

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI E GERONTOLOGICHE

XXXIII Ciclo
(Anni 2018-2021)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

**L'INVECCHIAMENTO RIDUCE LA PRODUZIONE
DEL BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR
(BDNF) E L'INNERVAZIONE AUTONOMICA
CARDIACA NEL CUORE**

TUTOR/RELATORE

Chiar.mo
Prof. *Nicola Ferrara*

CANDIDATO/A

Dott. Dott. *Andrea Elia*

Indice

Introduzione	pag. 5
Scopo dello studio	pag. 10
Materiali e metodi	pag. 11
Risultati	pag. 20
Discussione e Conclusioni	pag. 23
Figure e Tabelle	pag. 26
Bibliografia	pag. 43

SOMMARIO

Introduzione: l'invecchiamento porta ad un aumento dei livelli di catecolamine circolante che contribuiscono alla disfunzione del recettore adrenergico cardiaco e alla sua desensibilizzazione. Nel cervello, i fattori neurotrofici, in particolare il brain-derived neurotrophic factor (BDNF), promuovono il benessere dei neuroni, quindi funzionano, incluso il riassorbimento dei neurotrasmettitori vitali per la comunicazione sinaptica.

Scopo: In questo lavoro di tesi, abbiamo testato se nel cuore senile, una riduzione dell'innervazione autonoma, insieme alle neurotrofine associate, potesse comportare una perdita nel controllo autonomo della funzione miocardica e nello spillover delle catecolamine.

Metodi: Abbiamo usato ratti Fisher giovani (3 mesi; n=10) e anziani (24 mesi; n=11) e cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y).

Risultati: Rispetto ai ratti giovani, quelli anziani mostrano una marcata riduzione della densità complessiva delle fibre nervose autonome, che colpisce sia i compartimenti simpatici che colinergici, secondo la colorazione immunostochimica con dopamina β -idrossilasi ($d\beta h$) e del trasportatore di acetilcolina vescicolare (VaChT). L'analisi immunoblot eseguita nei lisati di ventricolo sinistro dei ratti anziani ha anche rivelato una pronunciata sottoregolazione dei fattori GAP-43 e di BDNF. Successivamente, abbiamo cercato di determinare se l'invecchiamento compromette la capacità autocrina delle fibre autonome. A tal fine, abbiamo stimolato le cellule SH-SY5Y in vitro con siero ottenuto da sangue periferico dei ratti giovani o degli anziani. Entrambi i sieri aumentavano la neuritogenesi delle SH-SY5Y (saggiata tramite saggio cristallo violetto); tuttavia, questo effetto risultava notevolmente ridotto in cellule coltivate con siero di ratti anziani; e in queste stesse cellule, è stato evidente un marcato calo sia dei livelli GAP-43 che BDNF rispetto a quelli trattati con siero di ratto giovane.

Conclusione: L'invecchiamento favorisce un depauperamento

generale delle fibre autonome, e la mancanza di BDNF neuronale probabilmente contribuisce a questa perdita quantitativa e qualitativa.

1. INTRODUZIONE

L'invecchiamento fisiologico può essere definito come un complesso meccanismo multifattoriale caratterizzato da una progressiva disfunzione multiorgano e graduale perdita delle capacità funzionali residue nei processi biologici, fisiologici, comportamentali e sociali ed è associato ad un aumentato rischio di morbilità e mortalità [1]. È importante sottolineare che, sebbene questi cambiamenti legati all'età siano generalmente benigni (ad esempio, capelli brizzolati) altri si traducono in un progressivo decadimento che coinvolge diversi distretti con sensibile incremento della fragilità, disabilità e conseguenziale aumento della suscettibilità e frequenza di processi patologici [2-3]. Per tale motivo quindi, l'invecchiamento costituisce un fattore di rischio rilevante in numerosi disturbi cronici riscontrati nell'uomo [4]. In particolare, le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte, ospedalizzazione, disabilità con relativo incremento dei costi sanitari in tutto il mondo [5-6]. Dunque alla luce di quanto esposto, innovative strategie terapeutiche e nuovi promettenti target farmacologici risulterebbero necessari al fine di ridimensionare l'onerosa e gravosa spesa sanitaria.

È importante sottolineare che il cuore del paziente anziano è caratterizzato da una serie di alterazioni morfologiche ed anatomiche quali ipertrofia ventricolare sinistra, dilatazione atriale e delle cavità ventricolari e

calcificazione delle valvole e delle arterie coronarie [7-9]. Tali modificazioni, si accompagnano a sostanziali alterazioni funzionali che si rendono più evidenti sotto sforzo: diminuzione della riserva funzionale e della frequenza cardiaca massima, deterioramento del sistema di conduzione, aumento del post-carico e compromissione della funzione diastolica [10]. Diversi studi inoltre, hanno dimostrato l'impatto dell'invecchiamento sull'alterazione dell'omeostasi di diversi sistemi neuro-ormonali, tra i quali il sistema nervoso simpatico (SNS). Il graduale rimodellamento dell'attività del SNS caratterizzato dall'incremento delle catecolammine circolanti risulta essere associato all'insorgenza di numerose patologie cardiache età-correlate quali lo scompenso cardiaco (SC). La sostenuta e protratta iperattività simpatica, comporta inoltre, un progressivo deterioramento del signaling dei recettori β -adrenergici (β AR) cardiaci [11] con conseguente alterazione del signaling adrenergico cellulare e della capacità contrattile, portando ad un rimodellamento cardiaco disadattivo con aumento dell'apoptosi, dell'infiammazione, della fibrosi interstiziale e dell'ipertrofia. Questi fenomeni sono stati ampiamente descritti ed osservati in pazienti affetti da SC, in cui è stata riscontrato una significativa riduzione della componente adrenergica nel tessuto miocardico [12] con sensibile riduzione della quota delle catecolammine [13-14] e pertanto, conseguenziale peggioramento della funzione cardiaca ed aumento della mortalità.

