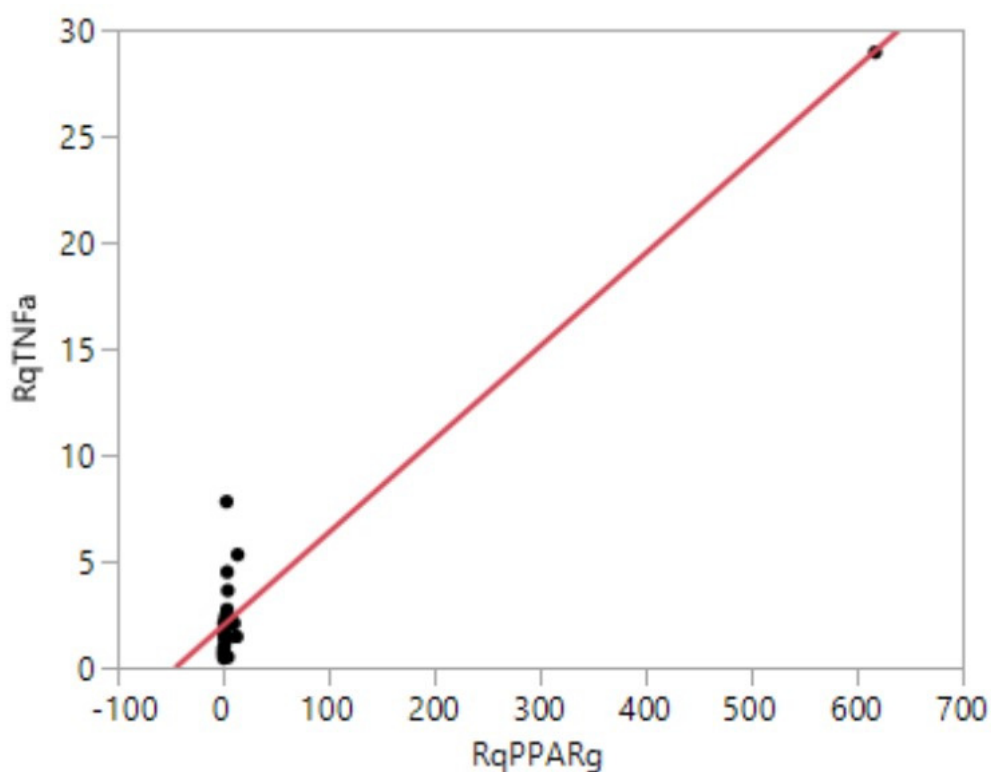


Figura 8. Correlazione tra l'espressione genica di PPAR- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nel core delle placche vulnerabili. Valori espressi come Rq

**Tabella 18. Correlazione tra l'espressione genica di PPAR- $\gamma$  e l'espressione genica delle citochine nel "core" delle placche vulnerabili.**

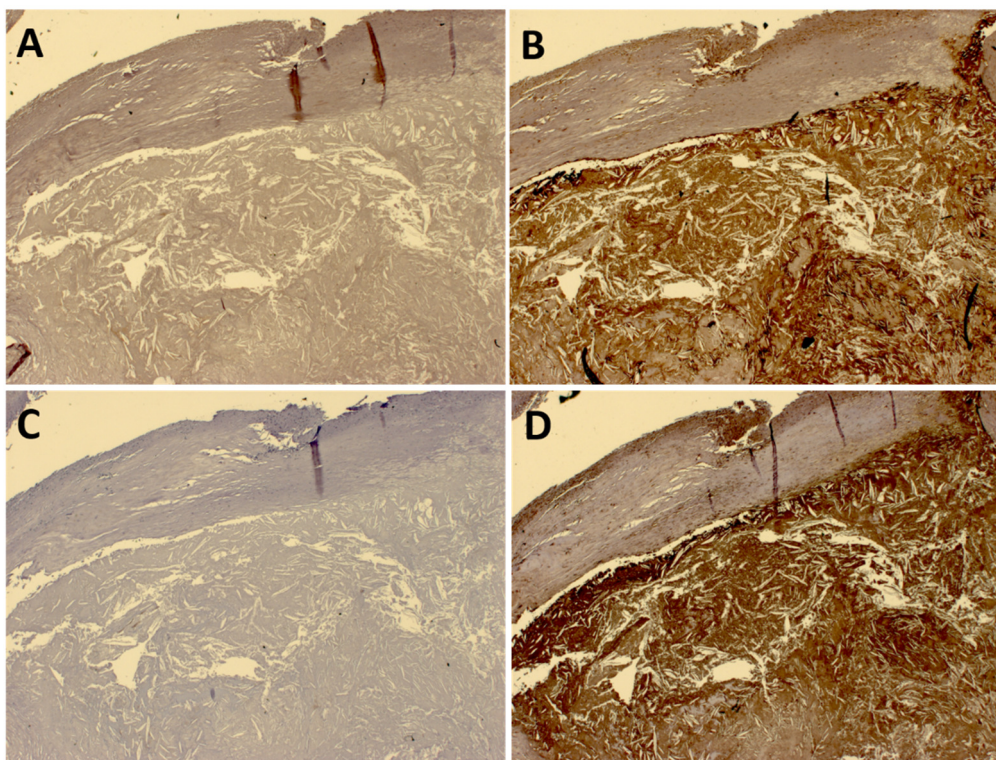
<b>Citochina</b>	<b>Coefficiente di correlazione</b>	<b>Intervallo di Confidenza (95%)</b>	<b>P</b>
TNF- $\alpha$	0.75	0.49;0.88	<b>&lt;0.001</b>
IL-1 $\beta$	0.57	0.41;0.87	<b>0.003</b>
IL-10	0.68	0.38;0.85	<b>0.0003</b>
IL-6	-0.01	-0.42;0.40	0.95
CCL5	-0.14	-0.57;0.28	0.5

