



**UNIVERSITÀ  
DI PARMA**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE**

**CICLO XXX**

---

**Tromboembolismo venoso ed immunotrombosi:  
identificazione di nuovi biomarcatori di malattia**

**Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Riccardo Bonadonna**

**Tutore:  
Chiar.mo Prof. Antonio Mutti**

**Dottorando: Dr. Pietro Rossetti**

**ANNI ACCADEMICI 2014-2017**



# **Indice**

## **1) Tromboembolismo venoso**

### **1.1 Epidemiologia**

1.1.1 Aspetti generali

1.1.2 Dati epidemiologici

### **1.2 Clinica**

1.2.1. Valutazione della probabilità clinica e test del D-dimero

### **1.3 Diagnosi strumentale**

### **1.4 Terapia**

1.4.1. Terapia anticoagulante

1.4.2. Trombolisi

1.4.3. Embolectomia e frammentazione con catetere per via percutanea

1.4.4. Filtro cavali

### **1.5 Aspetti Biologici**

1.5.1. Nuovi aspetti biologici: nuovo modello dell'immunotrombosi

1.5.1.1 Reclutamento e attivazione piastrinica

1.5.1.2. Il percorso della via della coagulazione.

1.5.1.3. Cooperazione tra piastrine e coagulazione nella genesi del trombo venoso

1.5.1.4 Controllo della trombosi da parte di cellule immunitarie innate

1.5.1.5 L'immunotrombosi come difesa da patogeni

1.5.2. Nuove molecole e nuove frontiere di studio coinvolte nella patogenesi del trombo venoso

## **2) Razionale dello Studio**

## **3) Scopi dello Studio**

## **4) Materiali e Metodi**

4.1. Arruolamento dei casi e controlli

4.2. Analisi dei miRNA

4.3. Valutazione immunoenzimatica delle interleuchine

4.4. Analisi immunofenotipica linfocitaria (FACS)

4.5. Analisi ecografica

4.6. Analisi sierologica per CMV

4.7. Analisi statistica

## **5 Risultati**

## **6 Discussione**

## **7 Bibliografia**



# 1) Tromboembolismo venoso

## 1.1) Epidemiologia

### 1.1.1 Aspetti generali

Il tromboembolismo venoso (TEV) rappresenta in Italia dopo la cardiopatia ischemica e l'ictus cerebri la patologia cardiovascolare più frequente e causa importante di mortalità e morbilità: è al terzo posto tra le cause di morte nella popolazione generale ed al primo posto nei pazienti ospedalizzati. L'incidenza di malattia in Italia si attesta a circa 1 caso ogni 1000 soggetti/anno nella popolazione generale, varia con l'età con valori minimi durante l'infanzia e l'adolescenza (0,005%) ed aumenta esponenzialmente fino a 5-25/1000 nei pazienti tra i 70-80 anni.

### 1.1.2 Dati epidemiologici

Rispetto agli individui di razza bianca, l'incidenza è maggiore nella popolazione di razza nera ed inferiore nei popoli asiatici, disparità per la quale la causa non è ancora stata chiarita. Il rischio non è differente per sesso, anche se sembra essere due volte più elevato negli uomini rispetto alle donne quando si escludano tra le femmine gli eventi di tromboembolismo venoso correlati alla gravidanza e alla terapia estrogenica.

Il tromboembolismo venoso (TEV) può tradursi in una malattia cronica nei soggetti che sviluppano sindrome posttrombotica (PTS) o ipertensione polmonare e circa il 30% di tutti i pazienti con un episodio di TEV hanno una recidiva entro 10 anni. Le sequele croniche correlate al TEV determinano una grave disabilità: la sindrome post-trombotica si sviluppa nel 20-50% dei pazienti con trombosi venosa profonda, e l'ipertensione polmonare cronica post-tromboembolica complica l'1-4% delle embolie polmonari.

Sebbene la nostra conoscenza dei fattori di rischio sia aumentata negli ultimi decenni, dal 30% al 40% degli episodi di tromboembolia venosa non hanno un fattore favorente identificabile e sono pertanto classificati come non provocati o *idiopatici (unprovoked)*. I restanti episodi sono causati (*provoked*) da fattori transitori o persistenti che aumentano il rischio di tromboembolia venosa inducendo ipercoagulabilità, stasi o danni alla parete [1]. Forti fattori di rischio per il tromboembolismo venoso sono: la chirurgia, l'immobilizzazione e il cancro. Il rischio è particolarmente elevato per i pazienti sottoposti a chirurgia ortopedica con tassi post-operatori di circa l'1% nonostante la profilassi anti trombotica farmacologica ben condotta.

Circa il 20% di tutti gli eventi di TEV sono correlati al cancro, mentre l'intervento chirurgico e l'immobilizzazione rappresentano entrambi il 15% dei casi. I fattori di rischio ereditari più frequenti oltre al gruppo sanguigno (emogruppo non-0) sono la mutazione del fattore V Leiden e le mutazioni del gene della protrombina con una prevalenza nella popolazione europea del 3-7% e dell'1-2% rispettivamente. Circa il 70% dei pazienti con embolia polmonare sintomatica presenta una trombosi venosa profonda concomitante, che risulta sintomatica fino a un quarto dei casi. Al contrario, l'embolia polmonare silente è presente in almeno un terzo dei pazienti con trombosi venosa sintomatica. Il 60% degli eventi di TEV si registra nella fascia di età > 70 anni [2].

Il rischio di morte correlato all'episodio acuto iniziale o alla recidiva di embolia polmonare (EP) è più elevato nei pazienti affetti da EP rispetto a quelli affetti da trombosi venosa profonda (TVP) [3].

La mortalità nella fase acuta dell'EP è del 7-11% e gli eventi recidivanti hanno una probabilità tre volte superiore di essere costituiti da EP dopo un episodio iniziale di EP che non dopo un episodio iniziale di TVP (circa il 60% dopo EP vs il 20% dopo TVP).

## **1.2) Clinica**

Le manifestazioni cliniche della TVP degli arti inferiori comprendono edema, arrossamento, dolore, cianosi, pallore cutaneo (in caso di phlegmasia cerulea dolens). I segni e i sintomi dell'embolia polmonare comprendono improvvisa insorgenza di dispnea o deterioramento della dispnea esistente, dolore toracico, sincope o vertigini a causa di ipotensione o shock, emottisi, tachicardia o tachipnea.

### **1.2.1 Valutazione della probabilità clinica e test del D-dimero**

In considerazione della sintomatologia clinica e dei fattori di rischio associati sono stati validati score di rischio per il TEV, basati su punteggi di probabilità clinica; sono utilizzati per stratificare i pazienti e guidare la selezione e l'interpretazione di ulteriori test diagnostici.

Lo score di Wells è composto da dieci score ed è il punteggio più usato nella pratica clinica per i pazienti con sospetta trombosi venosa profonda (Tab.1).

SCORE DI WELLS per il sospetto clinico di TVP (JAMA 1998; 279: 1094-9)	
Parametro clinico	Punteggio
Cancro in atto (terapia in corso o negli ultimi 6 mesi o palliativo)	1
Recente allettamento per più di 3 giorni o chirurgia maggiore nelle ultime 4 settimane	1
Paralisi, paresi o recente immobilizzazione di un arto inferiore	1
Tensione dolorosa lungo la distribuzione del sistema venoso profondo	1
Gonfiore a tutta la gamba	1
Edema del polpaccio > 3 cm in confronto alla gamba asintomatica (misurato 10 cm sotto la tuberosità tibiale); in pazienti con sintomi bilaterali usare la gamba peggiore	1
Edema con fovea (maggiore nella gamba sintomatica)	1
Vene superficiali collaterali ( non varicose)	1
Diagnosi alternativa più verosimile o più probabile	-2
<b>Interpretazione</b>	
Punteggio totale $\geq 3$ :	alta probabilità di TVP
Punteggio totale tra 1 e 2:	probabilità intermedia di TVP
Punteggio totale $\leq 0$ :	bassa probabilità di TVP

Tab.1: Score di Wells per il sospetto di TVP

Per l'embolia polmonare sospetta sono altrettanto validati nel guidare l'iter diagnostico lo score di Wells per la TEP e il Geneva score che incorporano fattori di rischio per il tromboembolismo venoso e segni e sintomi di embolia polmonare (Tab.2).

Questi punteggi sono stati modificati nel corso degli anni per semplificarne il calcolo, mantenendo comunque una buona performance.

Geneva score modificato <sup>64</sup>		Score di Wells <sup>65</sup>	
Variabile	Punteggio	Variabile	Punteggio
<b>Fattori predisponenti</b>		<b>Fattori predisponenti</b>	
Età >65 anni	+1	Pregressa TVP o EP	+1.5
Pregressa TVP o EP	+3	Recente chirurgia o immobilizzazione	+1.5
Chirurgia o frattura nell'ultimo mese	+2	Cancro	+1
Cancro attivo	+2	<b>Sintomi</b>	
<b>Sintomi</b>		<b>Sintomi</b>	
Dolore monolaterale alla gamba	+3	Emottisi	+1
Emottisi	+2	<b>Segni clinici</b>	
<b>Segni clinici</b>		<b>Segni clinici</b>	
Frequenza cardiaca		Frequenza cardiaca	
75-94 b/min	+3	>100 b/min	+1.5
$\geq 95$ b/min	+5	<b>Segni clinici di TVP</b>	
Dolore alla palpazione di una vena profonda ed edema monolaterale alla gamba	+4	<b>Segni clinici di TVP</b>	
		<b>Segni clinici di TVP</b>	
		Giudizio clinico	
		Diagnosi alternativa all'EP improbabile	
		+3	
<b>Probabilità clinica</b>		<b>Probabilità clinica (3 livelli)</b>	
Bassa	0-3	Bassa	0-1
Intermedia	4-10	Intermedia	2-6
Alta	$\geq 11$	Alta	$\geq 7$
		<b>Probabilità clinica (2 livelli)</b>	
		EP improbabile	
		0-4	
		EP probabile	
		>4	

Tab.2: Score di Wells per il sospetto di EP e Geneva Score

EP = embolia polmonare; TVP = trombosi venosa profonda.

Dal momento che tali score clinici non possono escludere in modo sicuro la diagnosi di trombosi venosa profonda o di embolia polmonare, vengono comunemente utilizzati in combinazione con il test d-dimero. Nei pazienti in cui risulti improbabile una diagnosi di tromboembolismo venoso basata sugli score clinici, la diagnosi di esclusione viene sostenuta dall'esecuzione del dosaggio del d-dimero, il cui valore se nei limiti di normalità permette di escluderne l'eventuale sospetto clinico. Con tale approccio, l'imaging e il trattamento possono essere evitati in circa un terzo dei pazienti con sospetta trombosi venosa profonda o embolia polmonare, di cui meno dell'1% sarà

successivamente diagnosticato con tromboembolia venosa nei 3 mesi successivi. Tale tasso è considerato dagli esperti come accettabile [4].

Gli score clinici e il test del d-dimero variano per i sottogruppi ad alto rischio. Ad esempio, il d-dimero presenta una specificità inferiore nei pazienti con cancro e nei pazienti ricoverati.

Pertanto, in questi sottogruppi, si preferisce procedere direttamente alle indagini strumentali per escludere eventi di TEV.

Importante è anche la stratificazione di rischio di mortalità in caso di EP che si avvale del PESI score che stratifica il rischio di mortalità a 30 giorni dell'evento per qualsiasi causa dall'evento acuto (Tab.3).

Variabile	Punteggio
Età	1/anno
Sesso maschile	10
Cancro	30
Scopenso cardiaco	10
Patologia polmonare cronica	10
Frequenza cardiaca >110/min	20
Pressione arteriosa sistolica <100 mmHg	30
Frequenza respiratoria ≥30/min	20
Temperatura corporea <36°C	20
Disorientamento, apatia, stupore, coma	60
Saturazione di ossigeno <90%	20

Tab.3: Predittori clinici di mortalità per tutte le cause a 30 giorni nei pazienti con embolia polmonare acuta

Categorie di rischio (mortalità per tutte le cause a 30 giorni): classe I, punteggio <65 (0%); classe II, punteggio 66-85 (1%); classe III, punteggio 86-105 (3.1%); classe IV, punteggio 106-125 (10.4%); classe V, punteggio >125 (24.4%). Basso rischio = classi I e II (0-1%).  
Dati tratti da Aujesky et al.<sup>214</sup>.

### 1.3) Diagnosi strumentale

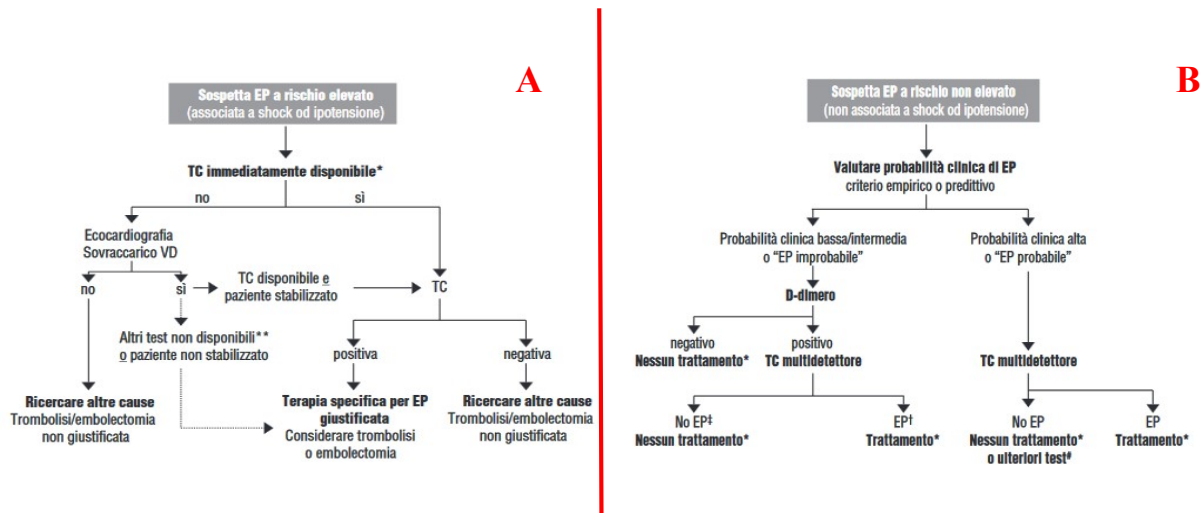
I pazienti che hanno probabilità di avere una trombosi venosa profonda secondo lo score di Wells e quelli considerati con score improbabile ma con un d-dimero positivo vengono candidati all'imaging diagnostico. L'ecocolordoppler venoso ha sostituito la venografia di contrasto come diagnostica di elezione per la diagnosi di TVP. L'ultrasonografia di compressione avviene seguendo due approcci principali: *l'ultrasuono di compressione a gamba intera* che valuta l'intero sistema delle vene profonde dall'inguine alla caviglia, e *CUS (compression ultrasonography) a due punti* che valuta solo i segmenti della vena poplitea e femorale. Nei pazienti con una normale CUS a due punti, l'esame dovrebbe essere ripetuto dopo una settimana per accertare che la trombosi venosa profonda distale (cioè, sotto il ginocchio) non sia propagata prossimalmente, mentre l'ecocolordoppler con studio completo di compressione lungo l'intero asse prossimale e distale in singola seduta è considerato equivalente in termini di sicurezza. I



grandi trial clinici mostrano per entrambi gli approcci un numero di falsi negativi al di sotto dell'1% [1].

I pazienti che vengono considerati come probabili per embolia polmonare secondo lo score di Wells o con un'elevata probabilità clinica secondo Geneva score, nonché quelli con un D-dimero positivo, sono eleggibili per l'imaging (Fig.1A). Nella maggior parte dei centri l'angio-TAC ha sostituito la scintigrafia polmonare e l'angiografia polmonare di perfusione come primo test di imaging per l'embolia polmonare. In casi selezionati la scintigrafia ventilo-perfusiva rimane preferibile: insufficienza renale, allergia al mezzo di contrasto iodato, gravidanza.

Fig.1: A) percorso diagnostico nell'EP a rischio elevato, B) percorso diagnostico nell'EP a rischio non elevato



La scintigrafia ventilo-perfusiva presenta superiorità diagnostica rispetto all'angio-TC polmonare nel monitoraggio della TEP a 6 mesi in quanto sembrerebbe meglio correlarsi con l'ipertensione polmonare secondaria all'evento di TEV. I risultati della scintigrafia polmonare vengono spesso classificati in quattro categorie sulla base dei criteri stabiliti dallo studio nordamericano PLOPED: esito normale o quasi normale, probabilità di EP bassa, intermedia o elevata [5].

## 1.4) Terapia

La terapia del TEV si fonda principalmente sul trattamento anticoagulante, avvalendosi in casi specifici di altri atteggiamenti terapeutici quali trombolisi, trombectomia meccanica e posizionamento di filtro cavale

### 1.4.1 Terapia anticoagulante

La terapia anticoagulante è la base per il trattamento del tromboembolismo venoso e viene divisa in tre fasi: una *fase acuta* nei primi 5-10 giorni dopo la diagnosi, una *fase di mantenimento* di 3-6 mesi e una *fase estensiva* oltre questo periodo. Durante la fase acuta, le opzioni di trattamento includono l'eparina sottocutanea a basso peso molecolare o fondaparinux, l'eparina non frazionata endovenosa, o gli inibitori diretti del fattore Xa (rivaroxaban e apixaban) assunti per via orale. L'eparina non frazionata necessita di aggiustamenti della dose in base ai risultati del tempo parziale della tromboplastina attivata (aPTT), mentre le eparine a basso peso molecolare, regolate in base al peso corporeo, possono essere somministrate in dosi fisse senza monitoraggio (eccetto rari casi). L'eparina non frazionata è preferita in pazienti con insufficienza renale grave (clearance della creatinina inferiore a 30 mL/minuto) e nelle condizioni di rischio emodinamico. Nei pazienti con sospetta o confermata trombocitopenia indotta da eparina, l'eparina deve essere interrotta immediatamente e l'anticoagulazione è proseguita con anticoagulanti parenterali quali fondaparinux, argatroban, danaparoid, bivalirudina.