Dunque, è ragionevole ipotizzare che il sensibile incremento dell'attività adrenergica correlato all'avanzare dell'età contribuisca significativamente ad una progressiva denervazione miocardica e, parallelo aumento della mortalità cardiovascolare, osservato nella popolazione anziana [15-16]. Tuttavia, nonostante i numerosi risultati emersi dalla ricerca clinica e molecolare condotti sul cuore dei soggetti anziani, i meccanismi sottostanti all'incremento dell'attività adrenergica sistemica età- correlata ed i suoi effetti sulla funzionalità miocardica ed il sistema nervoso autonomo cardiaco (ANS) non sono stati però ancora pienamente chiariti. Infatti, diversi studi hanno valutato solo indirettamente lo stato dell'ANS nel cuore dei soggetti anziani, misurando i livelli di noradrenalina circolante o mediante ^{123}I -metaiodobenzilguanidina (^{123}I -MIBG) [17].

La MIBG è un derivato dell'urea farmacologicamente inattivo che, simile alla noradrenalina, viene assorbito tramite il meccanismo di trasporto della norepinefrina umana, immagazzinato in vescicole e secreto in risposta a una varietà di stimoli [18-22]. La MIBG può essere marcata con iodio radioattivo (più comunemente ^{123}I Iodio) per diventare ^{123}I -MIBG, ed è assorbita dalle terminazioni nervose postgangliari, presinaptiche [23-27].

La MIBG radiomarcata è considerata un noto agente di imaging dei neuroni simpatici, utile per studiare gli organi che sono riccamente innervati dal sistema nervoso simpatico [24-27]. Dopo la depolarizzazione, la MIBG viene rilasciata nello spazio sinaptico, in maniera simile alla

noradrenalina, ma non viene metabolizzata [24-27]. È stato dimostrato che l'assorbimento di ^{123}I -MIBG è correlato all'innervazione adrenergica [24, 26-27]. Pertanto, la scintigrafia ^{123}I -MIBG rivela non solo la presenza di innervazione noradrenergica ma anche la sua capacità funzionale [18]. Tuttavia nonostante queste informazioni, il processo di rimodellamento dell'ASN nel cuore senile richiede ulteriori approfondimenti.

Inoltre, è importante sottolineare che fattori neurotrofici come il brain-derived neurotrophic factor (BDNF) e il nerve growth factor (NGF) sono fattori coinvolti nel differenziamento, sviluppo e maturazione delle cellule neuronali [28-29, 38]. Queste molecole vengono rilasciate dal tessuto bersaglio innervato con effetti paracrini e autocrini, regolando la sopravvivenza dei neuroni [28], contrastando l'apoptosi cellulare e risultano anche coinvolti nel differenziamento delle cellule progenitrici. I fattori neurotrofici sono una famiglia di biomolecole, principalmente peptidi o piccole proteine che supportano la crescita, la sopravvivenza e la differenziazione dei neuroni in via di sviluppo e maturi. La maggior parte delle neurotrofine [30] esercitano i loro effetti trofici sui neuroni attraverso il signaling della tirosin chinasi (Trk) [31]. Inoltre nel sistema nervoso maturo, questi neuropeptidi stimolano la sopravvivenza neuronale [32], inducono la plasticità sinaptica [33] e modulano la formazione della memoria a lungo termine. In particolare, le neurotrofine stimolano la crescita iniziale e lo sviluppo dei neuroni nel sistema nervoso centrale e

periferico [34] ed alcune di esse, vengono rilasciate dal tessuto bersaglio per modulare la crescita degli assoni in via di sviluppo. Inoltre, è stato dimostrato che questi fattori sono coinvolti nella regolazione fisiologica e patologica del sistema cardiovascolare [35-36]. Ad esempio, studi precedenti hanno descritto un ruolo cruciale per BDNF e NGF nel corretto sviluppo e nella funzione cardiaca [37-38]. Infine, è stato dimostrato che la riduzione dell'espressione di questi marcatori neurotrofici costituisce un importante fattore nella progressione e declino della funzionalità cardiaca e del rimodellamento maladattativo [39-40].

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'invecchiamento si associa ad un rimodellamento del sistema nervoso autonomo, probabilmente anche come risposta compensatoria delle modificazioni morfo-strutturali dei diversi organi ed apparati, portando così ad una progressiva denervazione periferica. Diversi studi clinici hanno inoltre dimostrato, come le alterazioni del ANS del cuore possano essere conseguenza di numerose patologie cardiache e non cardiache. Tuttavia, l'alterazione dell'anatomia dell'innervazione del cuore correla con la progressiva disfunzione dell'attività cardiaca e si associa a fenomeni aritmogenetici osservati in diverse condizioni morbose quali l'infarto del miocardio acuto (IMA) e lo SC. Pertanto, tale studio si propone di indagare gli effetti dell'invecchiamento fisiologico sulla rete nervosa cardiaca ed il suo impatto sulle neurotrofine, in particolare NGF e BDNF.