*I valori di P significativi sono riportati in grassetto nell'ultima colonna.*

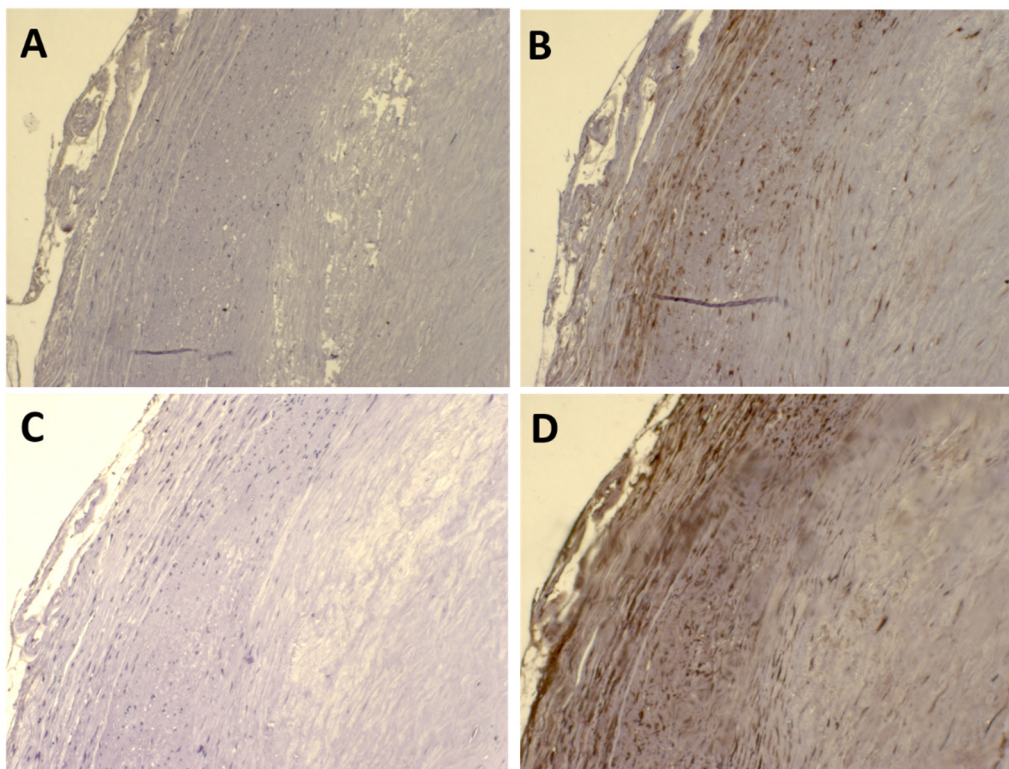
#### **4.5. Espressione di CD36 e di LOX-1 nelle placche**

L'esame immunostochimico ha evidenziato una maggior presenza di CD36 e LOX-1 nel core delle placche vulnerabili (Figura 9) rispetto a quelle definite come non vulnerabili (Figura 10), sebbene non si possano fare valutazioni di tipo quantitativo e dunque statistico.





*Figura 9. Espressione di CD36 (in alto a destra, B) e LOX-1 (in basso a destra, D) nel core delle placche vulnerabili. Da notare la distribuzione diffusa del cromoforo nello spazio subendoteliale. A sinistra i rispettivi controlli negativi (A e C). Ingrandimento a 10x.*

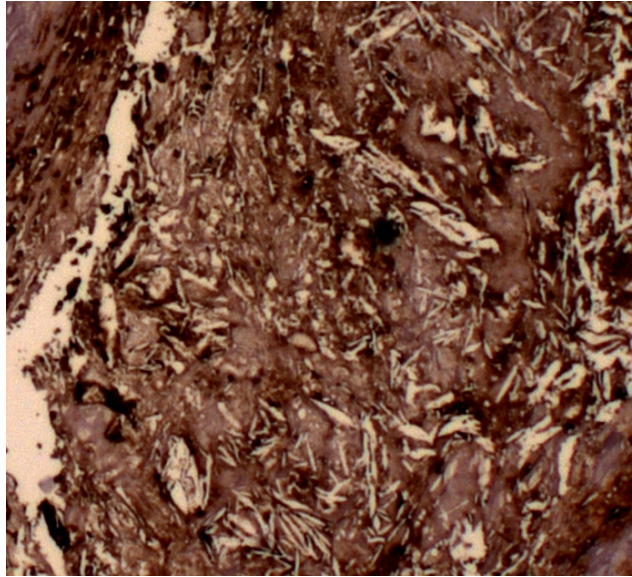


*Figura 10. Espressione di LOX-1 (in alto a destra, B) e LOX-1 (in basso a destra, D) nel core delle placche non vulnerabili. Si noti la scarsa distribuzione della colorazione. A sinistra i rispettivi controlli negativi (A e C). Ingrandimento a 10x.*