Dopo almeno 5 giorni di sovrapposizione con gli antagonisti della vitamina K (terapia anticoagulante orale), le eparine o fondaparinux possono essere sospese una volta che il rapporto normalizzato internazionale (INR) è stato ripetutamente superiore a 2.0. Gli antagonisti della vitamina K hanno un indice terapeutico stretto a causa di molteplici interazioni farmacologiche e farmaco-cibo correlate, che comportano sostanziale variabilità interpaziente e intrapaziente. Nel monitoraggio routinario della terapia anticoagulante orale (TAO) è necessario mantenere l'INR tra 2.0 e 3.0. Negli ultimi dieci anni, per il trattamento del tromboembolismo venoso sono stati introdotti anticoagulanti orali diretti (nuovi anticoagulanti-NAO), comprendenti l'inibitore della trombina (dabigatran etexilato) e gli inibitori del fattore Xa (rivaroxaban, apixaban e edoxaban). L'unica molecola che attualmente presenta un antidoto diretto e selettivo in grado di eliminare l'effetto anticoagulante con "reverse" completo in pochi minuti è il dabigatran con l'anticorpo monoclonale "idarucizumab".

Le attuali linee guida considerano i NAO come prima scelta farmacologica in prima linea di trattamento.

Tuttavia l'EBPM o il Fondaparinux sono da preferirsi, in attesa che studi specifici confermino l'efficacia dei NAO, nella gestione del TEV in casi specifici (neoplasia attiva, TVS o sedi atipiche, recente chirurgia, TEV in gravidanza, minor età, presenza di filtro cavale, Lupus anticoagulante, concomitante duplice terapia antiaggregante, piastrinopenia, farmaci interferenti).

E' tuttora da scegliere la gestione con eparina non frazionata e successiva embricazione in TAO nei casi di insufficienza renale grave con Clearance della creatinina <30 ml/min visto il metabolismo renale di EBPM, fondaparinux e NAO.

### 1.4.2 Trombolisi

I pazienti con embolia polmonare associata a instabilità emodinamica hanno un elevato rischio di mortalità precoce. È necessario un trattamento immediato con agenti trombolitici endovenosi per ripristinare rapidamente la perfusione polmonare (streptochinasi, urochinasi, rtPA).

Controindicazioni alla trombolisi sono riportate nella seguente tabella (Tab.4)

---

#### Controindicazioni assolute<sup>a</sup>

- Ictus emorragico o di origine sconosciuta
- Ictus ischemico nei 6 mesi precedenti
- Tumore o danno al sistema nervoso centrale
- Recente trauma maggiore/intervento chirurgico/danno cerebrale (nelle precedenti 3 settimane)
- Emorragia gastrointestinale nell'ultimo mese
- Emorragia nota

#### Controindicazioni relative

- Attacco ischemico transitorio nei 6 mesi precedenti
- Terapia anticoagulante orale
- Gravidanza o entro 1 mese postpartum
- Puntura di vasi non comprimibili
- Rianimazione cardiopolmonare traumatica
- Ipertensione refrattaria (pressione arteriosa sistolica > 180 mmHg)
- Epatopatia avanzata
- Endocardite infettiva
- Ulcera peptica attiva

---

<sup>a</sup>Le controindicazioni alla trombolisi ritenute assolute, ad esempio in caso di infarto miocardico acuto, possono essere considerate relative in un paziente con EP minacciosa a rischio elevato.

Tratta da Van de Werf et al.<sup>263</sup>.

Tab.4: controindicazioni alla trombolisi farmacologica

### 1.4.3 Embolectomia e frammentazione con catetere per via percutanea

In alcuni pazienti critici con EP a rischio elevato, le tecniche percutanee impiegate per riaprire il tronco polmonare parzialmente occluso o le arterie polmonari principali possono essere un'opzione salvavita. Per quanto le evidenze disponibili derivino solo da casi clinici o piccole

casistiche, queste procedure possono essere eseguite in alternativa alla trombolisi quando questa sia assolutamente controindicata o come terapia aggiuntiva nel caso la trombolisi non abbia portato ad un miglioramento delle condizioni emodinamiche o ancora in alternativa all'intervento chirurgico quando non sia possibile istituire nell'immediato un bypass cardiopolmonare.

#### 1.4.4 Filtro cavale

Il posizionamento di filtro cavale è indicato nei pazienti che presentano assolute controindicazioni all'anticoagulazione e/o sanguinamento attivo e nei pazienti che presentano recidiva di embolia polmonare in trattamento anticoagulante ben condotto in presenza di TVP.

I filtri cavali rimovibili dovrebbero essere preferiti rispetto ai permanenti perché possono essere rimossi dopo un breve periodo di tempo dopo che l'anticoagulazione viene nuovamente riavviata in modo sicuro per diminuire il rischio a lungo termine di trombosi venose profonde e complicanze tardive quali la dislocazione o rottura del filtro.

### 1.5) Aspetti Biologici

L'eziopatogenesi della trombosi venosa trova le sue basi su quella che comunemente è nota essere la triade di Virchow (Fig. 2) che descrive le tre grandi categorie di fattori di rischio:

- IPERCOAGULABILITA'
- Variazioni emodinamiche del circolo venoso (stasi, turbolenza)-STASI VENOSA.
- Lesioni/disfunzioni dell'endotelio vascolare –DANNO ENDOTELIALE

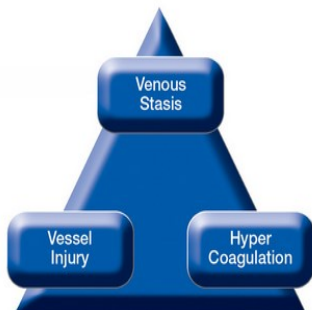


Fig.2: triade di Virchow

Il flusso di sangue rallentato e la stasi, soprattutto nelle valvole venose, possono provocare ipossia e stress ossidativo. Un endotelio intatto esprime diversi anticoagulanti, come la trombomodulina, l'inibitore del fattore tissutale e il recettore della proteina C endoteliale [6]. Al contrario, l'endotelio venoso, attivato dallo stress ossidativo, esprime recettori di adesione con reclutamento di leucociti e piastrine. L'esposizione del fattore tissutale inizia il *percorso estrinseco* della via coagulativa mentre i prodotti liberati da granulociti danneggiati attivano il fattore XII e iniziano il *percorso intrinseco* della coagulazione. Pertanto, l'attivazione del sistema della coagulazione è il passo principale nella trombosi venosa, mentre il ruolo dell'attivazione endoteliale, così come il ruolo delle piastrine, ancora ha bisogno di essere meglio chiarito. L'evidenza suggerisce che le piastrine hanno un ruolo anche nel TEV, anche se meno importante di quello svolto nella trombosi arteriosa. Tuttavia, il coinvolgimento delle piastrine nella formazione di trombi venosi appare in una fase successiva, poiché il nucleo iniziale è libero da piastrine; durante i livelli successivi dell'evoluzione del trombo importante è anche la loro presenza. Infatti, le piastrine attivate possono catalizzare sia tramite la via estrinseca che intrinseca la generazione di trombina.

L'infiammazione è nota svolgere un ruolo nel TEV associato a fattori di rischio classici, come il cancro o il trauma. Durante l'infiammazione, il rilascio degli attivatori del plasminogeno è aumentato con la successiva generazione di plasmina. Tuttavia, uno studio effettuato in volontari sani ha dimostrato che il Tumor Necrosis Factor (TNF), dopo una rapida attivazione della rimozione della fibrina, induce una rapida inibizione della fibrinolisi mediata da un aumento ritardato dell'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno [7]. L'inibizione della fibrinolisi potrebbe essere particolarmente evidente in situazioni caratterizzate da un eccessivo rilascio di TNF, come la setticemia in cui è stata riportata una tendenza alla trombosi microvascolare. Questi risultati suggeriscono che l'infiammazione potrebbe spostare l'equilibrio emostatico verso uno stato protrombotico.

Nell'ultimo decennio è stato sviluppato un modello di “coagulazione cellulare” in cui la cascata coagulativa viene attivata sulla superficie cellulare in quattro fasi: *iniziazione*, *amplificazione*, *propagazione e fase terminale* (Tab.5). L'evento principale per l'inizio di questa cascata è l'interazione tra il fattore VII attivato (FVIIa) e il fattore tissutale esposto, convertendo al termine del processo il fattore II (FII, noto anche come protrombina) in trombina (FIIa) e il fibrinogeno in fibrina.

Sebbene ancora in fase di studio si è visto che l'invecchiamento è associato ad alterazioni nei livelli dei fattori di coagulazione e delle proteine fibrinolitiche. Ad esempio, i livelli plasmatici del fibrinogeno aumentano con l'età, con un incremento progressivo di 10 mg/dL per dieci anni in soggetti sani e in alcuni studi ciò è stato correlato con il rischio di TEV negli adulti più anziani. Il fattore di von Willebrand e i livelli di FVIII aumentano con l'invecchiamento e possono essere associati a rischio di trombosi. I componenti del percorso fibrinolitico, come l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1, aumentano anche con l'invecchiamento, contribuendo al rischio trombotico [8].

Tab. 5: modello della coagulazione cellulare

<i><b>FASE</b></i>	<i><b>Descrizione dell'evento maggiore durante la fase coagulativa</b></i>	<i><b>Sede degli eventi critici durante la fase di coagulazione</b></i>
<b>1) Iniziazione</b>	Il fattore VIIa e i complessi del fattore tissutale attivano i fattori di coagulazione V, X e IX, portando alla conversione della protrombina alla trombina.	Cellule che esprimono il fattore tissutale (monociti, cellule endoteliali e piastrine).
<b>2) Amplificazione</b>	piccole quantità di trombina generata durante la fase di iniziazione attivano le piastrine e i fattori di fattore VIII e von Willebrand.	Superficie delle piastrine attivate circolanti o aderenti
<b>3) Propagazione</b>	Le piastrine generano trombina, che promuove la formazione di complessi fibrinici stabili.	Superficie delle piastrine attivate circolanti o aderenti
<b>4) Fase terminale</b>	Gli anticoagulanti naturali, quali l'inibitore del fattore tissutale, la proteina C, la proteina S e antitrombina III limitano la progressione della formazione di coaguli.	sito dell'endotelio danneggiato

### **Fattori di rischio**

I fattori comunemente noti aumentare il rischio di TEV sono di carattere acquisito e/o genetico con meccanismi differenti che agiscono sul danno vascolare, sull'immunità innata e/o acquisita, sull'ipercoagulabilità modificando o i fattori procoagulanti o anticoagulanti, sulla stasi vascolare, sulla funzionalità piastrinica ( Tab.6).

Tab.6: fattori di rischio del TEV

<b><i>Fattore di rischio</i></b>	<b><i>Meccanismo</i></b>
Trauma	stasi, immunità innata , microparticelle (MPs)
Chirurgia	stasi, danno vascolare, MPs, immunità innata
Cateteri venosi	danno vascolare
Allettamento, lunghi viaggi	stasi
Neoplasie, chemioterapia	MPs, piastrine, immunità innata
Gravidanza, Obesità	stasi, concentrazione dei fattori coagulativi
Puerperio	danno vascolare concentrazione dei fattori coagulativi
Contraccezione orale con estroprogestinici	concentrazione dei fattori coagulativi
Infezioni	immunità innata
Malattie infiammatorie croniche	immunità innata ed acquisita
Fumo	immunità innata, concentrazione dei fattori coagulativi
Lupus anticoagulante	immunità innata e acquisita, piastrine
Fattori genetici	
- 3 fattori: deficit di proteina C, proteina S, antitrombina III	riduzione dei fattori anticoagulanti
- 3 fattori: fattore V Leiden, protrombina FII, emogruppo non O	aumento dell'attività procoagulante

Due paradossi nella trombosi venosa sono quelli noti come il "paradigma del fattore V Leiden":

- l'osservazione che l'incidenza della prima trombosi è maggiore nelle donne, mentre la trombosi ricorrente si verifica più spesso negli uomini;
- l'osservazione che questa variante genetica aumenta il rischio di trombosi venosa profonda ma non di embolia polmonare [9].

È stata studiata una serie di possibili spiegazioni, in merito a quest'ultima, ma finora non ne è stata trovata alcuna. Ciò implica che trombosi vascolari profonde ed embolia polmonare, da oltre 150 anni considerate come manifestazioni di una sola malattia, siano differenti e possono avere fattori di rischio specifici [10]. Il primo paradosso invece è stato in parte risolto: quando in un modello si rimuovono fattori di rischio specifici per le donne, come l'uso ormonale, la gravidanza e il puerperio, l'incidenza della trombosi venosa è più elevata negli uomini rispetto alle donne. Tuttavia le cause che sottendono a tale differenza non sono ancora chiare.

La trombosi venosa è un grave disturbo con un'elevata incidenza e un'alta comorbidità. L'incidenza varia tra i diversi gruppi etnici. Le cause della trombosi sono sia genetiche che acquisite ed entrambe svolgono un ruolo importante. I fattori di rischio più importanti sono il cancro e alcuni tipi di intervento chirurgico. I fattori di rischio intermedio sono le terapie ormonali (estroprogestinici) e l'obesità, nonché fattori genetici quali le carenze di anticoagulanti naturali. Sono stati identificati molti altri fattori di rischio genetici comuni, ma hanno solo un effetto debole sulla trombosi.

Anche l'emogruppo non O è considerato un fattore di rischio aumentato di TEV, i soggetti di emogruppo non-O presentano all'incirca valori di fattore di von Willebrand (VWF) inferiori del 25% rispetto a chi presenta un emogruppo O. In un grande studio prospettico danese si è rilevato che il rischio di TEV attribuibile alla popolazione era del 20% per il tipo di sangue ABO non-O, il 10% per la mutazione del FV Leiden e l'1% per la mutazione G20210A della protrombina, rendendo quindi il tipo di sangue ABO come il fattore di rischio più importante per il TEV nella popolazione generale. L'ipotesi è che una maggiore propensione per la formazione di trombosi in soggetti non-O conferisse un vantaggio di sopravvivenza agli uomini primitivi proteggendoli dalle emorragie [11].

### **1.5.1 Nuovi aspetti biologici: nuovo modello dell'immunotrombosi**

Recenti lavori suggeriscono che la trombosi in determinate circostanze abbia un ruolo fisiologico importante nella difesa immunitaria e in tal senso è nato il concetto di immunotrombosi per descrivere questo processo. L'immunotrombosi indica una risposta immune innata indotta dalla formazione di trombi all'interno dei vasi sanguigni, in particolare nei microvasi. L'immunotrombosi è sostenuta da cellule immunitarie e da specifiche molecole legate alla trombosi e genera un network intravascolare che facilita il riconoscimento, il contenimento e la distruzione degli agenti patogeni, proteggendo così l'integrità dell'ospite senza indurre un grave danno collaterale. Tuttavia, se non controllata, l'immunotrombosi è un importante processo biologico che favorisce le patologie associate alla trombosi.

La trombosi è generalmente considerata una deviazione patologica dell'emostasi che coinvolge la cascata coagulativa e l'attivazione delle piastrine. La trombosi è caratterizzata dalla formazione di trombi intravascolari (coaguli) ed occlusione dei vasi.

Sebbene siano stati sviluppati approcci anticoagulanti efficaci per curare e prevenire il TEV, i regimi terapeutici attuali agiscono sia sulla trombosi patologica che sull'emostasi fisiologica e quindi inevitabilmente aumentano il rischio di sanguinamento. Pertanto, vi è la necessità di



individuare nuove strategie che consentano l'inibizione specifica della trombosi arteriosa e/o venosa senza compromettere l'emostasi normale.

La trombosi arteriosa e la trombosi venosa sono malattie separate con caratteristiche patogenetiche distinte. La trombosi arteriosa è prevalentemente attivata dalla rottura della placca aterosclerotica (un processo chiamato aterotrombosi). Al contrario, una frequente causa di trombosi venosa è la stasi del sangue in presenza/assenza di lesioni endoteliali. Nonostante queste differenze, la trombosi arteriosa e la trombosi venosa condividono entrambe l'attivazione delle piastrine e la cascata della coagulazione che porta alla formazione della fibrina. Tuttavia, ultimi studi suggeriscono che la trombosi arteriosa e venosa coinvolgono anche processi distinti dall'emostasi che si verificano soprattutto nel letto endoteliale dei vasi. Questi meccanismi dipendono dalla partecipazione attiva delle cellule immunitarie innate (in particolare monociti e neutrofili, così come le cellule dendritiche) che iniziano e propagano la formazione di fibrina e provocano l'attivazione piastrinica durante lo sviluppo della trombosi.

L'immunotrombosi è sempre più riconosciuta come una linea indipendente di difesa dell'ospite supportata da meccanismi molecolari specifici. Media il riconoscimento di patogeni e cellule danneggiate e inibisce la diffusione e la sopravvivenza degli agenti patogeni. L'immunotrombosi può pertanto essere considerata come un nuovo elemento cruciale di immunità intravascolare, che fa parte del sistema immunitario che comprende una vasta gamma di strategie dell'ospite per rilevare e proteggersi dagli agenti patogeni confinando l'agente patogeno nel letto vascolare [12].

#### **1.5.1.1 Reclutamento e attivazione piastrinica**

Le piastrine sono frazioni cellulari anucleate (~ 1-3  $\mu\text{m}$  di diametro) che vengono generate e rilasciate da megacariociti nel midollo osseo.

Quando si verificano lesioni vascolari, le piastrine vengono reclutate nel sito di danno in un processo altamente efficiente e multistep che coinvolge l'interazione di specifici recettori delle cellule della superficie piastrinica con proteine della matrice sub-endoteliale (compresi il collagene e il fattore von Willebrand) che sono esposti o rilasciati localmente in quantità sostanziale solo dopo lesioni [13].