3. MATERIALI E METODI

Modello animale e disegno sperimentale

Tutti gli esperimenti e i protocolli sugli animali sono stati eseguiti secondo le linee guida del Comitato Istituzionale per la cura e l'uso degli animali dell'Università Federico II di Napoli, Italia. Ratti Fisher maschi di 3 mesi (gruppo giovane, N = 10) e 24 mesi (gruppo anziano, N = 11) sono stati acquistati dal Jackson Research Laboratory (Bar Harbor, ME) e lasciati acclimatare per 10 giorni alle condizioni standard proposte dal comitato locale per la cura ed il benessere degli animali.

Valutazioni istologiche

Dopo l'eutanasia, i campioni cardiaci espuntati sono stati pesati e fissati in paraformaldeide al 4% (Sigma, St. Louis, MO, USA) ed inclusi in paraffina. In seguito, sono stati sottoposti a taglio con microtomo, ottenendo sezioni dello spessore di 5 μ m, che sono poi state deparaffinate ed idratate in serie alcolica decrescente.

Fibrosi

Per la valutazione della percentuale di fibrosi interstiziale e l'area d'infarto, sezioni di ventricolo sinistro sono state sottoposte ad una colorazione con l'1% di Sirius Red (rosso sirio) in acido picrico (Sigma

Aldrich, St. Louis, Missouri). In seguito, le sezioni istologiche sono state lavate e disidratate mediante passaggio in etanolo assoluto (100%, per tre volte) e soluzione di deparaffinazione (histolemon). Infine, sono state montate per la visualizzazione al microscopio. Per ogni sezione istologica sono state acquisite 5 immagini utilizzando un microscopio Motic® BA410 [41].

La percentuale di area fibrotica è stata calcolata tramite il software ImageJ come rapporto tra l'estensione in mm² dell'area infartuata rispetto all'area totale.

Densità capillare

La lectina biotinilata di *Bandeiraea Simplicifolia* (Sigma, St. Louis, MO) ed il sistema di amplificazione del segnale con Tiramide (TSA-Biotin System Kit, Perkin Elmer Life Sciences, MA) sono stati utilizzati per valutare la densità capillare. In particolare, la lectina biotinilata svolge un ruolo fondamentale legandosi in maniera altamente specifica alle glicoproteine presenti sulla superficie delle cellule endoteliali umane, consentendo così di discriminare questa tipologia di cellule dagli altri citotipi. Le sezioni dei cuori di ratto sono state incubate per 20 minuti con perossido di idrogeno (H₂O₂) al 3%, al fine di favorire il quenching delle perossidasi endogene, e successivamente lavate per 5 minuti in PBS 1X. Dopo aver trattato i campioni con buffer TNB (0,1 M Tris-HCl, 0,15 M

NaCl, 0.05% di Tween®) agitandoli per 30 minuti a temperatura ambiente, gli stessi sono stati incubati con lectina biotinilata (1:100 in TNB) agitandoli per un'ora a temperatura ambiente. Dopo gli opportuni lavaggi, le sezioni sono state incubate, sia prima che dopo trattamento con biotinil-tiramide (reagente di amplificazione del segnale), con streptavidina coniugata alla perossidasi del rafano (HRP). Il segnale specifico di legame alle cellule endoteliali dei capillari è stato analizzato mediante rilevazione con Streptavidina-Perossidasi, trattata per 30 secondi con il substrato cromogenico DAB (di-aminobenzidina).

La densità vascolare (intesa come numero di vasi per mm²) è stata valutata mediante metodica planimetrica, che prevede l'impiego di un reticolo-test inserito nell'oculare di un microscopio ottico [42].

Pertanto, per ogni sezione istologica sono state acquisite 5 immagini utilizzando un microscopio Motic® BA410.

Ipertrofia cardiaca

Per valutare l'ipertrofia cardiaca, sezioni di ventricolo sinistro di 5 µm di ciascun gruppo sperimentale sono state colorate con 5 µg/ml di agglutinina del germe di grano (WGA; # W834, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stati Uniti) [43]. L'agglutinina del germe di grano (WGA) coniugata a specifici fluorocromi, si lega selettivamente ai residui di N-acetilglucosamina e acido N-acetilneuraminico (acido sialico) sulle

glicoproteine della membrana plasmatica, consentendo di identificare e riconoscere i confini ed i margini cellulari.

Successivamente, le sezioni cardiache sono state reidratate, lavate con PBS, permeabilizzate in PBS-Triton (0,1%) ed incubate a 37°C per 20 min. Infine, dopo ulteriori lavaggi in PBS 1X, i vetrini coprioggetto contenenti le sezioni marcate sono stati montati con balsamo acquoso 4',6'-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) ed osservati al microscopio a fluorescenza. Le immagini fluorescenti sono state acquisite utilizzando ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad). Per ogni campione sono stati selezionati in modo casuale cinque campi per sezione e sono stati calcolati un totale di 50 cellule/per ratto dalle cinque aree (10 cellule/area). Il diametro medio dei cardiomiociti (μm) è stato misurato per valutare l'ipertrofia cardiaca mediante il software ImageJ.

Innervazione cardiaca

La valutazione dell'innervazione cardiaca è stata effettuata mediante tecnica d'immunofluorescenza indiretta.