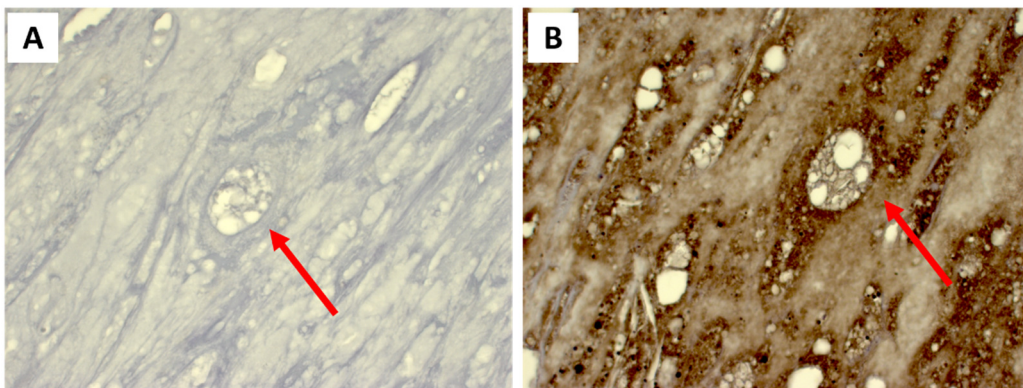
In particolare, da un punto di vista morfologico, il cromoforo dell'anticorpo secondario che amplificava il segnale dell'anti-CD36 si localizzava prevalentemente nei macrofagi-cellule schiumose e sulla sostanza amorfa contenuta nel core delle placche vulnerabili (gli acidi grassi a catena lunga, Figura 11), mentre era minimo a livello endoteliale, delle fibrocellule muscolari lisce, e pressoché assente nel materiale amorfo "spiculato" contenuto invece nelle placche non vulnerabili.

Il cromoforo dell'anticorpo secondario che amplificava il segnale di LOX-1 invece si localizzava in maniera più selettiva sui macrofagi-cellule schiumose (Figura 12), sebbene anche in questo caso in minima parte

fosse presente anche sulle fibrocellule muscolari lisce e a livello endoteliale.



*Figura 11. Localizzazione del cromoforo dell'anti-CD-36 nei macrofagi-cellule schiumose e sulla sostanza amorfa contenuta nel core delle placche vulnerabili. Ingrandimento a 40x.*



*Figura 12. Localizzazione del cromoforo dell'anti-LOX-1 nei macrofagi-cellule schiumose del core delle placche vulnerabili (immagine B a destra, freccia rossa). Nell'immagine a sinistra il relativo controllo negativo. Ingrandimento a 40x.*

## 5. DISCUSSIONE

L'aterosclerosi è la principale causa di morte nel mondo occidentale, ma è anche una causa importante di disabilità dovuta allo sviluppo delle malattie cardiovascolari che possono portare al verificarsi di eventi clinici come infarto miocardico acuto e ictus [1].

In letteratura è stato ben studiato il ruolo di alcuni fattori clinici come maggiormente predisponenti allo sviluppo di placche aterosclerotiche (ad esempio il fumo di sigaretta, l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia, il diabete), ma resta ancora poco chiaro il ruolo di questi stessi fattori nella destabilizzazione acuta delle placche. Infatti, la pratica clinica quotidiana ci mostra come, a parità di fattori di rischio, alcuni soggetti sono portatori di placche più vulnerabili e sviluppano gli eventi acuti, mentre altri no. Questo suggerisce che vi siano ancora dei fattori di rischio attualmente poco indagati. Tra questi, un ruolo sempre maggiore viene assunto dagli agenti infettivi e soprattutto quelli virali [18].

Ci sono infatti sempre maggiori evidenze in letteratura di come, ad esempio, il virus dell'influenza possa innescare un infarto miocardico acuto [26]. Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base dell'innescamento di questi eventi non sono stati chiaramente compresi fino ad ora.

Le ipotesi attualmente in studio si basano sul fatto che alcuni agenti patogeni siano in grado di migrare dal loro abituale tessuto di infezione verso l'endotelio e provocare uno stato infiammatorio con rilascio di citochine e chemochine sia a livello sistemico che locale [18]. È ormai noto che il virus dell'influenza A, così come pure altri virus respiratori e, più recentemente, il virus SARS-CoV-2, dopo aver infettato le cellule respiratorie dell'organismo ospite, ne deregolano la risposta immunitaria innata, con conseguente rilascio eccessivo di citochine e chemochine proinfiammatorie localmente e nel torrente ematico, fenomeno conosciuto

con il nome di "tempesta di citochine" [30, 31]. Questo evento, da un lato finalizzato all'attivazione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata per l'eliminazione del patogeno, ha purtroppo una serie di effetti "collaterali" che possono determinare danni a livello endoteliale anche sistemico e in organi differenti dal bersaglio iniziale [32].

Secondo la nostra ipotesi di base, gli agenti infettivi, potrebbero quindi portare ad uno stato di infiammazione sistemica con conseguente rilascio di citochine infiammatorie nel torrente ematico. Tali citochine provocherebbero, da un lato, un aumento conseguente del reclutamento dei monociti e della loro differenziazione in macrofagi, dall'altro un danno endoteliale a livello di una placca già esistente, con una situazione di incrementato stress ossidativo che porterebbe ad un aumento dell'ossidazione delle LDL. Queste ultime, a loro volta, innescherebbero l'attivazione di LOX-1 e del pathway di segnalazione di CD36, possibilmente mediato da PPAR- $\gamma$ , con conseguente feedback di attivazione dell'espressione dello stesso CD36 e di altri geni chiave per il rimodellamento della placca verso una maggiore vulnerabilità. Tra i geni target attivati da PPAR- $\gamma$  peraltro vi sono anche quelli deputati alla trascrizione delle citochine infiammatorie. A tale meccanismo, potrebbe sommarsi l'azione diretta lesiva dello stesso agente virale sull'endotelio di una placca già presente, nel quale il patogeno potrebbe localizzarsi, sia per "tropismo" innato, sia in conseguenza di una maggior permeabilità nella sede del fenomeno aterosclerotico.

Per semplificare la scelta degli agenti patogeni da analizzare, ci si è orientati su virus il cui tropismo endoteliale era già stato osservato, sebbene il loro ruolo molecolare nella eventuale destabilizzazione della placca aterosclerotica non fosse ancora stato indagato chiaramente [18, 33].