Dopo le prime fasi iniziali di "innesco", le piastrine si attivano e aderiscono saldamente alla parete del vaso. Le piastrine adese rilasciano potenti agonisti piastrinici (ad esempio adenosin fosfato - ADP) dai loro granuli intracellulari, che promuovono l'attivazione delle piastrine per via paracrina in un processo che si autoalimenta.

La continua adesione, attivazione e aggregazione delle piastrine provoca la rapida crescita del trombo.

#### **1.5.1.2 Il percorso della via della coagulazione.**

Parallelamente all'attivazione di piastrine, la cascata coagulativa è attivata nel sito del danno a livello dell'endotelio dei vasi sanguigni [12]. Mentre l'aggregazione piastrinica provoca una chiusura provvisoria della lesione, la coagulazione assicura che rimanga meccanicamente stabile, "sigillando" il difetto utilizzando la fibrina, che è il principale prodotto finale della cascata della coagulazione.

La barriera endoteliale fornisce una segregazione spaziale tra fattori della coagulazione del sangue e il fattore tissutale nelle cellule endoteliali intatte. Ciò assicura che il fattore tissutale inizi la cascata coagulativa solo quando la parete del vaso viene lesionata e venga conseguentemente esposto, consentendo quindi di innescare ed attivare il fattore VIIa. L'interazione del fattore tissutale con il fattore VIIa attiva a sua volta il fattore X della coagulazione, con conseguente formazione di fattore X attivato (fattore Xa). Il fattore Xa a sua volta induce la produzione di trombina, un mediatore centrale dell'emostasi. La trombina promuove un'ulteriore attivazione del fattore X attraverso un anello di retroazione positivo e, soprattutto, converte fibrinogeno nel sangue nella fibrina. Al fine di prevenire un processo di coagulazione incontrollata o diffusa, il processo della coagulazione deve essere strettamente regolato da proteine endogene anticoagulanti, quali l'inibitore del fattore tissutale (TFPI), proteina C e antitrombina III [14].

#### **1.5.1.3 Cooperazione tra piastrine e coagulazione nella genesi del trombo venoso**

I processi di accumulo di piastrine e di attivazione della cascata coagulativa del sangue si promuovono a vicenda nei siti di lesione vascolare. Le piastrine esercitano potenti funzioni procoagulanti attraverso l'esposizione, a cellule con canali calcio-dipendenti, di fosfolipidi quali fosfatidilserina che supportano la coagulazione agendo come cofattori per le reazioni proteolitiche che vengono innescate dai fattori della coagulazione. La coagulazione a sua volta favorisce l'attivazione e l'accumulo delle piastrine, principalmente attraverso la trombina-proteasi, che promuove l'attivazione delle piastrine attraverso la scissione e l'attivazione del recettore 1 attivato dalla proteasi (PAR1) e del PAR4 sulle piastrine umane [15].

#### **1.5.1.4 Controllo della trombosi da parte di cellule immunitarie innate**

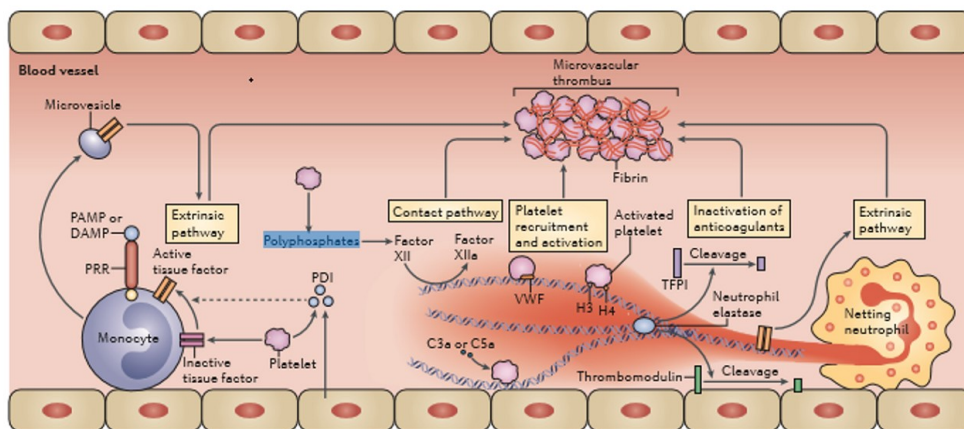
La partecipazione attiva delle cellule immunitarie innate alla formazione del coagulo è una caratteristica specifica della trombosi.

-Reclutamento delle cellule immunitarie innate nella fase di genesi del trombo: monociti e neutrofili vengono rapidamente reclutati sull'endotelio della parete del vaso e/o sono incorporati in coaguli intravascolari in crescita durante lo sviluppo del trombo. Le cascate molecolari e cellulari che innescano l'accumulo di leucociti durante la formazione del coagulo variano a seconda del trigger iniziale della trombosi e della fase dello sviluppo del trombo.

Durante la trombosi arteriosa, elemento fondamentale che funge da innesco del meccanismo di aterotrombosi è l'ulcerazione/rottura della placca aterosclerotica che porta al danno endoteliale con il successivo reclutamento dei leucociti e successiva attivazione piastrinica [16]. Le piastrine vengono prima attivate e reclutate a livello del subendotelio esposto e danneggiato in un processo che somiglia molto all'emostasi fisiologica e, una volta attivate, esprimono i recettori di adesione (compresa P-selectina) e rilasciano le chemochine che mediano il reclutamento delle cellule immunitarie innate.

Al contrario, durante lo sviluppo di trombosi venosa, le cellule endoteliali rimangono intatte morfologicamente ma si attivano e adottano un fenotipo proinfiammatorio che inizia il reclutamento di cellule immunitarie innate [17]. Ciò innesca in sede di TEV un lento rotolamento di parete di tali cellule, che ne determina lo strisciamento intraluminale e la successiva adesione endoteliale. I meccanismi molecolari coinvolti nell'adesione cellulare comprendono il rilascio di P-selectin dai corpi di Weibel-Palade [18]. L'accumulo di piastrine durante la formazione di trombosi venosa è supportato dalla risposta infiammatoria e riguarda principalmente la relazione reciproca tra piastrine, neutrofili e monociti, come dimostrato da studi su topi[6]. Inoltre, il fattore di von Willebrand rilasciato dalle cellule endoteliali può promuovere interazioni dirette tra cellule endoteliali, un processo che favorirebbe il reclutamento dei leucociti (Fig.3).

Fig.3: immunotrombosi - Bernard Engelmann et al *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity Nat Rev Immunol* 2013, Jan 13(1):34-45



Le piastrine e i fattori coagulativi attivano le cellule immunitarie innate. All'interno di un coagulo in fase di sviluppo, le piastrine e i prodotti della via della coagulazione regolano le funzioni efficaci delle cellule immunitarie innate. Ad esempio, i recettori attivati da proteasi (PARs) - che sono espressi da molte cellule immunitarie innate - sono attivati dai fattori della coagulazione (come la trombina e il fattore Xa) e inducono stimoli proinfiammatori in grado di attivare le cellule dendritiche [19].

Un gran numero di molecole correlate alla trombosi vengono prodotte o attivate da monociti e neutrofili (Fig. 3). Infatti, i monociti attivati e le microparticelle (o microvescicole) che rilasciano il fattore tissutale intravascolare possono promuovere la cascata coagulativa durante lo sviluppo del trombo nei vasi sanguigni.

Il fattore tissutale può anche essere espresso da altri tipi di cellule immunitarie, come i neutrofili [20] e gli eosinofili, nonché le piastrine.

È interessante notare che i neutrofili hanno evoluto meccanismi specifici per potenziare la trombosi. Quando sono attivati rilasciano le “trappole extracellulari dei neutrofili” (neutrophil extracellular traps -NET), che sono costituite da una matrice di DNA e istoni. Queste NETs contengono diverse proteine ad attività enzimatica essenziali nella meccanica antibatterica dei neutrofili, tra cui la mieloperossidasi, l'elastasi dei neutrofili, la pentraxina, la lattoferrina, la metalloproteinasi 9 della matrice (MMP9). Tuttavia, le NETs non solo svolgono funzioni antibatteriche, ma inducono anche una forte risposta procoagulante (Fig. 3). Le NET possono legare e attivare le piastrine nella genesi delle trombosi venose [21]. Inoltre, i nucleosomi

extracellulari all'interno di NET formano una piattaforma catalitica che stimola l'attività proteolitica dell'elastasi neutrofila, che a sua volta promuove la coagulazione.

Inoltre, i neutrofili possono degradare e modificare altri anticoagulanti naturali, incluso la trombomodulina, clivata dall'elastasi neutrofila, che si trova anche su NETs.

### **1.5.1.5 L'immunotrombosi come difesa da patogeni**

La coagulazione come altro aspetto biologico ha un ruolo nella risposta di difesa ai patogeni.

La fibrina può esercitare effetti diretti antimicrobici e limitare la diffusione degli agenti patogeni. Probabilmente il primo collegamento riconosciuto tra la coagulazione del sangue di mammiferi e la difesa antimicrobica è stata l'osservazione che la deposizione di fibrina in posizioni extravascolari, come le cavità peritoneali, contribuisce alla cattura di batteri [22].

Questo processo fisiologico è sostenuto dalla formazione di microtrombi all'interno dei microvasi. Questi microtrombi agiscono come matrici antimicrobiche che mediano la protezione dell'ospite contro gli agenti patogeni (Fig. 4). L'immunotrombosi viene innescata e mantenuta dall'accumulo locale di cellule immunitarie innate (specialmente monociti e neutrofili), un processo che presuppone l'adozione di un fenotipo pro-adesivo da cellule endoteliali microvascolari esposte a patogeni. Tuttavia, ancora non si sa perché le cellule immunitarie attivate possono indurre la trombosi e perché le molecole trombospecifiche si sono evolute nei mammiferi e si siano mantenute, dato che la trombosi può costituire una minaccia importante agli organismi ospitanti a causa della sua capacità di sopprimere la perfusione dell'organo.

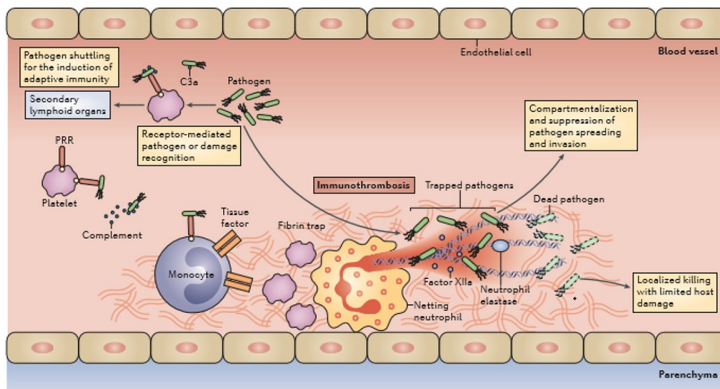
Le piastrine inoltre svolgono un ruolo importante nella difesa dell'ospite:

- le piastrine si legano ai microrganismi e possono attivarsi per aiutare la difesa dell'ospite durante le infezioni; in risposta ai prodotti batterici, le piastrine si legano direttamente ai neutrofili e innescano la formazione di NETs (un processo chiamato NETosis). I meccanismi esatti di NETosis piastrinica devono ancora essere stabiliti [23].

- recenti studi sui topi hanno rivelato che le piastrine cooperano con il sistema del complemento per il trasporto dei batteri sistemici alle cellule CD8 $\alpha$  + dendritiche spleniche, un processo indispensabile per l'induzione dell'immunità antibatterica adattativa [24].

Inoltre, le piastrine attivate possono sostenere direttamente la risposta immunitaria innata agli agenti patogeni mediante la secrezione di peptidi antimicrobici. Ad esempio, la  $\alpha$ -toxina prodotta da *Staphylococcus aureus*, che permeabilizza le cellule bersaglio, stimola le piastrine a rilasciare  $\beta$ -defensine, che sono peptidi antimicrobici che frenano l'attività microbica e riducono la crescita batterica [25].

Fig.4: immunotrombosi – e difesa dell'ospite da agenti patogeni - Bernard Engelmann et al *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity* Nat Rev Immunol 2013, Jan 13(1):34-45



Il nuovo concetto di immunotrombosi rappresenta dunque un elemento importante del sistema immunitario, dove nel comparto intravascolare svolge almeno quattro diverse funzioni fisiologiche:

- 1) aiuta a catturare gli agenti patogeni circolanti nel sangue e quindi limitare la diffusione degli agenti patogeni mantenendo i microrganismi all'interno della rete fibrinica;
- 2) impedisce l'invasione tissutale da agenti patogeni attraverso la formazione di microtrombi nei microvasi;
- 3) i trombi intravascolari generano un compartimento distinto che concentra le strategie antimicrobiche e i loro obiettivi patogeni e favorisce quindi l'uccisione di agenti patogeni;
- 4) l'accumulo nei microvasi e la deposizione del fibrinogeno o della fibrina promuovono l'assunzione di ulteriori cellule immunitarie nel sito dell'infezione e/o del danno del tessuto, sostenendo ulteriormente il riconoscimento degli agenti patogeni e coordinando la risposta immunitaria (figura 3). La formazione di fibrina in risposta a diversi agenti patogeni associati a setticemie, inclusi *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*, ha dimostrato di avere un ruolo nella protezione dell'ospite [23,26].

Di supporto a tali considerazioni sono anche le evidenze di come i microrganismi patogeni adottino sofisticati sistemi atti ad interferire con la cascata coagulativa. Gli streptococchi A, C e G esprimono streptochinasi, che attiva il plasminogeno dell'ospite per formare la plasmina, la maggiore proteina della serina che scioglie la fibrina. Di conseguenza, gli streptococchi del gruppo A usano streptochinasi per invadere e diffondersi nei tessuti dell'ospite, forse attraverso la loro capacità di prevenire l'immunotrombosi. [27].

D'altra parte anche se l'immunotrombosi è suggerita per supportare il riconoscimento di patogeni e la difesa dell'ospite, l'attivazione aberrante o non controllata dell'immunotrombosi può essere dannosa per l'ospite.

La coagulazione disseminata intravascolare (CID) può attivarsi quando il processo di immunotrombosi diventa "incontrollabile" e non è più in grado di limitare la diffusione di patogeni o di cellule danneggiate. Questo fallimento della trombosi immunitaria determina la formazione illimitata di trombi nei microvasi e l'eccessiva attivazione dell'infiammazione, aggravata dalla capacità di entrambi i processi di potenziarsi vicendevolmente. L'immunotrombosi potrebbe quindi rappresentare una fase fisiologica iniziale nello sviluppo della CID.

I determinanti molecolari e cellulari che sostengono lo sviluppo di trombosi venose sono strettamente correlati a quelli che inducono immunotrombosi. I trombi che si formano nelle vene profonde sono ricchi di fibrina e contengono strati di piastrine, globuli rossi e leucociti. La cascata di eventi che porta al TEV è rimasta in gran parte incompresa, a causa della mancanza di un modello animale rilevante.

Tuttavia, i dati recenti ottenuti nei topi suggeriscono che l'attivazione aberrante di immunotrombosi è un evento chiave nell'avvio e nella propagazione delle trombosi venose. Infatti, l'osservazione in tempo reale di trombi venosi nascenti ha rivelato che la trombosi inizia come infiammazione "asettica" con un massiccio reclutamento di neutrofili e monociti. Inoltre, questi studi hanno dimostrato che il rilascio del fattore tissutale intravascolare da parte delle cellule mieloidi, un importante meccanismo di trombosi immunitaria, è indispensabile per la formazione del trombo. I topi che mancano di fattore tissutale sulle cellule mieloidi risultano, negli studi sperimentali in vivo, protetti dalla formazione di trombosi venose.

Tuttavia, resta da stabilire se l'immunotrombosi aberrante contribuisca a tutte le forme di TEV o sia limitata a certi sottogruppi di trombosi venose.

### **1.5.2. Nuove molecole e nuove frontiere di studio coinvolte nella patogenesi del trombo venoso**

**-microparticelle (MPs):** negli ultimi 10 anni, le microparticelle sono emerse come potenziali attori chiave in eventi tromboembolici. Sono vescicole submicroniche (dimensioni che vanno da 50-1000 nm) che vengono sparse dalla superficie delle cellule intravascolari tra cui le piastrine, le cellule endoteliali e leucociti. Il repertorio delle proteine di membrana MP-esposte riflette quello della cellula da cui sono state liberate e una di queste proteine è il fattore tissutale

(TF). TF è l'inziatore primario della cascata di coagulazione, in particolare l'associazione tra le microparticelle TF-positive (TF-MP) e il TEV è stata dimostrata. Anche se TF normalmente non è espresso da cellule intravascolari, alcuni stati patologici come la sepsi regolano l'espressione TF su queste cellule e quindi sulle MPs.

Diversi autori hanno rilevato che la concentrazione plasmatica di TF-MP correla positivamente al rischio di TEV. [28].

**-microRNA:** i microRNA (miRNA) sono piccole molecole endogene di RNA non codificante a singolo filamento riscontrate nel trascrittoma di piante, animali e alcuni virus a DNA. Si tratta di polimeri codificati dal DNA nucleare eucariotico lunghi circa 20-22 nucleotidi e principalmente attivi nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale. I miRNA vengono inglobati nel complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC) e inducono il silenziamento genico tramite sovrapposizione con sequenze complementari presenti su molecole di RNA messaggero (mRNA) bersaglio. L'effetto che ne deriva è la repressione della traduzione o la degradazione della molecola bersaglio [29].

Il silenziamento può avvenire secondo i seguenti meccanismi:

- 1) taglio della molecola di mRNA;
- 2) destabilizzazione della molecola di mRNA tramite accorciamento della coda di poli(A);
- 3) diminuzione dell'efficienza di traduzione del messaggero.