I campioni cardiaci sono stati fissati per una notte nella soluzione fredda di Zamboni (paraformaldeide al 2% ed acido picrico) a 4°C, quindi crioprotetti con il 20% di saccarosio in PBS per 24 ore a 4°C e sezionati (sezioni di 20 μm di spessore) mediante microtomo a freddo scorrevole (Leica 2000R, Germania). Le sezioni sono state colorate tramite il metodo

di immunofluorescenza indiretta ed incubate per tutta la notte a 4°C con anticorpi primari anti-dopamina β-idrossilasi (DβH; 39600506- Bio- Rad 1: 150) per identificare le fibre nervose adrenergiche e l'anticorpi policlonale contro il trasportatore vescicolare dell'acetilcolina (VaChT; H-V007 - Phoenix Pharmaceuticals.Inc.1: 400) al fine di marcare le terminazioni nervose parasimpatiche. La maggior parte delle fibre nervose cardiache mostrava una disposizione regolare lungo i cardiomiociti [44-45]. Le fibre nervose cardiache sono state calcolate utilizzando una griglia quadrata con 24 reticoli (area 1 cm² per ciascuna) sovrapposte alle immagini digitali acquisite mediante microscopio confocale non laser (sistema confocale Apotome; Zeiss, Oberkochen, Germania) con obiettivo 20X. Per ogni campione sono state scelte tre sezioni e selezionati in modo casuale cinque campi per sezione. La densità delle fibre nervose autonome cardiache è stata quantificata ed espressa come il numero medio di fibre per area (fibre/mm²).

Estrazione proteica

Le cellule e i campioni di ventricolo sinistro (VS) sono stati lisati attraverso un saggio di radio-immunoprecipitazione (RIPA buffer). Le cellule sono state risospese in un volume di tampone di lisi (10 mM Tris/HCl a pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH 8, 1% Triton X-100) contenente 1X sia di inibitori delle fosfatasi (PhosSTOP-Roche,

Indianapolis, IN, USA) che di inibitori di proteasi (cOmplete-Roche, Indianapolis, IN, USA). Gli estratti cellulari sono stati centrifugati a 1.300 x g per 5 minuti a 4°C, i surnatanti (contenenti l'estratto proteico) sono stati raccolti e poi quantizzati effettuando il saggio proteico DC™ Protein Assay (Bio-Rad), letto a 750 nm utilizzando un lettore di micropiastre Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific).

Analisi con Western-Blot

Le proteine, caricate in un quantitativo pari a 30µg, sono state separate mediante l'utilizzo di gel di poliacrilammide in presenza di sodio-dodecilsolfato (SDS-PAGE) pre-cast a gradiente 4-20% (Invitrogen) e, successivamente, sono state trasferite su una membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF, Bio-Rad). Dopo aver utilizzato una soluzione di blocco con latte al 5% in TBS-Tween 0,1% per un'ora, le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario a 4°C per tutta la notte secondo le istruzioni del produttore. Il giorno seguente, le membrane sono state lavate con TBS-Tween 0,1% e le proteine sono state esposte al corrispondente anticorpo secondario per un'ora, per essere poi visualizzate con il sistema chemi-doc XRS (Bio-Rad). L'analisi densitometrica quantitativa è stata eseguita utilizzando il software di imaging XRS chemi-doc [46].

Sono stati valutati i livelli proteici di:

- Brain-derived neurotrophic factor (BDNF, ANT-010, Alomone Labs, 1:1000);
- Nerve growth factor (NGF, sc-548, H-20; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000);
- Cleaved Caspase-3 (CC3; Asp175, #9661; Cell Signaling 1:1000);
- Collagen III-A1 (COL3A1; sc8780, S-17; Santa Cruz Biotechnology; 1:1000);
- Growth Associated Protein 43 (GAP-43, AB5220, Sigma Aldrich, 1:1,000)
- Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH, SC-32233, 6C5, Santa Cruz Biotechnology, 1:2.000).

Saggio immunoenzimatico ELISA

I livelli sierici di NGF e BDNF sono stati valutati mediante il kit commerciale ELISA (biosensis®- BEK-2227) secondo le indicazioni riportate nel protocollo del produttore. Al termine del periodo di studio, per ogni singolo animale appartenente ad entrambi i gruppi sperimentali (n = 7 a 8 di ciascun gruppo) è stato raccolto 1 mL di sangue. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 250 x g a 15°C per 15 minuti. Il saggio ELISA è stato eseguito utilizzando 25 µL di siero di ciascun ratto. Infine, i campioni sono stati quantizzati secondo le istruzioni del kit ELISA e la

piastra è stata letta a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastre Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific).

Condizioni di coltura cellulare e stimolazione

Le cellule neuronali SH-SY5Y (Human Neuroblastoma Cell Line) sono state acquistate presso l'ATCC (ATCC® CRL-2266™) e mantenute in DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) integrato con il 10% di FBS e 1% di P/S. Per gli esperimenti con siero di ratto, le cellule sono state deprivate di siero per 24 ore e successivamente, stimulate con il 4% di siero di ratto giovane o anziano per 24 ore.

Saggio della crescita dei neuriti delle cellule neuronali (SH-SY5Y)

Per valutare la crescita dei neuriti delle cellule neuronali, è stato effettuato un saggio colorimetrico con una soluzione di cristallo violetto. Le SH-SY5Y coltivate in piastre di Nunclon sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 10 minuti, lavate in PBS 1X e colorate con soluzione di cristallo violetto allo 0,1% (Sigma) per 10 minuti. Successivamente, le immagini sono state acquisite mediante microscopio BA410 (Motic®). Per ogni campione sono state selezionate in modo casuale cinque aree (10-30 cellule per area) e la lunghezza dei neuriti delle

cellule neuronali è stata misurata utilizzando il software ImageJ (NIH, versione 1.30) [47].