Secondo i nostri risultati, l'unico virus di cui sia stato trovato il genoma all'interno della placca asportata, peraltro segnalata come istologicamente vulnerabile, è stato EBV. Peraltro, appare interessante notare che, nello stesso campione vascolare, il genoma di EBV è stato rilevato in entrambi i casi nel "core" della placca vulnerabile ma non nel rispettivo controllo. Purtroppo, con il nostro metodo non è possibile identificare chiaramente se EBV si trova nell'endotelio oppure in altre popolazioni cellulari presenti nel core della placca. Ad esempio, EBV potrebbe essersi localizzato nei linfociti B, nei quali risiede in maniera latente, e che potrebbero essere stati internalizzati nel "core" delle placche vulnerabili. Peraltro, considerando che in relazione alla sierologia tutti i pazienti sono stati esposti al virus, non è chiaro il motivo per cui EBV abbia avuto un tropismo solo per quei due pazienti e non per altri.

Già Ibrahim e Coll. nel loro studio nel 2005 hanno rilevato la presenza del DNA di EBV in un campione di placca aterosclerotica, sebbene non vi siano né informazioni relative al sito preciso di localizzazione, né dati relativi alla composizione della placca stessa [34]. Inoltre, nel 2006 De Boer e Coll. hanno osservato la presenza del DNA di EBV in 15 su 19 campioni di placca carotidea aterosclerotica; in più, dopo aver generato colture cellulari di linfociti T estratte dalle stesse placche, hanno osservato che in 11 casi esse erano responsive alla stimolazione con gli antigeni di EBV.

Purtroppo, nei nostri risultati l'evidenza del genoma EBV nella placca è solo su due campioni e ciò limita attualmente la possibilità di formulare osservazioni estendibili su ampia scala.

Peraltro, l'elevata sieroprevalenza di EBV nella popolazione generale [35], che è stata verificata anche nel nostro studio, non consente di poter stabilire quale effettivamente sia il ruolo dell'infezione da EBV nella destabilizzazione delle placche aterosclerotiche.

Nei restanti campioni vascolari non è stato ritrovato il genoma di nessuno dei virus esaminati, sebbene in molti pazienti i livelli sierologici degli anticorpi suggeriscano una pregressa esposizione agli stessi agenti virali. Questo risultato potrebbe essere spiegato con due ipotesi: il virus non si localizza nella placca, oppure la sensibilità della metodica di real-time PCR non è così elevata da rilevare la presenza di piccole quantità di genoma virale. In quest'ultimo caso, un aiuto potrebbe arrivare dalla metodica di Digital PCR, in corso di studi futuri.

Tuttavia, l'esposizione ai virus analizzati, non si è dimostrata influenzare significativamente né i livelli ematici delle citochine infiammatorie analizzate, né i livelli di espressione genica nelle placche delle stesse citochine, sia nel gruppo dei pazienti con placca vulnerabile che in quello con placca non vulnerabile.

Analizzando i livelli di citochine ematiche, in particolare, è emerso come nel gruppo dei pazienti con placca vulnerabile i livelli di praticamente tutte le citochine infiammatorie siano più elevati rispetto al gruppo di pazienti con placca non vulnerabile, e precisamente in maniera statisticamente significativa per quanto riguarda TNF- $\alpha$  e IL-6. Queste ultime sono due citochine tipicamente coinvolte nella cascata infiammatoria e nella sopramenzionata "tempesta citochinica", a suggerire il fatto che verosimilmente i pazienti con placca vulnerabile hanno, rispetto a quelli con placca non vulnerabile, uno stato infiammatorio sistemico maggiore, che peraltro non è influenzato dalle comorbidità, e tuttavia, come già detto, nemmeno dall'esposizione a CMV, EBV, HSV e VZV.

Il ruolo di alcune citochine nel processo aterosclerotico è stato già dimostrato: per esempio, TNF- $\alpha$  promuove l'ossidazione delle LDL e la formazione delle cellule schiumose, mentre IL-10 sembra avere un'azione inibitoria sul medesimo processo. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inoltre stimolano l'apoptosi delle cellule muscolari lisce della placca, con conseguente

assottigliamento del cappuccio fibroso, e regolano l'espressione e l'attività delle metalloproteinasi, cruciali nel meccanismo di rottura della placca [36]. Peraltro, è stato già dimostrato come nel sangue dei pazienti colpiti da un evento cardiaco acuto sostenuto da una placca coronarica destabilizzata, i livelli di tali citochine infiammatorie siano più alti rispetto ai pazienti con malattia coronarica stabile [37]. Infine, Shi e Coll. nel 2015 hanno rilevato maggiori quantità di IL-1 $\beta$  nel siero di 30 pazienti sottoposti ad endoarteriectomia carotidea, rispetto a 20 pazienti reclutati come controlli. Tuttavia, nello stesso gruppo di pazienti operati, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative della quantità di IL-1 $\beta$  sierica tra i pazienti che avevano una placca instabile e quelli con placca stabile [38].

Gli stessi autori hanno anche osservato come l'espressione di IL-1 $\beta$  fosse significativamente maggiore nelle placche instabili rispetto a quelle stabili. Parimenti, nel nostro studio abbiamo osservato nel core delle placche una maggiore espressione di tutte le citochine infiammatorie analizzate, rispetto ai controlli, e nel gruppo di pazienti con placca vulnerabile tale differenza era statisticamente significativa. Anche in questo caso, l'espressione delle citochine non era significativamente influenzata dalle comorbidità dei pazienti, e tuttavia nemmeno dalla loro pregressa esposizione agli agenti virali analizzati. In quest'ultimo caso, una limitazione all'analisi potrebbe essere data dalla ridotta numerosità campionaria che si determina nei vari sottogruppi, che potrebbe essere troppo esigua per poter procedere ad una valutazione statistica adeguata. Vale la pena ricordare che il ritrovamento dell'mRNA delle citochine infiammatorie potrebbe non corrispondere effettivamente alla reale presenza delle stesse nella placca, dal momento che meccanismi post-trascrizionali, non indagati nel nostro studio, potrebbero regolare la produzione della proteina.