I miRNA derivano da trascritti di sequenze codificate da geni autonomi oppure inclusi in introni di altri geni. Le sequenze nucleotidiche codificanti i miRNA sono trascritte dalla RNA polimerasi II [30]. Al termine del processamento nucleare i pre-miRNA sono esportati nel citoplasma. Nel citoplasma i pre-miRNA sono tagliati dalla RNA-asi di tipo III.

I miRNA risultano essere evolutivamente molto conservati e si pensa siano elementi molto antichi dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica. Le molecole costituenti i loro sistemi di espressione risultano essere simili nelle piante e negli animali, ma vi sono delle differenze inerenti ai loro meccanismi di espressione.

I miRNA regolano l'espressione genica secondo meccanismi diversi nelle piante e negli animali. Nelle piante i miRNA si appaiano in maniera perfetta all'mRNA bersaglio, provocando il taglio di quest'ultimo. L'appaiamento perfetto tra miRNA ed mRNA promuove la degradazione del messaggero. Questa è la principale modalità di silenziamento nelle piante [31-33].



Negli animali i miRNA hanno solo una parziale similarità di sequenza con il trascritto bersaglio. L'appaiamento è dunque imperfetto e coinvolge pochi nucleotidi [34]. Il silenziamento dell'espressione genica avviene per inibizione della sintesi proteica [35]. Questo meccanismo esiste anche nelle piante, ma è meno comune. I miRNA parzialmente complementari ad un bersaglio possono inoltre aumentare la velocità di deadenilazione dello stesso provocando una più rapida degradazione del trascritto.

I microRNA circolanti sono presenti in una gamma di fluidi corporei e sono stati recentemente dimostrati essere biomarcatori utili in molte malattie (neoplasie, patologie cardiovascolari).

Nel 2014 è stato effettuato il primo studio utilizzando Real time PCR per verificare se tali molecole circolanti potessero avere un ruolo di biomarcatori anche nella patologia trombotica venosa. Risultati conclusivi non ne sono emersi ma si evidenziava che in una popolazione selezionata, di piccole dimensioni, di pazienti con TEV idiopatico rispetto ad una popolazione di soggetti sani alcuni miRNA presentavano una significativa differenza tra cui: miR-582, miR-195 e miR-532, suggerendo tali molecole come possibili candidati a studi successivi per identificare nuovi bio-marcatori di patologia [36]. Il limite di tali studi oltre ad essere legato alla numerosità è anche correlato alla funzione in parte sconosciuta di tali miRNA rendendo difficile comprendere l'eventuale meccanismo biologico che regolano; considerando anche il fatto che molti di essi non hanno un solo bersaglio molecolare ma sono in grado di interagire in complessi network cellulari poli-target.

L'inibizione di miR-195 favorisce la proliferazione cellulare, la migrazione e l'angiogenesi delle human endothelial progenitor cell (hEPC) sotto l'ipossia [37].

Sono emerse, negli ultimi anni, nuove segnalazioni in letteratura di un possibile ruolo dei miRNA nella patologia trombotica venosa; pur presentando notevoli potenzialità al momento non risultano essere conclusivi i risultati disponibili; studi in vitro hanno mostrato come alcuni di essi siano in grado di regolare il Platelet Derived Growth Factor (PDGF), alcuni fattori coagulativi dunque favorendo o inibendo il meccanismo trombotico.

MiR-126 è un miRNA di recente scoperta, è uno dei più efficaci e attivi microRNA in grado di mantenere la proliferazione delle cellule endoteliali, la migrazione e l'attività tubulogenica [38]. L'abbattimento dei valori di miR-126 in studi sui pesci zebra e sui topi ha provocato una riduzione significativa dei vasi sanguigni ed emorragie [39]

Allo stesso modo, i topi che presentano deficit di miR-126 mostravano difetti dell'integrità dei vasi, aumento delle emorragie e della letalità dell'embrione [40]. Queste conclusioni hanno suggerito che le Endothelial Progenitor Cells (EPC) e il miR-126 hanno proprietà

proangiogeniche. Tuttavia, la funzione biologica e la correlazione tra miR-126 e EPCs devono essere ulteriormente chiarite.

In uno studio recente, in contrasto con dati precedenti, si è segnalato come miR-126 migliori la migrazione delle EPC e l'attività tubulogena. Il meccanismo di miR-126 diretto sulle EPC è attraverso il percorso del segnale PI3K/Akt [41]. Inoltre, veniva dimostrato come l'effetto proangiogenico di miRNA 126 sembri intervenire nei processi di risoluzione del trombo venoso nel ratto, regolando EPCs. Sulla base di tali risultati si postulava come, la modulazione del miR-126 possa rappresentare un potenziale intervento terapeutico tramite la neo-angiogenesi mediata da EPC nel TEV. In tale studio si mostrava come le cellule nucleate, incluse ECs, monociti e granulociti neutrofilici compongono il perimetro del trombo mentre globuli rossi, piastrine e fibrinogeno si dispongono nel centro del trombo. Il maggior numero di cellule nucleate e EPCs erano presenti nel gruppo trattato con miR-126 in contrasto con il gruppo di controllo in cui era predominante la componente anucleata. I risultati mostravano che miR-126 promuove l'attivazione di EPC e neovascolarizzazione nel trombo venoso. Le cellule endoteliali esprimono sia fattori emostatici che fibrinolitici e svolgono un ruolo vitale sia nel processo di formazione che di risoluzione di trombi.

Dati sullo stroke ischemico mostrano bassi valori di miRNA 126 in fase acuta nei pazienti con evento acuto rispetto a controlli sani [42].

Studi sui microRNA potrebbero rivelare nuovi meccanismi biologici responsabili della formazione del trombo venoso e della sua risoluzione. Questo potrebbe favorire l'identificazione di nuovi target terapeutici al fine di prevenire il TEV recidivante e la sindrome post-trombotica. Per ora, sono necessari studi dedicati per collegare più miRNA alla trombosi e capirne i target specifici [43].

Molti altri miRNA hanno mostrato avere importanti attività in ambito vascolare, maggiormente valutati in campo cardiologico e di tromboembolismo sui vasi arteriosi; minori evidenze sono disponibili sugli effetti eventuali della patologia venosa.

## **INTERLEUCINE**

In molte pubblicazioni recenti emerge un possibile ruolo delle note interleucine di fase acuta tra cui IL-6, IL-8, TNF-alfa come possibili marcatori bioumorali nella fase acuta del TEV.

**IL-6:** è uno dei più importanti mediatori della febbre e delle risposte di fase acuta. È secreta dai Linfociti T e dai macrofagi per stimolare la risposta immunitaria, ad esempio durante un'infezione o in seguito ad un trauma o altri danni tissutali che portino ad infiammazione.

**IL-8:** sintetizzata da macrofagi, cellule epiteliali ed endoteliali, che immagazzinano IL-8 nelle loro vescicole di secrezione, i corpi di Weibel-Palade; è una chemochina mediatore della risposta immunitaria innata. Induce chemotassi delle cellule bersaglio, in primo luogo neutrofili ma anche altri granulociti, che in questo modo migrano verso il sito di infezione. L'IL-8 induce anche fagocitosi da parte degli stessi. L'IL-8 è anche conosciuta per essere un potente promotore dell'angiogenesi. Poiché la secrezione di interleuchina-8 è aumentata dallo stress ossidativo, che a sua volta fa sì che il reclutamento di cellule infiammatorie provochi un ulteriore aumento di mediatori di stress ossidativo, la rende un parametro chiave nell'infiammazione localizzata.

*Recenti evidenze correlano nella patologia trombotica venosa valori elevati all'esordio di patologia di IL-8 con il diametro di incomprimibilità basale delle trombosi venose profonde femorali. [44].*

**TNF-alfa (fattore di necrosi tumorale  $\alpha$ ):** è prodotto principalmente dai macrofagi, sebbene possa essere prodotto da Linfociti T CD4+, cellule NK, neutrofili, mastociti, eosinofili e neuroni, è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica; essendo un pirogeno endogeno, è capace di indurre febbre, morte apoptotica delle cellule; aumenta la vasodilatazione ed è coinvolto nel processo patogenetico della CID.

*Significative differenze si sono riscontrate nei livelli di TNF-alfa circolanti e il residuo trombotico [44].*

Uno studio recentemente pubblicato metterebbe in evidenza come pazienti con alti livelli di d-dimero e marcato residuo trombotico confrontati con pazienti con TEV ma minor residuo trombotico presentino più elevati valori di IL-6, IL-8 e TNF-alfa [45].

## **INFIAMMAZIONE DA CMV**

Nell'indagare il meccanismo di immunotrombosi nuove ipotesi correlano il possibile ruolo che l'infezione cronica da CMV (virus notoriamente correlato all'immunoaging) possa avere nel favorire l'evento trombotico venoso.

L'infezione da citomegalovirus (CMV) in più studi è stata correlata con le patologie arteriose [46] in particolare con l'ictus. Si ipotizza che la risposta immunitaria ad antigeni del CMV possa giocare un ruolo importante nel processo aterosclerotico che si accompagna ad uno sbilanciamento in senso pro-infiammatorio del sistema immune [47]. Cellule, molecole e citochine ad azione pro-infiammatoria che hanno come target le cellule endoteliali, potrebbero cooperare nel processo aterosclerotico e di progressione della placca.

A questo proposito studi in vitro hanno rivelato che l'infezione del CMV interessa differenti cellule implicate nel danno endoteliale quali monociti/macrofagi e cellule della muscolatura liscia e direttamente anche le cellule endoteliali, interferendo sui processi apoptotici influenzando lo spessore intimale, la formazione della placca e le restenosi. E' stato inoltre osservato che gli stimoli infiammatori CMV correlati possono aumentare la produzione di trombina [48] che a sua volta sarebbe in grado di indurre una attività cellulare pro-infiammatoria trombina dipendente. Sono stati pubblicati case report che documentano come l'infezione acuta da CMV [49-54] sia correlabile ad un aumentato rischio di eventi tromboembolici.

E' stato descritto come il virus sia in grado, sia in fase acuta che durante riattivazioni anche latenti di viremia, di interagire con le piastrine tramite il Toll-like receptor 2 determinando un aumento di IL-1beta e CD40L ingenerando stimoli proinfiammatori, danno tissutale liberazione di Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ed in modelli murini favorire la formazione di aggregati di piastrine e leucociti [55]. E' stata inoltre documentata una associazione tra CMV, TEV e fattori trombofilici acquisiti e/o congeniti [56-58].

Il CMV si è dimostrato essere un virus che in modo latente modula il sistema immunitario riassetandolo in uno stato di infiammazione cronica sistemica (aumento di linfociti T e B di memoria e riduzione del pool di linfociti naive) [59]. Complessivamente l'infezione da CMV sia in fase acuta (infezione primaria conclamata) che in fase latente (infezione cronica in soggetti immunocompetenti) e i meccanismi immunologici di controllo di tale agente potrebbero influenzare negativamente l'omeostasi venosa fisiologica. Dati di sieroprevalenza sarebbero a favore di un possibile effetto favorente. L'infezione da CMV sembra svolgere un ruolo nello sviluppo di TEV nei pazienti immunocompetenti. L'infezione ricorrente potrebbe essere più importante dell'infezione acuta del CMV.

In uno studio tedesco è stato valutato il titolo anticorpale CMV-IgG e CMV-IgM, l'avidità CMV-IgG e i valori di CMV-DNA in 166 pazienti con TEV e confrontati con i valori di 166 donatori di sangue sani corrispondenti a sesso e età. Gli anticorpi CMV-IgG sono stati trovati più frequentemente nei pazienti con TEV rispetto ai controlli [57,8% vs 44,0%;  $p = 0,016$ ]. Inoltre, i titoli CMV-IgG erano significativamente più alti nel gruppo di casi ( $p = 0,002$ ) [60].

Tali dati non sono stati correlati con studi di sottopopolazioni linfocitarie; pertanto il dato di sieroprevalenza non è stato correlato con un eventuale effetto di immunomodulazione sistemica linfocitaria, dati in tal senso non sono disponibili in letteratura, in merito al tromboembolismo venoso.

## **PDGF**

C'è una chiara necessità clinica di biomarcatori plasmatici ad alta specificità per la previsione del rischio di tromboembolia venosa (TEV), ma finora tali marcatori sono rimasti invariati e scarsamente predittivi soprattutto nel determinare il rischio di recidiva o scarsa risposta alla terapia; un nuovo candidato in fase di studio risulta essere anche il PDGF-beta; un recente studio svedese lo proporrebbe come un possibile biomarcatore in fase di studio nella patologia venosa [61].

## **Il residuo trombotico venoso (RVT) e l'ostruzione polmonare residua: luci e ombre**

Al momento non esistono chiare evidenze in letteratura sul residuo venoso trombotico (RVT) come eventuale parametro da considerarsi quale variabile indipendente nella recidiva trombotica dopo un primo evento di TEV. Risultano, tuttavia, sempre più numerose le pubblicazioni che sostengono come effettivamente il residuo trombotico giochi un ruolo importante nella sindrome post trombotica ed in associazione con altre valutazioni cliniche e sierologiche (non come parametro isolato) possa comunque effettivamente guidare il clinico nelle scelte terapeutiche identificando un pattern clinico associato ad un rischio maggiore di recidiva trombotica.

Sulla base di recenti evidenze, la mancata ricanalizzazione nei primi sei mesi dell'episodio trombotico è probabilmente un importante predittore della sindrome post-trombotica (PTS), mentre non svolge un ruolo in tal senso lo sviluppo del reflusso venoso trans-popliteo [62]. La ricanalizzazione incompleta o assente è associata ad una maggiore incidenza di PTS, probabilmente come conseguenza del flusso sanguigno deteriorato e della pressione venosa aumentata. Ciò suggerisce che la ricanalizzazione precoce potrebbe migliorare l'esito del trattamento del TEV [63].

La decisione di sospendere l'anticoagulazione nei pazienti con un primo episodio di TEV prossimale, basata sulla valutazione del RVT e del D-dimero seriale, è stata recentemente correlata con un tasso annuale complessivo di TEV ricorrente inferiore al 5%, ritenuto accettabile dalla Sottocommissione sul controllo dell'anticoagulazione dell'ISTH [64].

L'ostruzione polmonare residua, rilevata con la scintigrafia ventilo-perfusiva polmonare a 6 mesi dopo un primo episodio di embolia polmonare, è stata recentemente considerata come un predittore indipendente del tromboembolismo venoso ricorrente e/o dell'ipertensione polmonare cronica tromboembolica [65].



## 2) Razionale dello Studio

Le attuali conoscenze e i progressi in campo farmacologico sulla patologia trombotica venosa hanno permesso di meglio gestire la terapia personalizzata del paziente con TEV, ma permangono ancora molti aspetti non chiariti. Circa il 40% degli eventi rimane idiopatico e le basi biologiche sono in parte ancora non chiare; sempre nuove evidenze mostrano come esista uno stretto network tra sistema immunologico e processo coagulativo. Nuove molecole sono in corso di studio nell'intento di chiarire il percorso patogenetico della malattia e soprattutto per identificare anche eventuali nuovi marcatori biologici di malattia, utili nel guidare le scelte terapeutiche.

La terapia anticoagulante (TAO-NAO -EBPM) è il gold standard delle linee guida attualmente validate a livello internazionale, ma rimane evidente come la gestione dei pazienti con TEV idiopatico rimane un aspetto di tale patologia che permane in gran parte demandato nella gestione al singolo professionista che personalizza il trattamento in termini di durata e scelta farmacologica. Non esistono al momento attuale biomarcatori predittivi di recidiva trombotica né di andamento clinico alla risposta terapeutica. Il monitoraggio del d-dimero e il residuo trombotico, dalle attuali evidenze scientifiche, possono rappresentare utili parametri da tenere in considerazione nella valutazione globale del rischio relativo di recidiva trombotica del paziente ma è ancora controverso il loro reale significato soprattutto se presi singolarmente; in tal senso non rappresentano affidabili parametri di potenziale rischio di recidiva.

Le ultime linee guida propongono nel TEV idiopatico una durata della terapia anticoagulante almeno di 3-6 mesi suggerendo un trattamento estensivo (a tempo indeterminato) qualora non sussistano rischi emorragici noti tali da sconsigliarne la prosecuzione.

Tale aspetto rappresenta il limite nelle conoscenze attuali della malattia e dei meccanismi che la regolano.

Rimane dunque necessario chiarire i meccanismi patogenetici nell'intento di identificare eventuali biomarcatori di malattia che possano meglio guidare il clinico anche nella scelta della durata di terapia considerando come noto che la decoagulazione a fronte di un netto beneficio nel curare la patologia in fase acuta e ridurre il rischio di recidiva è comunque gravata da un rischio intrinseco di sanguinamento aggiuntivo. Identificare nuove molecole che nella pratica clinica siano in grado di stratificare il rischio di recidiva rappresenterebbe un utile strumento che d'altra parte garantirebbe anche una scelta più mirata nella gestione terapeutica.

Numerosi studi recenti sembrano identificare in alcuni microRNA up-regolati o down-regolati [66,67] importanti molecole in grado di modulare la formazione di placca aterosclerotica, l'infiammazione endoteliale, la risposta cellulare a stimoli endogeni (NO) e l'iperattività piastrinica e quindi condizionare la progressione della patologia vascolare aterosclerotica. Scarsi sono invece i dati in letteratura su un loro ruolo nel TEV. In considerazione dei bersagli di tali modulatori epigenetici, diversi microRNA potrebbero svolgere un potenziale ruolo eziopatogenetico nel tromboembolismo. Un solo studio recentemente pubblicato ha segnalato una correlazione di alcuni microRNA, tra cui miR 195, con gli eventi tromboembolici. Algoritmi predittivi stimano che un terzo del genoma umano può contenere siti di legame singoli o multipli per miRNA; come tale, un singolo miRNA può potenzialmente colpire centinaia di geni o un singolo gene può essere bersaglio di molti miRNA differenti [68-75]. Queste proprietà conferiscono ai miRNA la possibilità di essere coinvolti nella regolazione di molti complessi meccanismi o sistemi fisiologici come il sistema emostatico.