Analisi Statistiche

I risultati ottenuti sono stati espressi come media \pm errore standard. La significatività statistica è stata determinata mediante il test t-Student o tramite il test esatto di Mann-Whitney, nel momento in cui il numero dei campioni era inferiore a 10. Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, California). La significatività statistica è stata accettata con un valore di $p^* < 0,05$.

5. RISULTATI

5.1 L'invecchiamento esercita un impatto negativo sulla fibrosi miocardica interstiziale, sulla vascolarizzazione e sull'innervazione

Come abbiamo discusso sopra, l'invecchiamento rappresenta uno dei fattori di rischio dominanti per le malattie cardiovascolari. Pertanto, come illustrato in Figura 1, per studiare gli effetti del processo di invecchiamento sull'innervazione autonoma, abbiamo utilizzato ratti Fisher anziani (24 mesi) mentre come controllo, abbiamo utilizzato ratti giovani (di 3 mesi) [48-49]. Come previsto, il miocardio dei ratti anziani presentava un incremento della fibrosi interstiziale (Fig. 2A) che era associata ad un'aumentata espressione di Collagene, Tipo III alfa-1 (COL3A1, Fig. 2B), rispetto ai cuori giovani. Inoltre, abbiamo osservato che il processo di invecchiamento era accompagnato da una ridotta vascolarizzazione cardiaca (Fig. 2C), un aumento significativo dell'ipertrofia dei cardiomiociti, come valutato dal saggio dell'agglutinina di germe di grano (WGA) (Fig. 2D) e da un aumentato tasso apoptotico (Fig. 2E). Successivamente, abbiamo analizzato la densità delle fibre nervose simpatiche e colinergiche cardiache mediante la marcatura della dopamina- β idrossilasi (D β H) e del trasportatore vescicolare dell'acetilcolina (VaChT) nelle sezioni cardiache di ciascun gruppo sperimentale. In particolare, è stata osservata una significativa compromissione delle fibre

positive alla marcatura con D β H (D β H⁺) e VaChT⁺ nei ratti anziani rispetto a quelli giovani (Fig. 2F-G), confermando così l'ipotesi che l'invecchiamento si accompagna ad una progressiva degenerazione dell'ANS.

5.2 Effetti dell'invecchiamento sulla sintesi e secrezione di BDNF e NGF

Successivamente abbiamo studiato gli effetti dell'invecchiamento sulla sintesi e secrezione di BDNF e NGF sia a livello sistemico che a livello miocardico. I nostri risultati hanno dimostrato che nei ratti anziani c'è una significativa riduzione dei livelli di proteina BDNF sia circolanti che cardiaci (Fig. 3A-B). È interessante osservare, che il processo di invecchiamento non ha esercitato alcun effetto sull'espressione o sulla secrezione di NGF, sia a livello cardiaco che sistemico (Fig. 3C-D). In effetti, i livelli di proteina NGF erano simili tra il gruppo di ratti giovani ed anziani.

Infine, abbiamo analizzato i livelli di espressione miocardica della proteina 43 associata alla crescita (GAP-43) come marker della rigenerazione delle fibre nervose. Come mostrato in Figura 3E, che nei cuori senili è stata riscontrata una significativa riduzione dei livelli di GAP-43 rispetto al gruppo dei giovani.

5.3 Effetti del siero di ratto anziano sui fattori neurotrofici e sulla funzione neuronale *in vitro* nelle cellule SH-SY5Y

I nostri dati *in vivo* dimostrano che il processo di invecchiamento è in grado di indurre un significativo depauperamento delle fibre nervose autonome all'interno del tessuto miocardico. Tuttavia, per indagare ulteriormente se e come l'invecchiamento influisce sulla formazione dei neuriti delle cellule neuronali, abbiamo stimolato, *in vitro*, cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y) con il siero dei ratti giovani ed anziani per 24 ore (4% siero di ratto in DMEM/F-12 senza siero). Successivamente, abbiamo valutato gli effetti della stimolazione del siero sull'espressione delle proteine GAP-43, BDNF e NGF. Da notare, che la stimolazione del siero di ratto anziano ha comportato una riduzione significativa sia dell'espressione della proteina GAP-43 che BDNF rispetto alle cellule stimolate con siero di ratto giovane (Fig. 4A-B-C). Al contrario, non sono state osservate variazioni dei livelli di espressione della proteina NGF a seguito della stimolazione con siero di ratto giovane o anziano (Fig. 4D). Infine, abbiamo analizzato gli effetti della stimolazione del siero sulla crescita neuronale. In particolare, nelle cellule stimolate con siero di ratto anziano, abbiamo osservato una marcata compromissione della neuritogenesi, rispetto a quelle trattate con siero giovane (Fig. 4E). Pertanto, questi risultati confermano che

l'invecchiamento induce un rimodellamento maladattativo della crescita delle fibre nervose suggerendo così una graduale degenerazione neuronale età- dipendente.