Tuttavia, l'espressione genica delle citochine infiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  è risultata essere direttamente correlata a quella di PPAR- $\gamma$ , i cui livelli di mRNA osservati tendevano ad essere maggiori nel *core* rispetto ai rispettivi controlli, soprattutto nelle placche vulnerabili, sebbene non in maniera statisticamente significativa. Allo stesso modo però anche l'espressione genica di IL-10, citochina anti-infiammatoria, è risultata direttamente correlata a quella di PPAR- $\gamma$ .

Il ruolo di PPAR- $\gamma$  nell'aterosclerosi e nell'infiammazione vascolare è estremamente controverso. In particolare, studi iniziali hanno evidenziato come le oxLDL internalizzate mediante CD36 attivino la trascrizione di PPAR- $\gamma$ , il quale a sua volta agirebbe sovraregolando l'espressione di CD36 in un ciclo che perpetuerebbe l'internalizzazione delle oxLDL e la formazione delle cellule schiumose [39]. In questo senso, PPAR- $\gamma$  è visto come fattore pro-aterogenico.

Tuttavia, successivi studi *in vitro* hanno dimostrato che gli agonisti di PPAR- $\gamma$  nei monociti umani riducono l'espressione del fattore di trascrizione NF-kB con conseguente riduzione dell'espressione genica e della secrezione di citochine proinfiammatorie associate con il fenotipo M1 dei macrofagi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), e modulano la polarizzazione degli stessi nel fenotipo M2, tipicamente anti-infiammatorio [40]. Inoltre, l'attivazione di CD36 mediata da PPAR- $\gamma$  sembrerebbe promuovere l'efflusso di colesterolo dai macrofagi mediata dai trasportatori ABCA1 e ABCG1, con azione antiaterogena di interferenza con la formazione delle cellule schiumose [41].

I nostri risultati, *in vivo*, sembrerebbero apparentemente avvicinarsi maggiormente all'ipotesi di un ruolo pro-aterogenico di PPAR- $\gamma$ .

Da un lato, non è escluso che *in vivo* ci possano essere una serie di fattori che agiscono modulando differenzialmente il pathway molecolare di CD36-PPAR- $\gamma$  rispetto a quanto accade *in vitro*, oppure attivando vie di

segnalazione molecolare differenti. D'altro canto, vale la pena di sottolineare che i pazienti che avevano una placca vulnerabile sono anche quelli che erano stati sottoposti, sebbene soltanto da poche settimane prima dell'intervento chirurgico, a trattamento farmacologico con dosaggi di statine più elevati rispetto ai pazienti con placca non vulnerabile; tali farmaci potrebbero aver interferito con la via di segnalazione molecolare mediata da PPAR- $\gamma$ , incrementandone l'espressione come già osservato da Sun e Coll. [42].

Meglio definita in letteratura è l'azione pro-infiammatoria e aterogena di CD36. Anche nel nostro studio, abbiamo osservato che CD36 si localizzava prevalentemente nel *core* delle placche vulnerabili, specialmente a livello delle cellule schiumose e degli acidi grassi a lunga catena, confermando il ruolo di CD36 in qualità di "marcatore" della regione di placca maggiormente ricca di lipidi, e quindi maggiormente a rischio infiammatorio e ossidativo.

Vale inoltre la pena di notare che alcuni autori hanno osservato un possibile ruolo di CD36 quale co-recettore per l'infezione del virus dell'epatite C, il quale ne incrementerebbe appunto i livelli di espressione [43] Non ci sono però attuali evidenze che altri virus (tra cui quelli da noi analizzati) leghino specificamente CD36.

Altrettanto chiara è l'azione altamente aterogena di LOX-1, il cui ruolo è cruciale nella formazione delle cellule schiumose e nella perpetuazione della risposta infiammatoria e dello stress ossidativo della placca aterosclerotica. Tra i ligandi di LOX-1 ci sono peraltro anche le stesse citochine infiammatorie TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1. [44]. Inoltre, alcuni studi suggeriscono un possibile ruolo di LOX-1 anche nelle risposte immunitarie alle infezioni. Dieudonné e coll. hanno osservato che LOX-1, nelle cellule dell'epitelio bronchiale, interviene nella risposta immunitaria contro gli RNA a doppia elica generati come prodotti intermedi da alcuni

virus respiratori [45]. Joo e coll., in aggiunta, hanno osservato che nei macachi Rhesus, la stimolazione della subunità di LOX-1 con l'emoagglutinina 1 (HA1) dell'influenza ha suscitato una risposta anticorpale protettiva specifica per HA1 [46].

Alla luce dei nostri risultati, non è allo stato attuale possibile attribuire il ruolo di destabilizzatori della placca agli agenti virali analizzati. Tuttavia, un discorso a parte merita la disamina del ruolo della vaccinazione anti-influenzale, dal momento che è stata evidenziata una significativa differenza nell'incidenza di vulnerabilità di placca tra i pazienti vaccinati e quelli non vaccinati.

Questo dato indiretto ovviamente non implica che il virus dell'influenza possa essere considerato un "destabilizzatore" delle placche aterosclerotiche. Peraltro, un "bias" dell'analisi potrebbe venire dal fatto che da un lato i pazienti vaccinati potrebbero essere coloro che si preoccupano maggiormente della propria salute e pertanto fanno molta più attenzione al controllo dei possibili fattori di rischio. D'altra parte, la vaccinazione anti-influenzale è fortemente raccomandata ai pazienti con grossi fattori di rischio cardiovascolare, e questo potrebbe controbilanciare il ruolo del possibile fattore di confondimento sopradescritto.