L'immunotrombosi rappresenta un nuovo modello patogenetico del tromboembolismo venoso, e le interleuchine (IL-6, IL-8, TNF-alfa) come mediatori dell'infiammazione sistemica quali anche espressione di effetti paracrini dell'immunità innata rappresentano possibili stimoli per il processo trombotico.

Il sistema immunitario quale immunità innata ma soprattutto acquisita è al momento stato scarsamente studiato nella patologia trombotica venosa. Alla luce delle maggiori evidenze che correlano interleuchine infiammatorie, virus latenti ed immunoaging quali possibili fattori favorenti il TEV, risulta sempre più determinante approfondire le correlazioni che l'infiammazione sistemica, lo stato immunitario e gli stimoli paracrini e micromolecolari (miRNA) stabiliscono nel complesso network "immunotrombotico". Chiarire il possibile ruolo di tali parti potrebbe anche meglio spiegare la biologia del tromboembolismo venoso e suggerire nuovi bersagli terapeutici.



### 3) Scopi dello studio

In questo studio ci si propone di valutare lo stato infiammatorio sistemico in fase acuta del TEV come possibile fattore patogenetico nell'insorgenza della patologia venosa o fattore clinico-prognostico e di risposta terapeutica. Ipotizzando quindi che lo stato infiammatorio possa rappresentare un elemento eziopatogenetico nel TEV, si vuole inoltre indagare se i pazienti con scarsa risposta terapeutica (ridotta ricanalizzazione venosa) e quindi peggior prognosi presentino una concomitante patologia arteriosa.

Si vuole inoltre valutare la concentrazione di alcuni microRNA circolanti sierici e citochine infiammatorie allo scopo di individuare possibili biomarcatori prognostici-terapeutici del TEV correlabili allo stato infiammatorio.

#### End-point primari:

- identificazione eventuali correlazioni tra miRNA e patologia trombotica venosa
- identificazione correlazioni tra miRNA all'esordio di patologia e al follow-up a 3 mesi con residuo trombotico come possibili bio-marcatori prognostici
- valutare nel modello di immunotrombosi quali elementi tra Interleuchine (IL-6, IL-8, TNF alfa) e sottoclassi linfocitarie siano maggiormente coinvolti nei pazienti con TEV idiopatico

#### **Disegno dello studio**

Lo studio si presenta come sperimentale prospettico di una popolazione di pazienti con nuova diagnosi di TEV (con età compresa tra 18 e 65 anni). Lo studio prevede un gruppo di casi (23) rappresentati da pazienti con nuova diagnosi di TEV non oncologici.

Criteri d'esclusione per arruolamento dei casi: terapie immunosoppressive, chemioterapia in atto, HIV, stato di immunodepressione cronica od acquisita (trapiantati), neoplasie attive note, recente chirurgia (<1 mese), stato di gravidanza. I pazienti sono categorizzati in "unprovoked" e "risk-associated". Vengono considerati pazienti "risk associated" i pazienti con: TEV da estroprogestinico, terapie ormonali con anabolizzanti, immobilizzazione >3 giorni, lunghi viaggi > 6 ore, interventi chirurgici negli ultimi 3 mesi (non entro 1 mese altrimenti esclusi dallo studio –come da criterio di esclusione).

Il gruppo di pazienti (23 soggetti- "gruppo dei casi") viene inoltre comparato ad un eguale numero di soggetti sani (23 soggetti- "gruppo dei controlli") arruolati tra i donatori di sangue che presentino anamnesi personale negativa per eventi trombotici venosi pregressi e che non siano

affetti da patologie infiammatorie croniche; i soggetti sani e i pazienti con TEV sono stati accoppiati 1:1 per età e sesso per valutare i medesimi micro RNA, le interleuchine infiammatorie, i subset linfocitari.

#### Gruppo casi: pazienti con TEV di nuova diagnosi

*Al momento della diagnosi veniva eseguito entro 5 giorni prelievo venoso che oltre alla normale routine di indagini laboratoristiche prevedeva lo stoccaggio di campioni di sangue per:*

- valutazione di micro RNA sierici (miR 126, 155, 17.92, 195);
- valutazione di citochine pro-infiammatorie sieriche (IL8, IL6, TNF-alfa).
- sierologia CMV con valutazione IgG ed IgM (al momento non disponibili dati);
- tipizzazione linfocitaria estesa con studio di alcune sottopopolazioni linfocitarie correlate all'infezione con CMV;

I pazienti inoltre eseguivano i normali accertamenti diagnostici con radiografia del torace, ecografia addominale, screening dei principali marker neoplastici (CEA, CA125, CA19.9, Alfa fetoproteina, CA 15.3, NSE), indagini di autoimmunità ANA reflex, LAC test, anticorpi anti cardiolipina, anti beta 2 glicoproteina.

#### A 3 mesi:

Follow-up con questionario per comorbidità, eventi avversi e risposta alla terapia

- esecuzione di ECO-TSA .
- eco-venoso per controllo ricanalizzazione/residuo trombotico
- d-dimero e prelievo di siero per micro RNA sierici (miR 126, 155, 17.92, 195); il siero è stato inoltre stoccato per eventuali valutazione successive (ad esempio molecole coinvolte nei meccanismi di adesione piastrinica quali PDGF platelet-derived growth factor)

#### A 6 mesi:

Follow-up telefonico con questionario per comorbidità, eventi avversi e risposta alla terapia. Inoltre i pazienti con TEP senza TVP venivano sottoposti a discrezione del medico referente a TAC torace con mdc o scintigrafia polmonare ventilo-perfusiva per rivalutare il quadro trombotico.

Nel periodo di follow-up veniva inoltre completato lo studio di screening trombofilico con indagini per alterazioni della: Proteina C, Proteina S, resistenza alla proteina C attivata, mutazione per fattore II e V Leiden della coagulazione, dosaggio della omocisteinemia e ATIII.

*Previsto ulteriore di follow-up clinico a 12-18-24 mesi.*

Gruppo controlli: ai soggetti sani donatori di sangue veniva eseguita contestualmente alla donazione prelievo venoso per:

- valutazione di micro RNA sierici (miR 126, 155, 17.92, 195)
- valutazione di citochine pro-infiammatorie sieriche (IL8, TNF-alfa, IL6).
- sierologia CMV con valutazione IgG ed IgM;
- studio delle sottopopolazioni linfocitarie.

### **I miRNA selezionati sono:**

#### ***1) MicroRNA coinvolti nei processi d'infiammazione sistemica ed endoteliale e nella modulazione dell'attività piastrinica:***

**-miR 126**: è coinvolto nell'infiammazione vascolare, nei processi di adesione, proliferazione e migrazione cellulare ed ha come target VEGFR-2.

**-miR 155**: è coinvolto nell'infiammazione vascolare; come target ha VEGFR-2 e la sua *iperespressione è correlata a progressione di placca* nella patologia aterosclerotica (ha attività anche oncogenica). Si è dimostrato essere anche strettamente *correlato con l'attività dei linfociti T* effettori infatti è stato riportato che bassi valori di miR155 sarebbero in grado di determinare una importante riduzione di linfociti CD8+ effettori e uno scarso controllo delle infezioni virali croniche [76]. Alti valori di mir155 risultano essere inoltre essere correlati ad un aumentata megacariocitopoiesi [77].

#### ***2) Micro RNA che hanno un'azione potenziale sulla modulazione dei fattori coagulativi***

**-miR 17.92** rappresenta un cluster coinvolto nella pro-angiogenesi (modulazione *dell'antitrombina e del fibrinogeno*) di cui fanno parte anche miR 19b e 20b che sono risultati essere down-regolati in pazienti con LES e sindrome da anticorpi anti fosfolipidi ed associati a più alte concentrazioni di fattore tissutale. L'over-espressione di miR17.92 nei linfociti è stato inoltre correlato con un aumentato grado di disturbi linfoproliferativi e disturbi auto-immuni [78].

#### ***3) Micro RNA correlati alla patologia venosa***

**-miR195** (fa parte della famiglia del miR15): ed è stato inoltre correlato ad un aumentata secrezione nei pazienti con infarto miocardico acuto rispetto a controlli sani e in pazienti con cardiomiopatia ipertrofica.



## 4) Materiali e Metodi

### 4.1. Reclutamento dei casi e controlli

**-Reclutamento dei casi:** l'arruolamento è stato effettuato sia tra i pazienti degenti presso l'U.O. di Medicina Interna ad indirizzo angiologico e coagulativo sia tra i pazienti afferenti all'ambulatorio del centro Trombosi secondo i criteri d'inclusione per lo studio sopracitati. L'arruolamento, previa informazione ed acquisizione del consenso, avveniva contestualmente alla diagnosi di malattia. Il reclutamento è durato 12 mesi e il follow-up 6 mesi (previsto estensivo per altri 24 mesi).

**-Reclutamento dei controlli:** i soggetti sono stati reclutati presso il centro Trasfusionale del nostro Ospedale, in numero di 23 per un confronto con una sottopopolazione di pazienti con TEV di eguale numero appaiati per età e sesso 1:1. L'arruolamento, previa informazione ed acquisizione del consenso, è avvenuto contestuale alla donazione di sangue.

Nei pazienti arruolati sono stati valutati i fattori di rischio cardiovascolari (familiarità, fumo, diabete, ipertensione, dislipidemia, cardiopatia ischemica), la presenza di familiarità nota per TEV; è stato effettuato uno studio trombofilico per valutare la eventuale presenza deficit di proteina C, S, ATIII, mutazione per fattore II, V Leiden della coagulazione, dosaggio dell'omocisteina. E' stata valutata la presenza/assenza di trombofilia acquisita (LAC test, anticorpi anticardiolipina, anti beta 2 glicoproteina). Alla diagnosi oltre ai normali parametri funzionalità renale e crasi ematica è stata eseguita determinazione di VES, PCR e D-dimero (quest'ultimo rivalutato come sopradescritto a 3 mesi dall'esordio di patologia).

### 4.2. Analisi dei miRNA

**Estrazione microRNA da plasma:** il sangue periferico dei soggetti in studio è stato prelevato in provette contenenti EDTA ed entro 2 ore dal prelievo è stato centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti. Il plasma è stato quindi prelevato ed ulteriormente centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti per eliminare ogni eventuale contaminazione cellulare, 600 µl di tale plasma sono stati quindi estratti con kit commerciale mirVana PARIS kit (Ambion, Life Technologies, CA, USA). In breve a 500 µl di plasma è stato aggiunto un uguale volume di 2X Denaturing Solution. I campioni sono stati quindi incubati 5 minuti in ghiaccio. Al termine dell'incubazione un uguale

volume di fenolo: cloroformio, è stato aggiunto a ciascun campione. Per miscelare bene i componenti le provette sono state agitate vigorosamente per 1 minuto e quindi centrifugate per 5 minuti a 10000 g per separare la fase organica dalla fase acquosa. Al termine della centrifugata, la fase acquosa sovrastante è stata prelevata, messa in una nuova provetta, a cui sono stati aggiunti 1,25 volumi di etanolo assoluto (Carlo Erba Reagenti). Successivamente la miscela etanolo/microRNA è stata applicata in una colonnina contenente un filtro specifico per intrappolare e trattenere i microRNA. Tale filtro è stato quindi più volte lavato con soluzioni di lavaggio specifiche per purificare i microRNA che al termine di tali procedure è stato eluito in 50 µl di Elution Solution preventivamente scaldato a 95°C. I microRNA così estratti sono stati quindi congelati a -80°C.

**Digestione microRNA con DNase I:** una volta estratti i microRNA sono stati digeriti con DNase I. Questo ulteriore passaggio è utilizzato allo scopo di eliminare l'eventuale contaminazione di DNA dal campione, che potrebbe portare successivamente ad amplificazioni aspecifiche. Tale digestione è stata condotta con l'utilizzo del kit *DNA-free* (Ambion, Life Technologies, CA, USA).

In breve a 30 µl per ciascun campione sono stati aggiunti 3 µl di 10x DNase I Buffer, 1 µl di rDNase I (2 U/µl) e quindi incubati a 37°C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 0,1 volumi di DNase Inactivation Reagent a ciascun campione per inattivare l'enzima precedentemente aggiunto e per rimuovere i cationi divalenti, come magnesio e calcio, che potrebbero portare ad una degradazione dell'RNA. I campioni sono stati quindi incubati 2 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 10000 g per 1,5 minuti. Il sovrinatante è stato prelevato, posto in una nuova provetta e quantificato con spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific, DE, USA), quindi congelato immediatamente a -80°C.

**Retrotrascrizione dei miRNA:** i microRNA estratti e digeriti sono stati quindi retrotrascritti con l'utilizzo del TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, CA, USA). In breve a 10 ng di RNA sono stati aggiunti 1 mM di dNTPs Mix (10nM di ciascun nucleotide: dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1,5 µl di 10xRT Buffer, 0,25U di RNase Inhibitor, 50U di Multiscribe RT enzyme, 3 µl del primer specifico per il microRNA di interesse (TaqMan MicroRNA Assay Life Technologies, CA, USA) e H<sub>2</sub>O per un volume finale di 15 µl. Il programma di retrotrascrizione prevedeva un ciclo di 30 minuti a 16°C, un ciclo di 30 minuti a 42°C ed un ciclo di 5 minuti a 85°C. Il cDNA così ottenuto era quindi diluito per la successiva reazione di quantificazione in RealTime PCR.

**Quantificazione dei miRNA con sonde TaqMan:** le sonde TaqMan sono sonde ad ibridazione specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti. Si tratta di oligonucleotidi che, come i *primers* della PCR, vengono disegnati per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare. La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR .

Il principio della reazione si basa sull'utilizzo di una sonda costituita da un oligonucleotide che contiene all'estremità 5' un marcatore fluorescente chiamato *reporter* e al 3' un *quencher* (un gruppo colorante in grado di mascherare l'emissione luminosa). Quando colpita dalla luce, la molecola fluorescente in 5' trasferisce energia al *quencher* il quale determina una inibizione della fluorescenza del substrato. Durante il processo di amplificazione, l'attività esonucleasica 5'-3' della Taq-polimerasi scizza la sonda determinando la separazione del *reporter* dal *quencher*, con una conseguente emissione di fluorescenza.

**Quantificazione dei miRNA con tecnica di RealTime PCR:** Le reazioni di PCR quantitativa in tempo reale, in duplicato per ciascun campione, sono state eseguite su termociclatore iCycler iQ Real-Time Detection System (BioRad, USA) con l'utilizzo dei kit TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, CA, USA) specifici per ciascun miRNA. La miscela di reazione per l'amplificazione era costituita da 3 µl di cDNA precedentemente diluito, 1 µl di primers specifici per ciascun microRNA, TaqMan 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Life Technologies, CA, USA) ed H<sub>2</sub>O per un volume finale di 20 µl. Il protocollo di amplificazione prevedeva un ciclo di denaturazione di 10 minuti a 95°C seguito da 40 cicli, ciascuno dei quali costituito da 2 step di 20 secondi a 94°C e di 1 minuto a 60°C. Per ogni reazione di amplificazione i campioni erano valutati in doppio e la validità della reazione era valutata attraverso un campione negativo, dove al posto del cDNA veniva aggiunta H<sub>2</sub>O.

### 4.3. Valutazione immunoenzimatica delle interleuchine

Per la valutazione delle interleuchine infiammatorie IL-6, IL-8, TNF-alfa è stato utilizzato il siero. Il sangue è stato prelevato ed entro 2 ore dal prelievo è stato centrifugato e dopo la separazione del siero mediante centrifugazione, è stato suddiviso il siero in aliquote. I campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento del dosaggio. La concentrazione di IL-6, IL-8 e TNF-alfa nei campioni di siero è stata valutata con saggi immunoenzimatici e precisamente con "sandwich" E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) disponibili in commercio. Sono stati scelti kit Ultrasensibili prodotti da Invitrogen (Camarillo, CA, USA) (Tab7).

Tab.7: saggi immunoenzimatici per la determinazione delle interleuchine

	<b>Assay range</b>	<b>Sensitivity</b>
Human IL-6 ELISA kit	10-0,16 pg/ml	<104 fg/ml
Human IL-8 ELISA kit	25-0,39 pg/ml	<100 fg/ml
Human TNF-alpha ELISA kit	32-0,5 pg/ml	<0,09 pg/ml

#### 4.4. Analisi immunofenotipica linfocitaria (FACS)

L'immunofenotipo su sangue intero è stato eseguito prelevando aliquote di 50 µL da una provetta di sangue periferico con anticoagulante K2E-EDTA. Successivamente lo stesso campione è stata utilizzato per l'esame emocromocitometrico completo con conta leucocitaria, eseguito con un analizzatore automatico (XT-2000i, Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Le aliquote di 50µL prelevate sono state processate mediante colorazione standard su sangue intero lisato e successiva acquisizione al citofluorimetro. Per analizzare il fenotipo linfocitario, sono state utilizzate le combinazioni di anticorpi monoclonali riportate in Tabella (Tab 8).