6. DISCUSSIONE

L'invecchiamento cardiaco nei modelli murini riassume le modificazioni legate all'età, riscontrate nei cuori umani [50-51]. Ad esempio, nel nostro modello di ratto, abbiamo osservato che l'invecchiamento è associato ad un aumento significativo della percentuale di fibrosi ed ipertrofia miocardica, con una marcata compromissione della densità capillare. Da notare che con questo modello abbiamo confermato i dati descritti anche in altri studi precedenti, che suggerivano che una riduzione dell'innervazione autonoma età-dipendente costituisce un importante fattore di rischio o contribuisce significativamente allo sviluppo e alla progressione delle malattie cardiovascolari [52]. A tal riguardo, abbiamo osservato che i cuori di ratto anziano presentavano una ridotta densità delle fibre nervose simpatiche e colinergiche, a sostegno di un nostro precedente studio che mostrava l'impatto dell'invecchiamento sull'innervazione cardiaca, in una popolazione di pazienti con SC [17]. In seguito, questo studio mostra per la prima volta gli effetti del processo di invecchiamento sulla sintesi e sul rilascio dei fattori neurotrofici BDNF e NGF. Sorprendentemente, i nostri dati dimostrano che l'invecchiamento influisce solo sull'espressione del

BDNF sia a livello cardiaco che a livello sistemico. Infine, i nostri dati mostrano che il trattamento con siero di ratto anziano determina una compromissione della funzionalità neuronale con ridotta neuritogenesi rispetto alla stimolazione con siero giovane. Tali effetti si associano anche ad una significativa riduzione dell'espressione sia del fattore BDNF che del GAP-43 nelle cellule neuronali trattate con siero anziano comparate con quelle trattate con siero di ratti giovani.

7. LIMITI DELLO STUDIO

Il presente studio, presenta alcune limitazioni. In primo luogo, non abbiamo monitorato la funzione del ventricolo sinistro nel nostro modello di ratto. Tuttavia, è importante sottolineare che l'obiettivo principale del presente studio era di determinare se e come l'invecchiamento influenzasse l'innervazione autonoma del miocardio. In ogni caso, non ci aspettavamo cambiamenti significativi in termini di funzione ventricolare sinistra come precedentemente dimostrato [53]. In secondo luogo, non abbiamo approfondito la composizione specifica del siero di ratto anziano, rispetto a quello giovane. Tuttavia, la nostra analisi preliminare che esplora qualsiasi differenza nei livelli di secrezione di fattori neurotrofici come BDNF e NGF, suggerisce che la compromissione del BDNF potrebbe essere associata a una parte degli effetti osservati nei cuori anziani. Altra limitazione è legata alla mancata investigazione dei meccanismi inerenti la

modulazione del BDNF, sia a livello centrale che periferico; aspetto che stimola ulteriori e dettagliati approfondimenti in merito. Infine, sebbene non abbiamo osservato alcun effetto sull'NGF, non possiamo escludere che altre anomalie nell'espressione e nel rilascio di fattori neurotrofici (es. NT3, NT4, ecc.) possano mediare un effetto sulla funzione delle cellule neuronali.

8. CONCLUSIONE

I dati ottenuti in questo studio confermano precedenti osservazioni indirette circa il ruolo deleterio del processo di invecchiamento sull'omeostasi del sistema nervoso cardiaco. Inoltre, i nostri dati dimostrano che tale effetto si associa ad una riduzione del fattore BDNF sia cardiaco che sistemico, spiegando così almeno in parte come il processo di invecchiamento induce un rimodellamento avverso dell'innervazione autonoma, aumentando così il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari.

Figure

Figura 1. Disegno sperimentale dello studio. *A) Disegno complessivo dello studio di 24 mesi.*