Inoltre, nel nostro studio, nel *core* delle placche vulnerabili, l'espressione genica delle citochine infiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-6 è risultata maggiore nei pazienti che non erano stati sottoposti alla vaccinazione anti-influenzale rispetto a coloro che erano stati vaccinati (con significatività statistica per TNF- $\alpha$ ), e viceversa per IL-10, tipica citochina anti-infiammatoria. Parimenti, si è osservata una espressione genica di PPAR- $\gamma$  significativamente maggiore nel *core* delle placche vulnerabili dei pazienti vaccinati, rispetto a coloro che non avevano ricevuto la vaccinazione anti-influenzale.

D'altra parte, Wang e Coll. già nel 2010 avevano dimostrato che il virus dell'influenza A può infettare direttamente le cellule endoteliali, con conseguente attivazione del fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF-k-B) e sovraregolazione di citochine e chemochine pro-infiammatorie [47]. Ulteriori studi si rendono pertanto necessari al fine di superare le limitazioni del presente lavoro e definire meglio il possibile ruolo del virus dell'influenza nella destabilizzazione delle placche aterosclerotiche.

## 6. CONCLUSIONE

I pazienti con placca vulnerabile avevano maggiori livelli di citochine pro-infiammatorie circolanti e maggiore espressione delle stesse, nonché di PPAR- $\gamma$ , a livello locale, ed in particolar modo nel *core* delle placche, rispetto ai pazienti con placca non vulnerabile. Allo stesso modo, CD36 e LOX-1 si localizzavano prevalentemente nel *core* delle placche vulnerabili e in particolar modo CD36 nei macrofagi-cellule schiumose e negli acidi grassi a lunga catena, mentre LOX-1 più selettivamente nei macrofagi-cellule schiumose. Tuttavia, l'esposizione virale agli agenti analizzati non era correlata significativamente a tali risultati. Pertanto, sulla scorta dei dati attualmente ottenuti, non vi è evidenza di una significativa correlazione tra l'infezione da EBV, CMV, HSV o VZV e la destabilizzazione della placca aterosclerotica, sebbene sia stato trovato il genoma di EBV nel "core" di due placche vulnerabili.

Un discorso a parte merita la vaccinazione antinfluenzale. In quest'ultimo caso, infatti, l'ipotesi di un possibile ruolo dell'infezione da Influenza A nella destabilizzazione della placca viene indirettamente supportata dall'evidenza di una maggior incidenza di vulnerabilità di placca osservata nel gruppo dei pazienti non vaccinati rispetto al gruppo di pazienti sottoposti a vaccinazione, oltre al reperto di una significativa maggiore espressione genica di alcune citochine infiammatorie e di PPAR- $\gamma$  nel "core" delle placche vulnerabili dei pazienti non vaccinati.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(9):E139–596.
2. Tian K, Xu Y, Sahebkar A, Xu S. CD36 in Atherosclerosis: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Implications. *Curr Atheroscler Rep*. 2020 Aug 9;22(10):59.
3. Sidawy AP, Perler BA. *Rutherford's Vascular Surgery and Endovascular Therapy*, 9th Edition. Elsevier (April 3, 2018).
4. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115–126.
5. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42.
6. White RA, Hollier LH. *Vascular Surgery: Basic Science and Clinical Correlations*, 2nd Edition. Blackwell Futura, 2005.
7. González-Ramos S, Fernández-García V, Recalde M, Rodríguez C, Martínez-González J, Andrés V, et al. Deletion or Inhibition of NOD1 Favors Plaque Stability and Attenuates Atherothrombosis in Advanced Atherogenesis. *Cells*. 2020;9(9):E2067.
8. Kattoor AJ, Goel A, Mehta JL. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants* 2019;8(7):218.
9. Triantafilou M, Gamper FGJ, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 2006;281:31002-11.

10. Azhar S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2010;6(5):657-91.
11. Maréchal L, Laviolette M, Rodrigue-Way A, Sow B, Brochu M, Caron V, et al. The CD36-PPAR $\gamma$  Pathway in Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci* 2018;19(5):1529.
12. Fatkhullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc).* 2016;81:1358-1370.
13. Depuydt MA, Prange KH, Slenders L, Örd T, Elbersen D, Boltjes A, et al. Microanatomy of the Human Atherosclerotic Plaque by Single-Cell Transcriptomics. *Circ Res.* 2020 Sep 28. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316770.
14. Yang H, Sun Y, Wei J, Xu L, Tang Y, Yang L, et al. The effects of ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) carrying IL-8 monoclonal antibody on the inflammatory responses and stability of atherosclerotic plaques. *Biomed Pharmacother* 2019;118:109161.
15. Kong Q, Ma X, Lyu JX, Wang C, Du XY, Guan YQ. Plasma RANTES level is correlated with cardio-cerebral atherosclerosis burden in patients with ischemic cerebrovascular disease. *Chronic Dis Transl Med.* 2020;6:46-54.
16. Lv YB, Jing J, Li JM, Zhong JP, Fang L, Yang B. Assessment of RANTES Levels as the Indicators of Plaque Vulnerability in Rabbit Models of Atherosclerosis. *Pathol Res Pract.* 2014;210:1031-7.
17. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med.* 2015 Nov; 278(5): 483–493.
18. Hemmat N, Ebadi A, Badalzadeh R, Memar MY, Baghi HB. Viral infection and atherosclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37:2225-2233.