Tab.8: combinazioni anticorpi monoclonali

	<b>mAb FITC</b>	<b>mAb PE</b>	<b>mAb 3° colore (PerCP/PE-Cy5/PE-Cy7)</b>	<b>mAb APC</b>
<b>1</b>	CD5	CD19	CD45	CD3
<b>2</b>	CD16	CD56	CD3	NKG2C
<b>3</b>	CD4	CD25	CD3	CD8
<b>4</b>	CD28	CD95	CD3	CD4
<b>5</b>	CD28	CD95	CD3	CD8
<b>6</b>	p $\alpha$ γδ	Vδ2	CD3	

In dettaglio, 50 µL di sangue sono stati incubati per 20' a freddo (4° C) con quantità saturanti degli anticorpi monoclonali (tutti BD Biosciences, ad eccezione dell'anticorpo NKG2C, R&D Systems), indicati nella tabella. Quindi sono stati aggiunti 2 mL di *FACS Lysing Solution* (BD Biosciences) e dopo ulteriori 10' di incubazione, a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati per 8' a 400 g. Al termine della centrifugazione, il sovrnatante è stato eliminato dai



campioni e sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di trascinamento, per la lettura al citofluorimetro. I campioni sono stati acquisiti ad un citofluorimetro a flusso a due laser FACSCalibur (BD Biosciences) ed i dati, su almeno 200.000 eventi, sono stati analizzati con programma CellQuest (BD Biosciences). I linfociti sono stati identificati sulla base della loro tipica distribuzione morfologica al citogramma; quindi le diverse popolazioni linfocitarie CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16+CD56+CD3- ecc, sono state identificate all'interno della regione dei linfociti ed ulteriormente suddivise nelle sottopopolazioni di interesse (ad esempio in vergini CD28+CD95, memoria CD28+CD95+ ed effettori CD28-CD95+). Anticorpi isotipici irrilevanti sono stati utilizzati per definire le impostazioni dell'analisi e la marcatura non-specifica.

#### 4.5. Analisi ecografica

La valutazione con **ecografia venosa del residuo trombotico** è stata eseguita secondo due score di confronto uno *qualitativo* (assenza/presenza) [79,80] dove si considera assente un residuo trombotico  $<2$  mm in compressione o  $<3$ mm in 2 determinazioni consecutive e uno *quantitativo*, dove valutando la percentuale di occlusione residua calcolata come  $\text{diametro della vena durante la compressione (diametro b)} \times 100 / \text{diametro della vena prima della compressione}$  si considerava residuo arbitrariamente assegnato come " non significativo " quando  $< 40\%$  del diametro della vena, mentre significativo per valori  $> 40\%$  (Fig.5). Le valutazioni ecografiche sono state effettuate tramite ecografo Philips IU-22 in dotazione al Centro Trombosi.

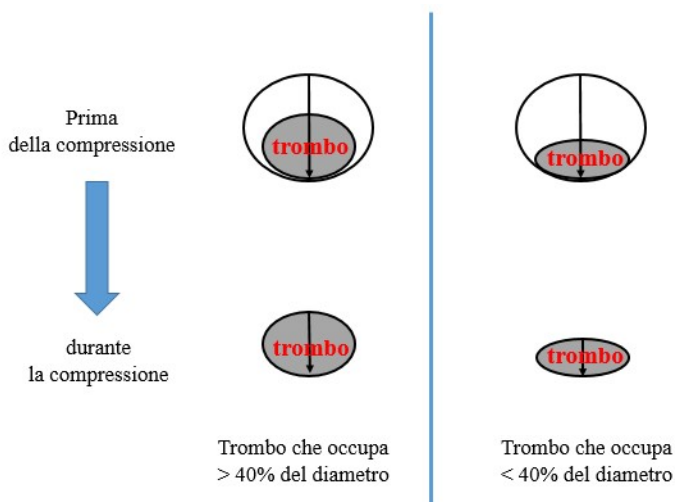


Fig.5: calcolo del residuo significativo

La valutazione ecografica quantitativa effettuata nella suddetta modalità in associazione al risultato TC/scintigrafia polmonare ventilo–perfusiva eseguita a 4-6 mesi permetteva in caso di evidente residuo significativo alla CUS (>40%) e/o persistenza radiologica di quadro trombotico maggiore polmonare (TAC/scintigrafia) di identificare un sottogruppo di pazienti considerato a “residuo trombotico globale significativo”.

La valutazione **ecografia dei tronchi sovra-aortici** è stata eseguita per valutare la presenza/assenza di placca carotidea e spessore mio-intimale patologico (secondo linee guida italiane con correlazione per età). Le valutazioni ecografiche sono state effettuate tramite ecografo Philips IU-22 in dotazione al Centro Trombosi.

#### **4.6. Analisi Sierologica per CMV**

Prevederà valutazione qualitativa degli anticorpi IgM, IgG anti-CMV nel siero di tutti i pazienti studiati, con dosaggio in chemiluminescenza indiretta (CLIA).

#### **4.7. Analisi statistica**

Per l'analisi statistica si è valutata la normalità di distribuzione delle variabili sopradescritte (sottopopolazioni linfocitarie, interleuchine, miRNA, VES, PCR, D-dimero, etc.); le variabili normalmente distribuite, parametriche, sono state espresse come valori di media  $\pm$  deviazione standard ( $\sigma$ ), mentre quelle non normalmente distribuite sono state espresse come mediana e range interquartile (IQR). I differenti gruppi di pazienti sono stati valutati con Mann-Whitney U-test e t test per dati indipendenti a seconda della distribuzione. Le variabili continue al tempo 0 (basale alla diagnosi) e al tempo 1 (a 3 mesi) sono state comparate utilizzando test T-Student per gruppi appaiati per le variabili normalmente distribuite e con test dei ranghi di Wilcoxon per le variabili non distribuite normalmente. I Coefficienti di correlazione sono stati valutati con Rho di Spearman causa la presenza di punti con grossa influenza sulla R di Pearson. Sono stati considerati valori significativi quelli con  $p < 0,05$ . E' stata eseguita inoltre ROC curve per valutare l'accuratezza di possibili biomarcatori come test diagnostici, calcolando l'area sotto la curva (AUC). Le analisi sono state eseguite utilizzando software SPSS V24.0 (IBM, Amork, NY). Le figure sono state effettuate con software GraphPad Prism.

## 5) Risultati

In 18 mesi sono stati arruolati 23 pazienti sani e 23 pazienti patologici (match 1:1 per età e sesso), la cui età media è risultata essere di  $44 \pm 12$  anni, con pari distribuzione di sesso (M= 10, F= 13). Il follow-up è durato 6-12 mesi (in base alle tempistiche di arruolamento). Nei 23 pazienti patologici e nei 23 pazienti sani sono state analizzate le variabili descritte nella sezione materiali e metodi. Nel gruppo dei pazienti patologici le analisi dei miRNA, interleuchine e dati sierologici a 3 mesi (tempo 1) sono risultate essere disponibili per 19 pazienti su 23 (escluse due femmine dallo studio al tempo di controllo per stato di gravidanza concomitante, 1 maschio per indisponibilità, 1 maschio per intervento chirurgico subentrante).

Vengono riportati nelle tabelle seguenti i dati descrittivi della popolazione dei pazienti patologici in merito a dati antropometrici e anamnestici (sesso, età, anamnesi e comorbidità) tipologia di tromboembolismo (TVP/TEP, fattori di rischio pre-esistenti ed acquisiti, familiarità pregressa per evento trombotico), indici di infiammazione sistemica, dati ematologici e valore del D-dimero alla diagnosi e a 3 mesi (Tabella 9-11).

Tabella 9: caratteristiche cliniche del gruppo dei 23 pazienti patologici con TEV (tromboembolismo venoso)

<b>Pazienti con TEV</b>	<b>Variabile</b>	<b>n.totale 23</b>	<b>%</b>
<b>Sesso</b>	<i>M</i>	10	43.5
	<i>F</i>	13	56.5
<b>Età</b>	<i>&lt;44 anni</i>	11	47.8
	<i>&gt;44 anni</i>	12	52.2
<b>Fumatore</b>	<i>Si (si-ex)</i>	6	26
	<i>No</i>	17	74
<b>Ipertensione</b>	<i>Si</i>	3	13
	<i>No</i>	20	87
<b>BMI</b>	<i>Aumentato</i>	8	34.8
	<i>Normale</i>	14	60.8
	<i>Diminuito</i>	1	4.4
<b>Dislipidemia</b>	<i>Si</i>	5	21.8
	<i>No</i>	18	78.2
<b>Diabete mellito</b>	<i>Si</i>	2	8.6
	<i>No</i>	21	91.4
<b>Cardiopatía ischemica</b>	<i>Si</i>	1	4.4
	<i>No</i>	22	95.6
<b>Vasculopatía periferica</b>	<i>Si</i>	3	13
	<i>No</i>	20	87
<b>Vasculopatía carotidea rilevata</b>	<i>Si</i>	6	26
	<i>No</i>	17	74

Tabella 10: caratteristiche del tromboembolismo venoso

<b>Dati del TEV</b>		<b>N. paz</b>	<b>%</b>
<b>Tipo di TEV</b>	<i>Unprovoked</i>	14	60.8
	<i>Risk associated</i>	9 (6 estroprogestinico, 3 ipomobilità)	39.2
<b>Familiarità TEV</b>	<i>Si</i>	9	39.2
	<i>No</i>	14	60.8
<b>Trombofilia congenita</b>	<i>Si</i>	2 ( <i>Mutaz fatt V eterozigote</i> )	8.6
	<i>No</i>	21	91.4
<b>Trombofilia acquisita</b>	<i>Si</i>	3	13
	<i>No</i>	20	87
<b>Tipo di trombofilia acquisita</b>	<i>Lac pos</i>	3	13
<b>Assenza/presenza TVP</b>	<i>No TVP</i>	5	21.8
	<i>TVP</i>	13	56.6
	<i>TVD 2 vasi</i>	2	8.6
	<i>TVP arti superiori</i>	3	13
<b>Assenza presenza TEP</b>	<i>EP +</i>	14	60.8
	<i>EP-</i>	9	39.2
<b>Tipologia di TEV</b>	<i>TEP senza TVP</i>	5	21.8
	<i>TVP senza TEP</i>	9	39.2
	<i>TVP e TEP</i>	9	39.2

Tab. 11: dati laboratoristici dei pazienti con TEV

<b>Dati di laboratorio</b>		<b>N paz.23</b>	<b>%</b>	<b>annotazioni</b>
<b>VES*</b>	<i>VES +</i>	14	63.6	<i>1 non disponib</i>
	<i>VES -</i>	8	36.4	
<b>PCR*</b>	<i>PCR+</i>	19	95	<i>3 non disponib</i>
	<i>PCR-</i>	1	5	
<b>Leucocitosi*</b>	<i>Si</i>	9	39.2	
	<i>No</i>	14	60.8	
<b>Anemia*</b>	<i>si</i>	3	13	
	<i>no</i>	20	87	
<b>D-dimero alla diagnosi*</b>	<i>positivo</i>	21	91.4	
	<i>negativo</i>	2	8.6	
<b>D-dimero a 3 mesi*</b>	<i>positivo</i>	19	100	<i>4 non disponibili</i>
	<i>negativo</i>	0		

\*: VES positivo se > 30 mm, PCR positiva se > 5 mg/l; leucocitosi se WBC>10.000/ul, anemia se Hb < 12 g/dl per le femmine e < 13 g/dl per i maschi, d-dimero positivo se superiore a 245 ng/ml.

Dei 23 pazienti con diagnosi di TEV dopo 6 mesi di terapia anticoagulante 18 hanno proseguito la terapia e 5 la hanno sospesa; di questi ultimi, 3 hanno recidivato con un evento trombotico venoso entro 6 mesi dalla sospensione (il 60% dei pazienti che aveva sospeso) e tutti e 3 hanno manifestato la recidiva con un evento di trombosi venosa profonda prossimale.

Ad un solo paziente dei 23 arruolati è stata riscontrata ai follow-up successivi una neoplasia occulta (carcinoma papillare della tiroide). Nella tabella 12 vengono descritte le caratteristiche ecografiche dei 18 pazienti in cui era presente tromboembolismo venoso periferico e dunque valutabile il residuo trombotico ecografico; 5 pazienti presentavano quadro di embolia polmonare senza TVP pertanto non valutabile il RVT. E' stato valutato sulla totalità del gruppo dei pazienti (n 23) il residuo globale significativo al follow-up come descritto nella sezione materiale e metodi.

Tabella 12: Tipo di malattia trombotica residua al follow-up

		<i>N paz. 18 (TVP)</i>	%	
<b>Tipo di residuo (valutazione qualitativa)</b>	<i>Residuo +</i>	15	83	
	<i>Residuo -</i>	3	17	
<b>Tipo di residuo (valutazione quantitativa)</b>	<i>No residuo</i>	3	17	<i>Residuo significativo negativo (&lt; 40% di occlusione)</i>
	<i>Residuo &lt;4mm</i>	4	22	
	<i>Residuo &gt;4 mm e &lt;6 mm</i>	6	33	<i>Residuo significativo positivo (&gt;40% di occlusione)</i>
	<i>occlusione</i>	5	28	
		<b><i>N paz 23 (TVP+TEP)</i></b>		
<b>Residuo globale significativo al follow-up a 3 mesi (ECO + TC/scintigrafia)</b>	<i>no</i>	12	52.2	
	<i>si</i>	11	47.8	

Dalle analisi statistiche è emerso che nei pazienti patologici la differenza di sesso, di emogruppo (emogruppo 0 vs non 0) e la categorizzazione del TEV in “unprovoked” vs “risk associated” non determina variazioni statisticamente significative per tutte le variabili considerate (miRNA, interleuchine, sottopopolazioni linfocitarie, residuo trombotico, VES, PCR, d-dimero).

1) *Al tempo 0* il confronto tra **soggetti patologici** e **soggetti sani** evidenzia un aumento statisticamente significativo nei soggetti patologici di: *IL-8* (Fig. 6), *miRNA 126* (Fig. 7A), *WBC*, numero assoluto di monociti, numero assoluto di linfociti B e linfociti B (CD19+ CD5+), linfociti TREG, linfociti CD4 naive e linfociti CD4 attivati e CD28 totali, NK sottopopolazione CD5-CD16+CD3- (Tab.13).

Tabella 13: valori significativamente aumentati nei soggetti patologici vs sani al T0

	Patologici T0 (media±σ)	Sani To (media±σ)	P value
wbc	7736±2081 cell/ul	6210±1382 cell/ul	0,006
n.monociti	730±306 cell/ul	515±181 cell/ul	0,007
Linf B n ass	324±168 cell/ul	183±77 cell/ul	0,001
N.assCD4attivati totaliCD25+	631±242 cell/ul	474±138 cell/ul	0,011
N.TREG	66±24 cell/ul	50±16 cell/ul	0,018
N.ass.CD4naive	471±240 cell/ul	333±137 cell/ul	0,022
N.ass.CD28+tot	1094±365 cell/ul	774±194 cell/ul	0,001
	<b>Mediana (IQR 25-75)</b>	<b>Mediana (IQR 25-75)</b>	<b>P value</b>
%CD56-CD16+CD3-	0,66 (0,20-1,38)	0,10 (0,06-0,24)	0,000
N.ass CD56-CD16+CD3-	13,11 (5,6-27,9) cell/ul	1,75 (1,15-5,20) cell/ul	0,000
miRNA126	0,026 (0,017-0,069)	0,019 (0,011-0,026)	0,01
IL-8	3,4 (2,4-8,3) pg/ml	2,4 (1,65-3,24) pg/ml	0,045
nCD19+CD5+	39,6 (18,05-62,3) cell/ul	17,3 (8,34-25,97) cell/ul	0,008

Sempre *al tempo 0* dal confronto tra **soggetti patologici** e **soggetti sani** è emersa per le seguenti variabili una significatività statistica con valori ridotti nei pazienti con TEV: sottopopolazione NK CD56+CD16+CD3-, NK totali, CD4-CD8-, linfociti gamma/delta, TNF-alfa (Fig.6, Tab.14).

Tab.14: valori significativamente ridotti nei soggetti patologici vs sani al T0

	Patologici T0 (media±σ)	Sani To (media±σ)	P value
%CD56+CD16+CD3-	5,7±2,1	9,9±6,0	0,004
N.CD56+CD16+CD3-	130±60 cell/ul	176±95 cell/ul	0,05
% NK totali	8±3	11±6	0,05
% CD4-CD8-	5,2±1,8	9,7±3,6	0,005
N.CD4-CD8-	83±27 cell/ul	133±74 cell/ul	0,005
N.GAMMADELTA	20±16 cell/ul	28±22 cell/ul	0,04
	<b>Mediana (IQR 25-75)</b>	<b>Mediana (IQR 25-75)</b>	<b>P value</b>
TNFalfa	5,89(5,18-6,28) pg/ml	6,72(6,16-8,37) pg/ml	0,001

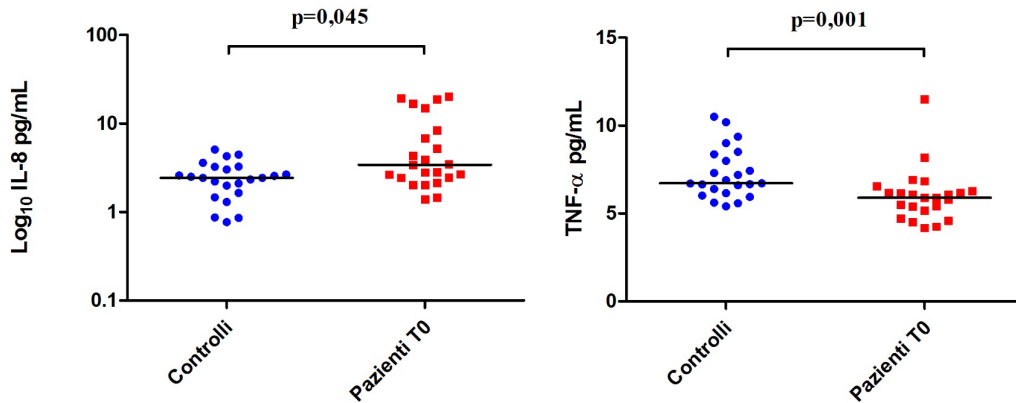


Fig.6: valori di IL-8 e TNF-alfa nel confronto tra il gruppo di soggetti sani e pazienti con TEV al T0

2) Dal confronto *nella popolazione di soggetti patologici* delle variabili studiate al *tempo 0* e al *tempo 1* è emersa una significativa differenza per IL-6 e miRNA 126; tali variabili risultano significativamente aumentate alla diagnosi rispetto al controllo a tre mesi [IL-6 patologici T0 vs patologici T1 espresso come mediana (IQR 25-75): 2,79 (2,43-9,91) pg/ml vs 2,01 (1,18-2,14) pg/ml, U-Mann Whitney,  $p=0,003$  (Fig.8) e miRNA 126 patologici T0 vs patologici T1 espresso come mediana (IQR 25-75): 0,026 (0,016-0,069) vs 0,017(0,014-0,029), U-Mann Whitney,  $p=0,014$ ] (Fig.7B).