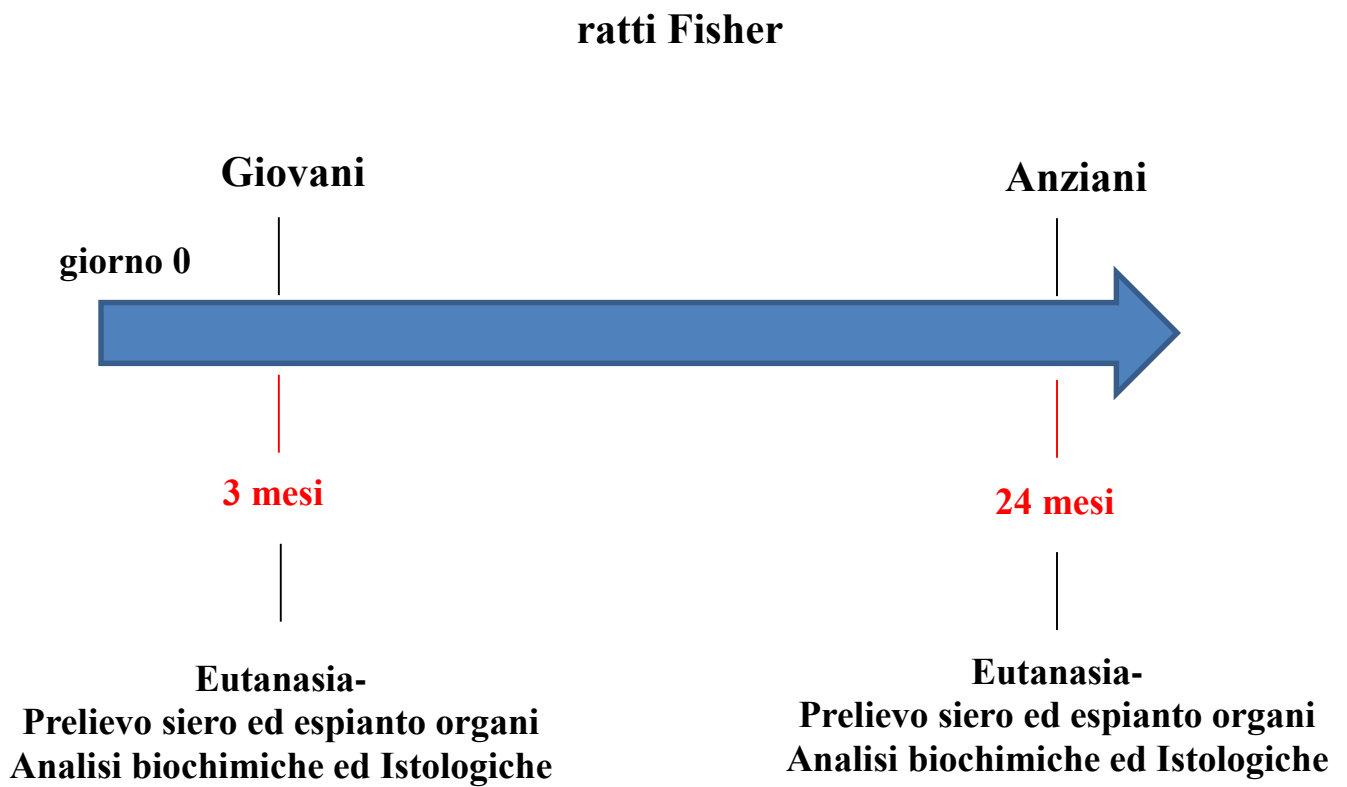


Figura 2A. Valutazione della fibrosi cardiaca in un modello d'invecchiamento fisiologico. Immagini rappresentative (pannelli superiori) ed analisi quantitativa (pannello inferiore) della percentuale di fibrosi cardiaca valutata mediante colorazione con rosso sirio picrato nelle sezioni del ventricolo sinistro di ratti giovani e anziani. La significatività rilevata è di $*p < 0.05$ vs Giovane.

2A

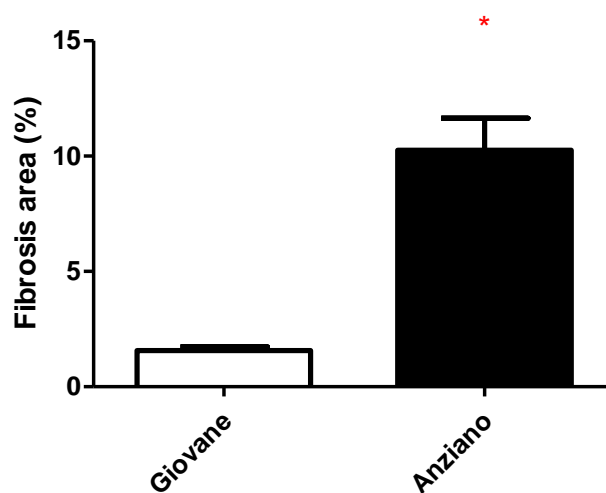
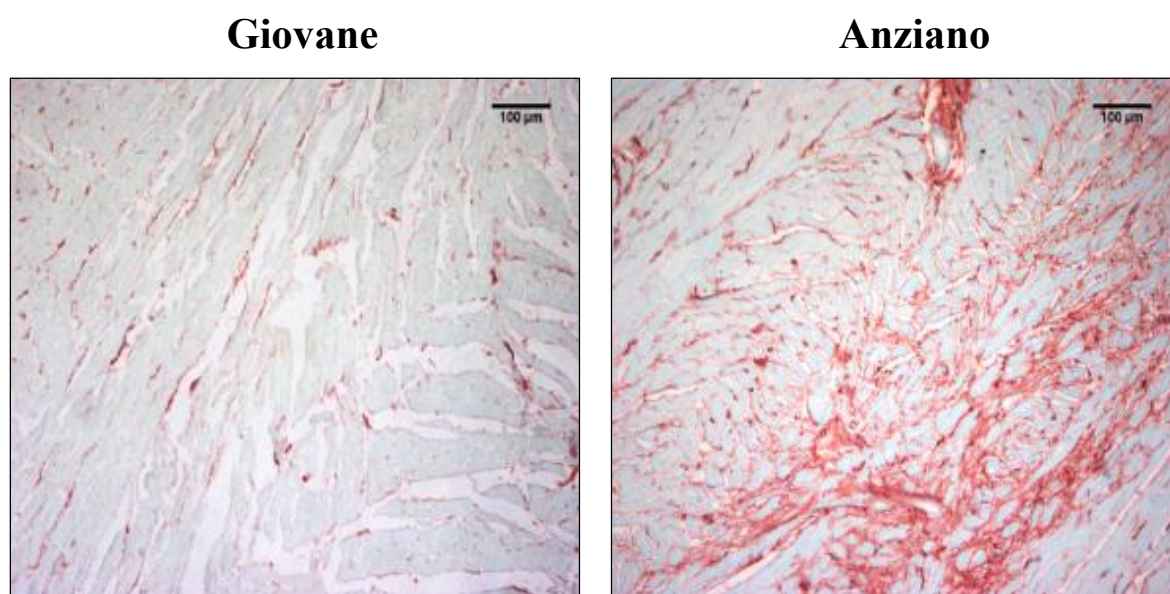


Figura 2B. Livelli di espressione del Collagene, Tipo III alfa-1 (COL3A1) in un modello murino d'invecchiamento fisiologico.