19. Strååt K, de Klark R, Gredmark-Russ S, Eriksson P, Söderberg-Nauclér C. Infection with human cytomegalovirus alters the MMP-9/TIMP-1 balance in human macrophages. *J Virol* 2009;83:830-5.
20. Kaklikkaya I, Kaklikkaya N, Birincioglu I, Buruk K, Turan N. Detection of human herpesvirus 6 DNA but not human herpesvirus 7 or 8 DNA in atherosclerotic and nonatherosclerotic vascular tissues. *Heart Surg Forum*. 2010;13:E345-9.
21. Young LS, Rickinson AB. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4:757–768.
22. Horváth R, Černý J, Benedík JRJ, Hökl J, Jelínková I, Benedík J. The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J Clin Virol* 2000;16:17–24.
23. Nagel MA, Gilden D. Neurological complications of VZV reactivation. *Curr Opin Neurol* 2014; 27:356-60.
24. Breuer J, Pacou M, Gautier A, Brown MM. Herpes zoster as a risk factor for stroke and TIA: a retrospective cohort study in the UK. *Neurology* 2014; 83:e27-e33.
25. Fouladseresht H, Talepoor AG, Farjadian S, Khosropanah S, Doroudchi M. Anti-varicella Zoster Virus IgG and hsCRP Levels Correlate with Progression of Coronary Artery Atherosclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2019;18:543-553.
26. Guan X, Yang W, Sun X, Wang L, Ma B, Li H, et al. Association of influenza virus infection and inflammatory cytokines with acute myocardial infarction. *Inflamm Res*. 2012;61:591-8.
27. Peretz A, Azrad M, Blum A. Influenza virus and atherosclerosis. *QJM* 2019;112:749-755.
28. Ricotta JJ, Aburahma A, Ascher E, Eskandari M, Faries P, Lal BK; Society for Vascular Surgery. Updated Society for Vascular Surgery guidelines for management of extracranial carotid



disease.[Erratum in: J VascSurg 2012;55:894]. J VascSurg 2011;54:e1-31.

29. Badacz R, Podolec J, Przewlocki T, Siedlinski M, Jozefczuk E, Oleksy H, et al. The role of chemokine CCL5/RANTES and metalloproteinase-9 as inflammatory modulators in symptomatic internal carotid artery stenosis. J Physiol Pharmacol. 2019;70:545-555.

30. Oslund KL, Baumgarth N. Influenza-induced innate immunity: regulators of viral replication, respiratory tract pathology & adaptive immunity. Future Virol 2011;6:951-962.

31. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. Front Immunol. 2020;11:1446.

32. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. Am J Emerg Med 2008;26(6):711-5.

33. Li D, Li B, Yang L, Wang J. Human cytomegalovirus infection is correlated with atherosclerotic plaque vulnerability in carotid artery. J Gene Med 2020;22(10):e3236.

34. Ibrahim AI, Obeid MT, Jouma MJ, Moasis GA, Al-Richane WL, Kindermann I, et al. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. J Clin Virol 2005;32(1):29-32.

35. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. Front Oncol. 2018 Jun 13;8:211.

36. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. Cytokine Growth Factor Rev. 2015;26(6):673-85.

37. Heinisch RH, Zanetti CR, Comin F, Fernandes JL, Ramires JA, Serrano CV Jr. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(3):245-50.
38. Shi X, Xie WL, Kong WW, Chen D, Qu P. Expression of the NLRP3 Inflammasome in Carotid Atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015;24(11):2455-66.
39. Nicholson AC, Hajjar DP. CD36, oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2004;41(4-5):139-46.
40. Ohshima K, Mogi M, Horiuchi M. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma in Vascular Inflammation. *Int J Vasc Med.* 2012;2012:508416.
41. Azhar S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2010 Sep;6(5):657-91.
42. Sun B, Rui R, Pan H, Zhang L, Wang X. Effect of Combined Use of Astragaloside IV (AsIV) and Atorvastatin (AV) on Expression of PPAR- $\gamma$  and Inflammation-Associated Cytokines in Atherosclerosis Rats. *Med Sci Monit* 2018;24:6229-6236.
43. Cheng JJ, Li JR, Huang MH, Ma LL, Wu ZY, Jiang CC, et al. CD36 is a co-receptor for hepatitis C virus E1 protein attachment. *Sci Rep.* 2016 Feb 22;6:21808.
44. Kattoor AJ, Goel A, Mehta JL. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(7):218.
45. Dieudonné A, Torres D, Blanchard S, Taront S, Jeannin P, Delneste Y, et al. Scavenger receptors in human airway epithelial cells: role in response to double-stranded RNA. *PLoS One* 2012;7(8):e41952.

46. Joo HM, Li D, Dullaers M, Kim TW, Duluc D, Upchurch K, et al. C-type lectin-like receptor LOX-1 promotes dendritic cell-mediated class-switched B cell responses. *Immunity* 2014;41(4):592-604.
47. Wang S, Le TQ, Kurihara N, Chida J, Cisse Y, Yano M, et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyper permeability in severe influenza. *J Infect Dis* 2010; 202:991–1001.

## **8. LISTA DELLE ABBREVIAZIONI IN ORDINE ALFABETICO**

ANOVA= Analysis of Variance (analisi della varianza)

AP= Activator Protein (Proteina attivatore)

BMI= Body Mass Index (Indice di Massa Corporea)

BPCO= BroncoPneumopatia Cronica Ostruttiva

CD= Cluster di Differenziazione

CE= Comitato Etico

CEA= Carotid Endarterectomy (endoarteriectomia carotidea)

CMV= Citomegalovirus (HCMV=Human CMV)

Ct= Cycle Threshold (ciclo-soglia)

DAB= Diaminobenzidina

DNA= DeoxyriboNucleic Acid (acido desossiribonucleico)

DS= Deviazione Standard

EBV= Epstein-Barr Virus

ECST= European Carotid Surgery Trial

EDTA= N-(2-Hydroxyethyl)ethylenediaminetriacetic acid (Acido etilendiamminotetraacetico)

ELISA= Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima)

FGF= Fibroblast Growth Factor (fattore di crescita dei fibroblasti)

HA= Emoagglutinina

HIV= Human Immunodeficiency Virus (virus dell'immunodeficienza umana)

HRP= Horseradish peroxidase (perossidasi di rafano)

HSV= Herpes Simplex Virus

ICAM= Intercellular Cell Adhesion Molecule (molecola di adesione cellulare intercellulare)