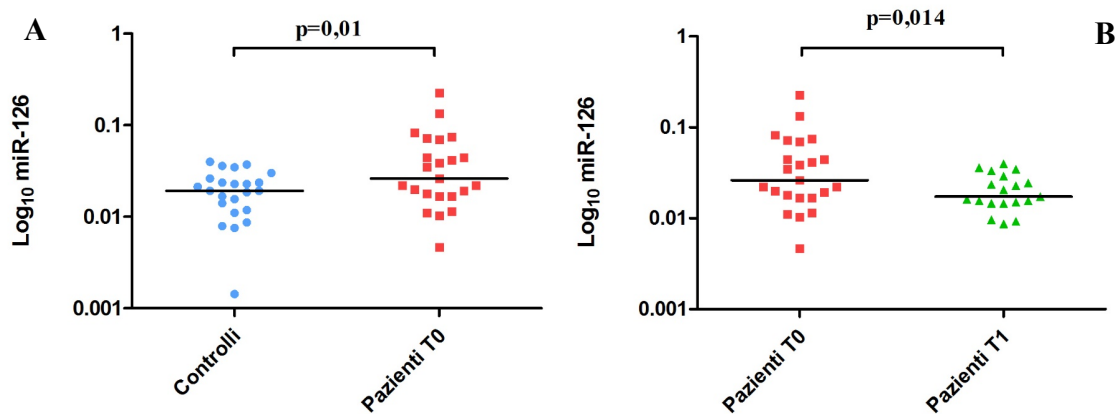


Fig.7: A) confronto per miR 126 tra gruppo dei controlli e pazienti con TEV al tempo 0; B) confronto per miR 126 tra gruppo dei pazienti con TEV al T0 e al T1

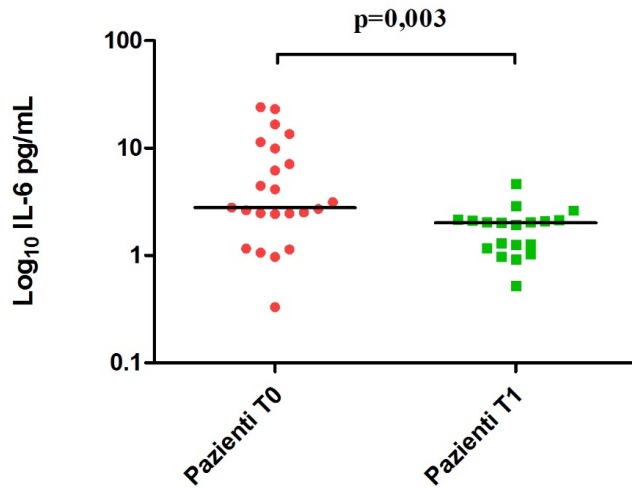


Fig.8: valori di IL-6 nel confronto al T0 e T1 nei pazienti con TEV

3) E' stato valutato se le variabili studiate potessero rappresentare nei soggetti patologici con TEV un possibile biomarcatore predittivo di scarsa risposta alla ricanalizzazione durante terapia anticoagulante confrontando tali variabili in 2 sottopopolazioni distinte di pazienti (pazienti con residuo globale trombotico significativo e pazienti con buona ricanalizzazione). E' emerso come **il miRNA 126** presenti **valori significativamente aumentati al Tempo 0** nei **pazienti con residuo globale complessivo significativo al follow-up strumentale** [miRNA 126 residuo globale significativo vs residuo globale non significativo espresso come mediana (IQR 25-75): 0,044 (0,022-0,082) vs 0,018 (0,012-0,035), U-Mann Whitney,  $p=0,013$ ] (Fig.9), significatività statistica è presente anche nella percentuale di CD4+ attivati totali CD25+ [% CD4 attivati totali CD25 + residuo globale significativo vs residuo globale non significativo espresso come media  $\pm\sigma$ :  $63\pm 17$  vs  $50\pm 9$  t-test  $p 0,04$ ].

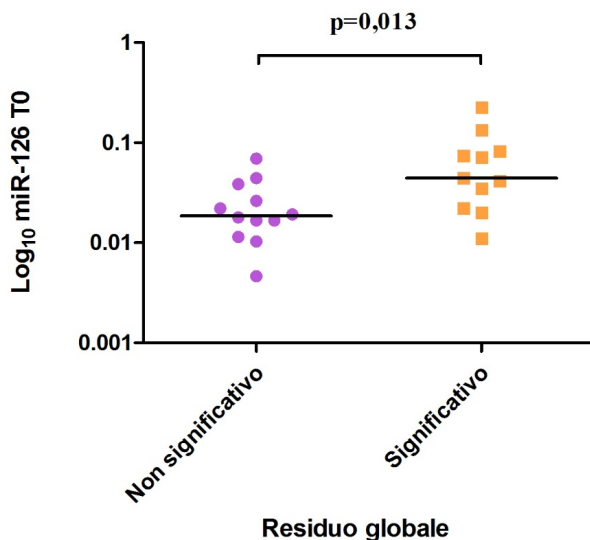


Fig.9: valori di miR-126 T0 nel confronto di pazienti con TEV tra gruppo di soggetti con residuo globale non significativo vs residuo globale significativo



4) E' emersa una correlazione statisticamente significativa tra **miR126** al tempo **T0** e **il valore di residuo trombotico** espresso in mm al **tempo T1** (Rho di Spearman coeff. 0,646 **p: 0,004**). Inoltre, dall'analisi condotta mediante ROC curve è emerso come miR126 possa essere considerato un biomarcatore predittivo "moderatamente accurato" di mancata ricanalizzazione e persistenza di residuo trombotico globale significativo al follow-up a 3 mesi [ $0,7 < AUC < 0,9$  con valore soglia ottimale (best cut off) di **0,03047** con sensibilità e specificità del 75%]. (Fig. 10).

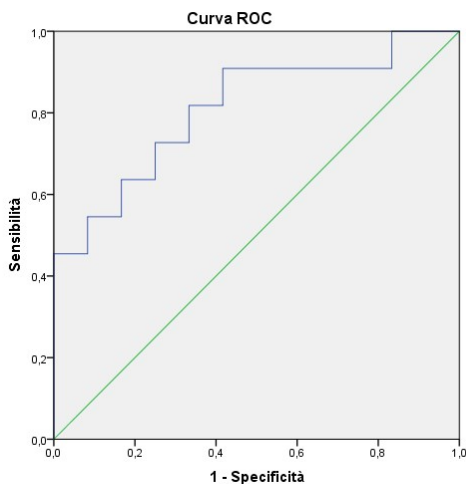


Fig.10: Roc curve per determinare valore soglia di miRNA 126 quale biomarcatore predittivo di scarsa ricanalizzazione globale al follow-up

5) Si dimostra inoltre una significativa riduzione dei valori di miRNA 155 al tempo 1 nei pazienti con residuo significativo **rispetto ai pazienti con residuo globale non significativo** [miRNA 155 residuo globale significativo vs residuo globale non significativo espresso come mediana (IQR 25-75): 0,00010 (0,00008-0,00027) vs 0,00044(0,00023-0,0011), U-Mann Whitney,  $p=0,022$ ] (Fig. 11).

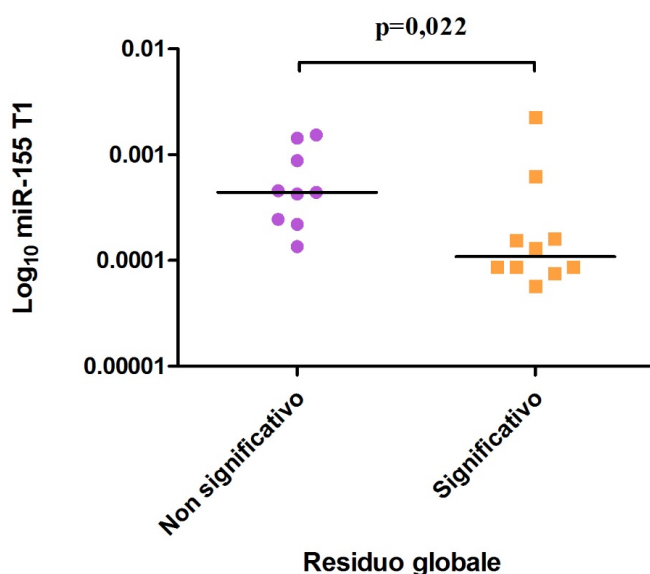


Fig.11: valori di miR-155 T1 nel confronto di pazienti con TEV tra gruppo di soggetti con residuo globale non significativo vs residuo globale significativo

6) Nei pazienti patologici nella distinzione per età <44 anni vs >44 anni è emersa significatività statistica per la variabile del sottogruppo linfocitario di linfociti Vdelta positivi la cui percentuale è aumentata nei soggetti più giovani [% linfociti Vdelta positivi nella popolazione < 44 anni vs >44 anni espressi come media  $\pm\sigma$ :  $70\pm12$  vs  $47\pm28$  t-test,  $p=0,022$ ]

7) Nel gruppo dei pazienti patologici si dimostrano valori di d-dimero significativamente aumentati nel sottogruppo dei pazienti con embolia polmonare (sia con TVP che senza TVP concomitante) vs pazienti senza embolia polmonare [mediana (IQR 25-75): 2028 (807-4250) vs 516 (386-1206) U-Mann Whitney  $p$  0,028]. Dall'analisi condotta mediante ROC curve è emerso come il d-dimero possa essere considerato un biomarcatore predittivo "moderatamente accurato" di TEP sintomatica [ $0,7 < AUC < 0,9$  con valore soglia ottimale (best cut off) di **1094 ng/ml** con sensibilità del 72% e specificità del 78%]. (Fig. 12).

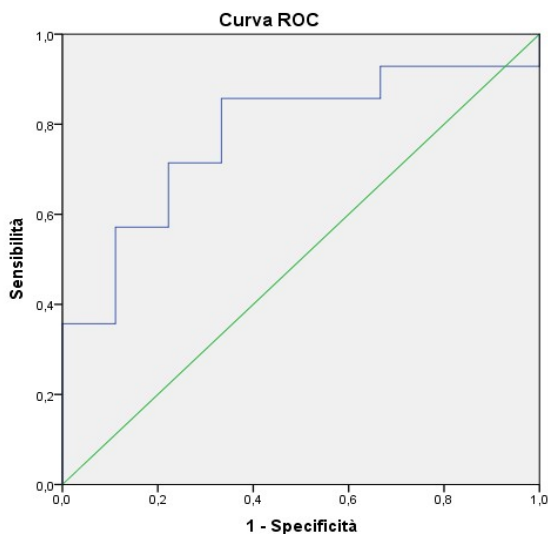


Fig.12: Roc curve per determinare valore soglia di d-dimero quale biomarker predittivo di TEP sintomatica

## 6) Discussione

Dalle analisi effettuate nei pazienti con evento di TEV idiopatico o risk provoked (estrogenico, immobilità), non correlato ad eventi infiammatori cronici o stati di immunomodulazione, è emerso dal confronto con i pazienti sani come l'infiammazione sistemica giochi un ruolo sicuramente attivo nella fase d'esordio di malattia. Ciò si evince dal significativo aumento di IL-8 nei soggetti patologici e dall'aumento di alcune sottoclassi linfocitarie come espresso nei risultati sopra menzionati (linfociti CD4 attivati e linfociti B). La componente maggiormente coinvolta in tale processo del sistema immunitario parrebbe essere quella dell'immunità innata con il sistema monocito-macrofagico [17]. Emerge infatti dai dati dello studio un aumento statisticamente significativo dei monociti nei soggetti patologici. Tale dato ben si correla con i modelli patogenetici attualmente più accreditati che vedono l'attivazione della componente cellulare monocitaria come un elemento caratterizzante le fasi iniziali di formazione del trombo venoso; seguita poi dalla successiva attivazione della cascata coagulativa con "intrappolamento" nella rete fibrinica di piastrine e globuli rossi [18]. Nei soggetti patologici risulta inoltre, in fase acuta, significativamente aumentato (rispetto al controllo a tre mesi) il valore di IL-6 a conferma di uno stato infiammatorio attivo; tale citochina favorisce inoltre l'attivazione e la proliferazione B linfocitaria (sottoclasse risultata statisticamente aumentate nei soggetti patologici all'esordio di malattia).

Dalle analisi è evidente un aumento di linfociti T attivati e Treg nel gruppo di soggetti con TEV rispetto ai soggetti sani e la contemporanea riduzione significativa delle cellule NK; ciò può essere interpretato alla luce di un processo infiammatorio che però non predilige il meccanismo di "Killing" cellulare (operato proprio dalla sottopopolazione di cellule NK) quanto piuttosto un processo di iperattività immunitaria per lo più umorale con rilascio di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e tolleranza immunologica. Il ruolo di regolazione/inibizione operata dai linfociti Treg sulla attività citolitica e cellulo-mediata può essere inquadrato in questa dinamica. Il fatto che il TNF-alfa non sia aumentato nei soggetti con TEV rispetto ai soggetti sani sembra essere a favore di tale ipotesi proprio in ragione del fatto che una delle componenti cellulari maggiormente coinvolta nella produzione di TNF-alfa sia il compartimento delle cellule NK. Quindi dai nostri dati TNF-alfa, contrariamente a quanto riportato da segnalazioni disponibili in letteratura che suggerirebbero un suo possibile ruolo come biomarcatore del TEV, non è risultato essere aumentato in fase acuta rispetto ai controlli sani; anzi i valori basali nei soggetti con primo

evento di TEV si sono dimostrati essere inferiori ai controlli. Tale dato non è di chiara interpretazione, ma dalle nostre valutazioni TNF-alfa non parrebbe essere un valido biomarcatore del TEV. Va considerato inoltre che criteri di esclusione dello studio erano la presenza di patologie acute infettive o immunomodulanti in atto, pertanto i valori di TNF –alfa osservati possono essere in parte giustificati in ragione della popolazione studiata. D'altra parte lo stesso miRNA 126 se up-regolato sembrerebbe, da dati disponibili in letteratura, in grado di ridurre i valori di TNF-alfa concordemente a quanto evidenziato dai dati emersi dal nostro studio [81].

Un dato interessante, non precedentemente descritto in letteratura, è quello sul d-dimero nel confronto tra pazienti con TEV distinguendo un sottogruppo di pazienti con TEP sintomatica da quelli senza embolia polmonare. Dalle analisi emerge la correlazione diretta del valore di d-dimero quale possibile valore predittivo di TEP in paziente con TEV con discreta sensibilità e specificità con valore cut off soglia > di 1094 ng/ml.

Nello studio si voleva inoltre valutare se la presenza di vasculopatia periferica arteriosa, nota o di nuova diagnosi, si correlasse con una peggior prognosi in termini di scarsa ricanalizzazione del trombo venoso, ma i nostri dati non sono in favore di tale ipotesi in quanto non si è rilevata una significatività statistica, nel TEV idiopatico, fra i pazienti che mostravano buona ricanalizzazione rispetto a quelli con residuo significativo.

Un dato importante che si voleva analizzare e che rappresentava un end point primario dello studio era la valutazione di alcuni miRNA noti per avere effetti sul sistema piastrinico/coagulativo/endoteliale quali possibili biomarcatori della patologia venosa: importanti dati sono emersi con altrettante possibili ipotesi di studio.

Il riscontro che bassi valori di miRNA 155 siano presenti in pazienti con scarsa ricanalizzazione globale dei vasi rispetto a pazienti con buona ricanalizzazione può trovare una risposta nel fatto che miR-155 può limitare la produzione di citochine infiammatorie durante la fase tardiva dell'attivazione delle cellule monocitarie e dendritiche; bassi valori quindi si tradurrebbero in una maggiore attivazione infiammatoria persistente [82].

Sicuramente il dato più significativo e maggiormente interessante, seppur controverso, che emerge da tale studio è quello riguardante il miR126. Dibattuto è il ruolo di tale miRNA, maggiori sono le evidenze nella patologia vascolare arteriosa aterosclerotica, dove nei pazienti con ictus ischemico parrebbe essere ridotto rispetto a controlli sani. Nella patologia venosa è stato proposto in alcuni studi selezionati su cavie come possibile molecola in grado di favorire la ricanalizzazione del trombo venoso, terminata la fase acuta, mediante il percorso anti-apoptotico

PI3K / Akt via PIK3R2 [83]. MiRNA 126 è un promotore della rigenerazione endoteliale e probabilmente proprio una sovraespressione di tale miR in fase acuta può rappresentare una “eccessiva risposta riparativa” dell’endotelio. Studi hanno mostrato come una deficienza di tale miRNA si traduca in aumentato rischio emorragico e in un collasso vascolare da mancata capacità nel mantenere l’integrità vascolare in modelli animali [84]. MiR 126 è anche uno dei miRNA quantitativamente più abbondanti nei corpi apoptotici delle cellule endoteliali come segno del danno endoteliale [85].

Contrariamente ad alcuni modelli animali studiati con lo scopo di verificare l’eventuale efficacia del miRNA 126 come possibile fattore di “innesco” per una ricanalizzazione del trombo mediata dalle cellule endoteliali, nello studio in vivo dai noi condotto sembrerebbe essere correlato, se iperespresso in fase acuta, con una più scarsa ricanalizzazione a distanza.

Per la prima volta verrebbe identificato, dai nostri dati, un possibile biomarker sierologico predittivo alla diagnosi di scarsa risposta alla terapia anticoagulante in termini di ricanalizzazione; infatti elevati valori alla diagnosi di tale miR con cut off di valore  $> 0,03047$  si dimostrerebbero moderatamente accurati (con buona sensibilità e specificità) nel predire al follow-up a 3-6 mesi una scarsa ricanalizzazione vascolare.

Tale dato potrebbe gettare possibili interessanti ipotesi bio-molecolari nella patogenesi del trombo venoso e suggerire nuovi scenari di studio proponendo anche eventuali nuovi target terapeutici.

La valutazione di tale miR nella pratica clinica sarebbe in grado di identificare alla diagnosi nei pazienti con TEV idiopatico quella sottoclasse di soggetti in cui la terapia anticoagulante verosimilmente sarebbe meno efficace nella ricanalizzazione precoce, suggerendo un atteggiamento di maggior attenzione nel monitoraggio di patologia; potrebbe anche rientrare come eventuale parametro di valutazione aggiuntivo nella decisione in merito alla durata di terapia.

Per la prima volta verrebbe descritto nel TEV un biomarker sierologico predittivo di risposta alla terapia medica.

Le basi di tale evidenze potrebbero trovare spiegazione proprio nei target di tale miR che sarebbero in grado di modulare l’attivazione delle cellule endoteliale e verosimilmente caratterizzare la morfometria del trombo verso una morfologia con maggiore componente cellulare nucleata e minor componente anucleate (piastrine e globuli rossi) e fibrinica [41]. Uno studio condotto recentemente, con uno scopo apparentemente opposto e cioè verificare se le capacità neoangiogenetiche di tale miR fossero in grado nei topi di favorire la ricanalizzazione

del vaso, ha mostrato come i topi che venivano esposti a miR 126 esogeno nella fase di ricanalizzazione presentavano alla valutazione anatomo-patologica del trombo una struttura citometrica differente da quelli non esposti. La componente cellulata del trombo era aumentata nei topi esposti al miR. Livelli aumentati di miR-126-3p nei topi (corrispondente al mir126 umano) sembrerebbero stimolare d'altra parte interazioni intercellulari tra la matrice perivascolare e le cellule endoteliali per mantenere l'omeostasi endoteliale tramite la fosforilazione di ERK1/2 ed aumento di Tlr3 [86].

Forse proprio la differente struttura morfometrica del trombo, determinata da varie componenti tra cui miRNA potrebbe essere la ragione di risposte anche differenti alle tradizionali terapie anticoagulanti che sono in grado di agire maggiormente sulla componente di riassorbimento fibrinolitico spontaneo bloccando la cascata coagulativa, ma meno efficaci nell'agire sulla frazione cellulare del trombo.

Nuovi sforzi sono sicuramente fondamentali per chiarire meglio le componenti morfometriche del trombo e le possibili molecole in grado di modulare le varie componenti strutturali e micromolecolari del trombo condizionanti anche la risposta alla terapia.

Il ruolo di miRNA 126 va sicuramente chiarito anche in considerazione di dati controversi ed in parte contrastanti se si confrontano dati in vivo rispetto ai modelli animali su cavia; la ragione delle differenze registrate in parte potrebbe risiedere proprio nel meccanismo intrinseco di tale miRNA (attivazione/inibizione della risposta endoteliale) e della sua possibile risposta "esagerata" allo stimolo.

I dati emersi da tale studio suggeriscono inoltre un atteggiamento di prudenza nel ritenere i miRNA come possibili target terapeutici in considerazione delle numerose attività e bersagli che sono in grado di modulare (in modo a volte controverso e paradossalmente opposto) a seconda dello stato infiammatorio in cui l'organismo si trova e nelle condizioni in cui con altre molecole mutualmente vengono ad interagire.

## **PROSPETTIVE**

Sicuramente risulta importante aumentare la numerosità della casistica per confermare la significatività dei dati attualmente emersi e permettere eventuali analisi multivariate.

Interessante sarebbe soprattutto per i dati linfocitari valutare la sieroprevalenza del CMV nei soggetti sani e patologici per verificare l'eventuale impatto che può avere l'infezione latente-cronica del virus citomegalico nell'eventuale processo di immunotrombosi correlandolo ai dati di immunotipizzazione linfocitaria. Il dato riguardante i linfociti Vdelta positivi diminuiti nei

soggetti > 44 anni potrebbe trovare una spiegazione nelle valutazioni di sieroprevalenza del CMV che è noto ridurre tale sottogruppo di linfociti e che si dimostra prevalentemente diffuso nelle fasce di età più elevate. Il fatto che tale differenza sia significativa nei pazienti con TEV ma non nei pazienti sani potrebbe fare ipotizzare una prevalenza del CMV proprio nei soggetti con TEV.

In merito al miRNA 126 interessanti prospettive di indagine scientifica andrebbero rivolte a confermare l'ipotesi di un possibile ruolo di tale miR nel modificare la morfometria del trombo e quindi modificare la storia naturale dell'evoluzione della malattia. Lo studio in vivo rappresenterebbe una conferma importante ed esempio:

- nell'uomo utilizzando valutazioni ecografiche con modulo elastografico per determinare l'eventuale differenza morfologica del trombo all'esordio di malattia in fase acuta.
- in modelli animali su topo, valutando il dato anatomico-patologico e morfometrico del trombo per identificare un potenziale effetto di rimodellamento da parte del miR nella composizione del trombo stesso.





## Bibliografia

- 1 Di Nisio M, et al. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Lancet* 2016 Dec 17;388(10063):3060-3073.
- 2 Stacy A. et al Pathogenesis, diagnosis, and treatment of venous Thromboembolism in older adult. *JAGS*, 2016;64:1869-1878
- 3 Murin S, et al. Comparison of outcomes after hospitalization for deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 2002; 88: 407-14
- 4 Geersing GJ, et al. Exclusion of deep vein thrombosis using the Wells rule in clinically important subgroups: individual patient data meta-analysis. *BMJ* 2014; 348: g1340
- 5 Value of the ventilation/perfusion scan in acute pulmonary embolism. Results of the Prospective Investigation of Pulmonary Embolism Diagnosis (PIOPED). The PIOPED Investigators. *JAMA* 1990; 263: 2753-9
- 6 Mackman N, et al. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest* 2012; 122: 2331–2336.
- 7 Van der Poll T, et al. Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects. *J Exp Med* 1991; 174: 729–732.
- 8 Johnson SA, et al. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Venous Thromboembolism in Older Adults. *J AM Geriatr SOC*. 2016 SEP;64(9): 1869-78
- 9 Bounameaux H, et al. Factor V leiden paradox: risk of deep vein thrombosis but not of pulmonary embolism. *Lancet*. 2000;356:182-183.
- 10 Rosendaal F.R. et al. Causes of venous Thrombosis. *Thrombosis journal* 2016, 14 (suppl1):24;117-121
- 11 Franchini M, et al. ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost*. 2014 Dec;112(6):1103-9
- 12 Hickey. M,J, et al. Intravascular immunity: the host –pathogen encounter in blood vessel. *Nature REV. Immunol.* (2009); 9,364-375
- 13 Battinelli E.M, et al. Delivering new insight into biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr. Opin.Hematol.* (2007)14,419-426
- 14 Esmon C.T. et al. The interactions between inflammation and coagulation. *BR. J. Haematol.* (2005); 131:417-430.
- 15 Coughlin S.R, et al. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb.Haemost*.3,1800-1814 (2005)
- 16 Furie, B et al. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl.J. Med.*359,938-949 (2008)
- 17 Von Bruhl, M.L et al Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp.Med.* 209, 819-835 (2012)
- 18 Ley,K. et al. Getting to the side of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev. Immunol.* 7,678-689 (2007)
- 19 Niessen, F. et al. Dendritic cell PAR1–S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature* 452, 654–658 (2008).
- 20 Darbousset, R. et al. Tissue factor positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 120, 2133–2143 (2012).
- 21 Fuchs, T.A. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 15880–15885

(2010)

- 22 Zinsser, H.H. et al. Experimental study of physical factors, including fibrin formation, influencing the spread of fluids and small particles within and from the peritoneal cavity of the dog. *Ann. Surg.* 136, 818–827 (1952).
- 23 Massberg, S. et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature Med.* 16, 887–896 (2010)
- 24 Verschoor, A, et al. A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nature Immunol.* 12, 1194–1201 (2011)
- 25 Semple, J.W., et al. Platelets and the immune continuum. *Nature Rev. Immunol.* 11, 264–274 (2011)
- 26 Luo D. et al. Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J.Immunol.* 187, 1866–1876 (2011).
- 27 Sun, H. et al. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. *Science* 305, 1283–1286 (2004)
- 28 Ye R, et al. Circulating tissue factor positive microparticles in patients with acute recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Res.* 2012 Aug;130(2):253-8
- 29 Ambros V, et al. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):350-5
- 30 Lee Y, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, vol.23, n°20, Ottobre 2004, pp.4051–60
- 31 Wang XJ, et al. Prediction and identification of Arabidopsis thaliana microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol.*, vol.5, n°9, 2004, pp.R65.
- 32 Kawasaki H, et al. MicroRNA-196 inhibits HOXB8 expression in myeloid differentiation of HL60 cells, in *Nucleic Acids. Symp Ser*, 2004(48) pp.211–2.
- 33 Moxon S, et al. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome Res* (2008) vol.18, n°10
- 34 Mazière P, et al. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today.* 2007 Jun;12(11-12):452-8.
- 35 Williams AE, et al. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008 vol.65,545–62
- 36 Qin J et al. A panel of microRNAs as a new biomarkers for the detection of deep vein thrombosis. *J Thromb Thrombolysis.* 2015 Feb;39(2):215-21.)
- 37 Mo J.et al. MicroRNA-195 regulates proliferation, migration, angiogenesis and autophagy of endothelial progenitor cells by targeting GABARAPL1. *Biosci Rep.* 2016 Oct 14;36(5).
- 38 Shira Landskroner-Eiger et al. miRNAs as Modulators of Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Feb; 3(2)
- 39 Jason E. Fish.et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell.* 2008 Aug; 15(2): 272–284.
- 40 Wang S. et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell.* 2008 Aug;15(2):261-71)
- 41 Meng Q. et al. Upregulation of MicroRNA-126 Contributes to Endothelial Progenitor Cell Function in Deep Vein Thrombosis via Its Target PIK3R2. *J Cell Biochem.* 2015 Aug;116(8):1613-23).
- 42 Long G. et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurology* 2013, 13:178

- 43 Ten Cate H. et al. MicroRNA and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2016 Aug 1;116(2):205
- 44 Montes-Worboys et al. A Residual thrombosis after a first episode of proximal deep venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013 Jun;24(4):335-60.
- 45 Zapponi KC. et al. Increased adhesive properties of neutrophils and inflammatory markers in venous thromboembolism patients with residual vein occlusion and high D-dimer levels. *Thromb Res.* 2014 May;133(5):736-42).
- 46 Moss P, et al The emerging role of cytomegalovirus in driving immune senescence: a novel therapeutic opportunity for improving health in the elderly. *Curr Opin. Immunol.* 2010;22:529-534
- 47 Vescovini R. et al. Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects. *J Immunol.* 2007; 179:4283-4291
- 48 Popović M et al. Human cytomegalovirus infection and atherothrombosis. *J Thromb Thrombolysis.* 2012 Feb;33(2):160-72.
- 49 Paran Y et al. Thrombosis following acute cytomegalovirus infection: a community prospective study. *Ann Hematol.* 2013 Jul;92(7):969-74.
- 50 Abgueguen P et al. Vascular thrombosis and acute cytomegalovirus infection in immunocompetent patients: report of 2 cases and literature review. *Clin Infect Dis.* 2003 Jun 1;36(11):E134-9.
- 51 Tichelaar VY et al. Active cytomegalovirus infection in patients with acute venous thrombosis: a case-control study. *Am J Hematol.* 2011 Jun;86(6):510-2
- 52 Atzmony L et al. Incidence of cytomegalovirus-associated thrombosis and its risk factors: a case-control study. *Thromb Res.* 2010 Dec;126(6):e439-43.
- 53 Lijfering WM et al. Possible contribution of cytomegalovirus infection to the high risk of (recurrent) venous thrombosis after renal transplantation. *Thromb Haemost.* 2008 Jan;99(1):127-32.
- 54 Paran Y et al. Venous thromboembolism and cytomegalovirus infection in immunocompetent adults. *Isr Med Assoc J.* 2007 Oct;9(10):757-8.
- 55 Assinger A., et al. Human cytomegalovirus-platelet interaction triggers toll-like receptor 2-dependent proinflammatory and proangiogenic responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Apr;34(4):801-9.
- 56 Lihi Atzmon et al. Incidence of Cytomegalovirus-associated thrombosis and its risk factors: A case-control study. *Thrombosis Research Volume 126, Issue 6, December 2010, Pages e439–e443.*
- 57 Schambeck CM, et al. Venous thromboembolism and associated high plasma factor VIII levels: linked to cytomegalovirus infection? *Thromb Haemost.* 2000 Mar;83(3):510-1.
- 58 Delbos V. et al. Acute cytomegalovirus infection and venous thrombosis: Role of antiphospholipid antibodies. *Journal of Infection.* Volume 54, Issue 1, January 2007, Pages e47-e5.
- 59 Vescovini R et al. Naïve and memory CD8 T cell pool homeostasis in advanced aging: impact of age and of antigen-specific responses to cytomegalovirus. *Age* 2014 Apr; 36(2): 625-40. )
- 60 Schimansk S. et al. Cytomegalovirus infection is associated with venous thromboembolism of immunocompetent adults—a case–control study. *Ann Hematol* (2012) 91:597–604
- 61 Bruzelius M et al. PDGFB, a new candidate plasma biomarker for venous thromboembolism: results from the VEREMA affinity proteomics study. *Blood.* 2016 Dec 8;128(23):e59-e66.
- 62 Vedovetto V. et al. Residual vein thrombosis and trans-popliteal reflux in patients with and without the post-

thrombotic syndrome. *Thromb Haemost.* 2013 Oct;110(4):854-5.

- 63 Erai L. et al. Insufficient Recanalization of Thrombotic Venous Occlusion-Risk for Postthrombotic Syndrome. *J Vasc Interv Radiol.* 2017 Jul;28(7):941-944
- 64 Prandoni P. et al. Residual vein thrombosis and serial D-dimer for the long-term management of patients with deep venous thrombosis. *Thromb Res.* 2017 Jun;154:35-41.
- 65 Pasavento R. et al. Impact of residual pulmonary obstruction on the long-term outcome of patients with pulmonary embolism. *Eur Respir J.* 2017 May 25;49(5).
- 66 Staszal T et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Pol Arch Med Wewn.* 2011 Oct;121(10):361-6.
- 67 Urbich C et al. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2008 Sep 1;79(4):581-8.
- 68 Teruel-Montoya R. et al. MicroRNAs in Haemostasis. *J Thromb Haemost.*2014 Nov 14. doi: 10.1111/jth.12788.
- 69 Shen N, et al. MicroRNAs--novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 701-9.
- 70 Calin GA, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99: 15524-9.
- 71 Iorio MV et al. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1126-33.
- 72 Bartel DP, et al. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 2004;5: 396-400.
- 73 Grimson A, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007; 27: 91-105.
- 74 Lai EC et al. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 2002;30: 363-4.
- 75 Lewis BP et al Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets). *Cell* 2005; 120: 15-20.
- 76 Dudda JC et al. MicroRNA-155 is required for effector CD8<sup>+</sup> T cell responses to virus infection and cancer. *Immunity.* 2013 Apr 18;38(4):742-53.
- 77 Romania P, et al. MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors. *Br J Haematol* 2008; 143: 570-5
- 78 Olive V et al. mir-17-92 A cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug;42(8):1348-54.
- 79 Prandoni P, et al. Residual venous thrombosis as a predictive factor of recurrent venous thromboembolism. *Ann Intern Med.* 2002;137:955-60.
- 80 Prandoni P, et al. A simple ultrasound approach for detection of recurrent proximal-vein thrombosis. *Circulation.* 1993;88:1730-5.
- 81 Menghini R. et al. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis. *Ageing Res Rev.* 2014 Sep;17:68-78.
- 82 Ceppi, Met al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2009). 106,2735-2740.
- 83 Chen L. et al MiR-126 inhibits vascular endothelial cell apoptosis through targeting PI3K/Akt signaling. *Ann*

*Hematol (2016) 95:365–374.*

- 84 Nicolik I. et al. EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance. *J Angiogenes Res.* 2010 Jun 8;2(1):9.
- 85 Zernecke A, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009; 2(100):ra81.
- 86 Pitzler L et al. miR-126-3p Promotes Matrix-Dependent Perivascular Cell Attachment, Migration and Intercellular Interaction. *Stem Cells.* 2016 May;34(5):1297-309.



## **Ringraziamenti**

**Un grazie alla mia famiglia, a mio figlio Francesco che è la ragione di ogni mio sforzo, alla mia compagna Federica che sempre mi è stata vicino e che come la vita rappresenta l'impegno, le difficoltà, la crescita ma soprattutto la felicità e un progetto di vita. Un grazie ai miei genitori che da sempre sono per me un riferimento, forza ed un esempio a cui ispirarsi.**

**Un grazie al Prof Mutti, al Dott. Quintavalla, al Prof. Sansoni, a Rosanna, a Paola, Rossella, Silvana e Matteo che in questo studio mi hanno aiutato, sostenuto dedicato tempo ed insegnato sempre qualcosa di nuovo.**

**Un grazie a Lorenza ed Ignazio che con le loro corse mi hanno aiutato nei reclutamenti per incastrare gli impegni di lavoro con le scadenze improrogabili che la ricerca impone**

**Un grazie al tempo ... che ci da l'opportunità di riflettere, crescere, a volte rammaricarsi ma soprattutto ci da la possibilità di mettersi alla prova e cimentarsi in ciò in cui si crede ...**