IL= Interleuchina  
Ig= Immunoglobuline  
IQR= InterQuartile Range (Range Interquartile)  
IRCCS= Istituto di Ricovero e Cura a carattere Scientifico  
IV= Influenza Virus  
FAT= Fatty Acid Translocase  
GLUT= Trasportatore di Glucosio  
kDa= kiloDalton  
LDL= Low Density Lipoprotein (lipoproteine a bassa densità)  
LOX= Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (recettore per le LDL ossidate lectino-simile)  
MMP= Matrix MetalloProteinase (metalloproteinasi della matrice)  
N= Neuroaminidasi  
NF-kB= Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NK= Natural Killer  
NLRP3= NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3  
NO= Nitric Oxide (ossido nitrico)  
oxLDL= LDL ossidate  
ONOO<sup>-</sup>= Perossinitrito  
PBS= Phosphate-buffered saline (tampone fosfato salino)  
PCR= Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della DNA polimerasi)  
PDGF= Platelet-Derived Growth Factor (fattore di crescita derivato dalle piastrine)  
PPAR= Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (recettori attivati da proliferatori perossisomiali)  
PPRE= PPAR Response Element (elementi di risposta ai PPAR)

RNA= RiboNucleic Acid (acido ribonucleico; mRNA=RNA messaggero)

ROS= Reactive Oxygen Species (specie reattive dell'ossigeno)

RPL= Ribosomal Proteins (proteine ribosomiali)

Rq= Relative Quantity (quantità relativa)

RT= Room temperature (temperatura ambiente)

RXR= Retinoid X receptor (Recettore X del Retinoide)

SARS-CoV-2= Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2  
(coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave)

STAT= Signal Transducer and Activator of Transcription

TGF= Transforming Growth Factor (fattore di crescita trasformante)

TNF= Tumor Necrosis Factor (fattore di necrosi tumorale)

UBC= Ubiquitina C

VCAM= Vascular Cell Adhesion Molecule (molecola di adesione  
cellulare vascolare)

VZV= Varicella Zoster Virus

## DICHIARAZIONE RESEARCH INTEGRITY

I risultati riportati in questo lavoro sono conformi ai quattro principi fondamentali dell'integrità della ricerca del "Codice Europeo di Condotta per l'Integrità della Ricerca" (ALLEA, Berlino, 2018):

- affidabilità nel garantire la qualità della ricerca, riflessa nella progettazione, nella metodologia, nell'analisi e nell'utilizzo delle risorse;
- onestà nello sviluppo, realizzazione, revisione, comunicazione e comunicazione della ricerca in modo trasparente, equo, completo e imparziale;
- rispetto per i colleghi, per i partecipanti alla ricerca, per la società, per gli ecosistemi, per il patrimonio culturale e per l'ambiente;
- responsabilità per la ricerca dall'idea alla pubblicazione, per la sua gestione e organizzazione, per la formazione, la supervisione e il tutoraggio e per i suoi impatti più ampi.

Questa tesi è stata valutata da un Revisore anonimo e dai seguenti due Revisori indipendenti esterni:

Prof. Luigi Anastasia

Professore Ordinario di Biochimica (BIO/10) presso l'Università Vita-Salute San Raffaele.

Dott.ssa Sonia Villani

PhD, Ricercatrice presso l'Ospedale Policlinico San Martino di Genova.

## **9. PRODOTTI SCIENTIFICI**

I risultati preliminari del progetto sono stati utilizzati per presentare una richiesta di finanziamento al bando "CARIPLO - Ricerca biomedica condotta da giovani ricercatori 2019", tuttavia con risultato negativo.

Purtroppo la pandemia da SARS-CoV-2 ha bloccato la prosecuzione dell'analisi dei dati per un tempo utile alla sottomissione del bando CARIPLO - Ricerca biomedica condotta da giovani ricercatori 2020, tuttavia i risultati prodotti saranno utilizzati per applicare al prossimo bando del 2021.

Inoltre, i risultati del progetto sono stati utilizzati per scrivere un abstract sottomesso come comunicazione orale al Charing Cross 2021 (19-22 aprile 2021, <https://www.cxsymposium.com/>).

È stato infine elaborato un articolo dal titolo "Viral infections and plaque vulnerability in patients submitted to carotid endarterectomy", attualmente in fase di sottomissione presso la rivista Journal of Vascular Surgery (Impact factor attuale: 3.405).



## 10. RINGRAZIAMENTI

*“Dire grazie non è solo una questione di buone maniere. È una questione di buona spiritualità.” (Alfred Painter)*

Un ringraziamento al team di ricerca che ha reso possibile la realizzazione del Progetto VIRAL (in ordine alfabetico):

- Prof.ssa Nicoletta Basilico (Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche)
- Dott.ssa Rosanna Cardani (Responsabile della Biobanca BIOCOR-U.O.C. SMEL1 Patologia Clinica, IRCCS Policlinico San Donato)
- Prof.ssa Serena Delbue (Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche)
- Dott.ssa Maria Dolci (Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche)
- Dott.ssa Cristina Galli (Dipartimento di Scienze Biomediche per la salute)
- Dott. Matteo Giannetta (U.O. Chirurgia Vascolare, IRCCS Policlinico San Donato)
- Prof. Giovanni Nano (Direttore U.O. Chirurgia Vascolare, IRCCS Policlinico San Donato)
- Prof.ssa Elena Pariani (Dipartimento di Scienze Biomediche per la salute)
- Dott.ssa Federica Perego (Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche)
- Dott.ssa Laura Valentina Renna (Biobanca BIOCOR-U.O.C. SMEL1 Patologia Clinica, IRCCS Policlinico San Donato)

- Dott. Alberto Varriale (U.O. Chirurgia Vascolare, IRCCS Policlinico San Donato)