*Immagini rappresentative (sopra) ed analisi densitometrica (sotto) di molteplici esperimenti indipendenti effettuati per la valutazione dei livelli proteici di COL3A1. Sono evidenziati dal confronto dei lisati di ventricolo sinistro di ratti giovani ed anziani, i livelli di COL3A1 risultati essere significativamente aumentati nel cuore dei ratti anziani. I livelli di espressione di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. La significatività rilevata è di $*p < 0.05$ vs Giovane.*

2B

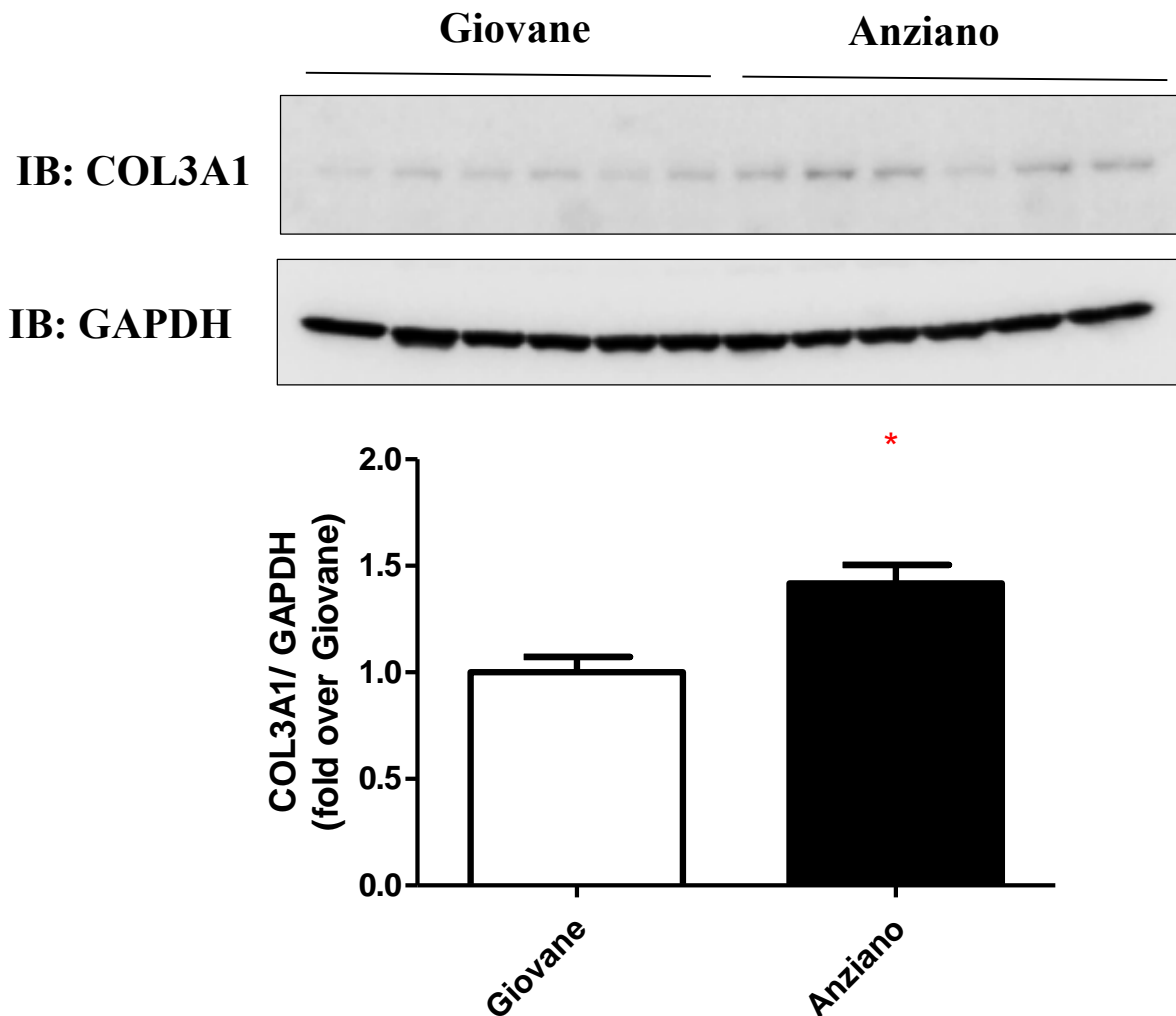


Figura 2C. Valutazione dell'alterazione dell'angiogenesi in un modello d'invecchiamento fisiologico. Immagini rappresentative (pannelli superiori) di sezioni istologiche e relativa analisi quantitativa (pannello inferiore) della densità capillare (capillari/mm²) in sezioni di ventricolo sinistro di ciascun gruppo sperimentale, rilevata mediante colorazione con lectina *Bandeiraea simplicifolia I* (BS-I). La significatività rilevata è * $p < 0.05$ vs Giovane.

2C

Giovane

Anziano

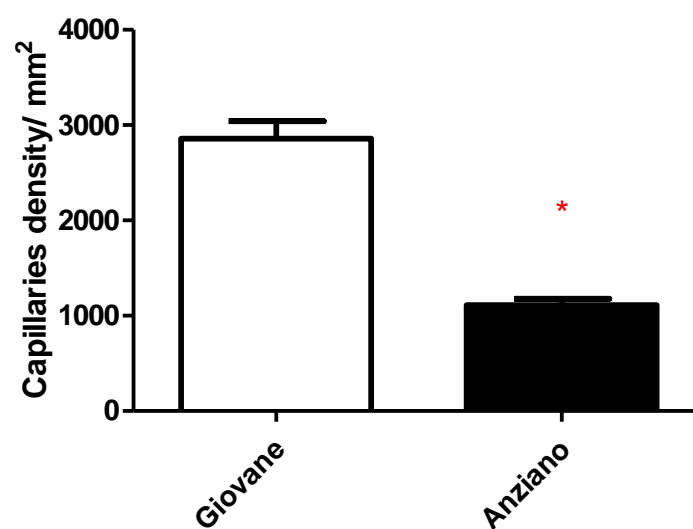
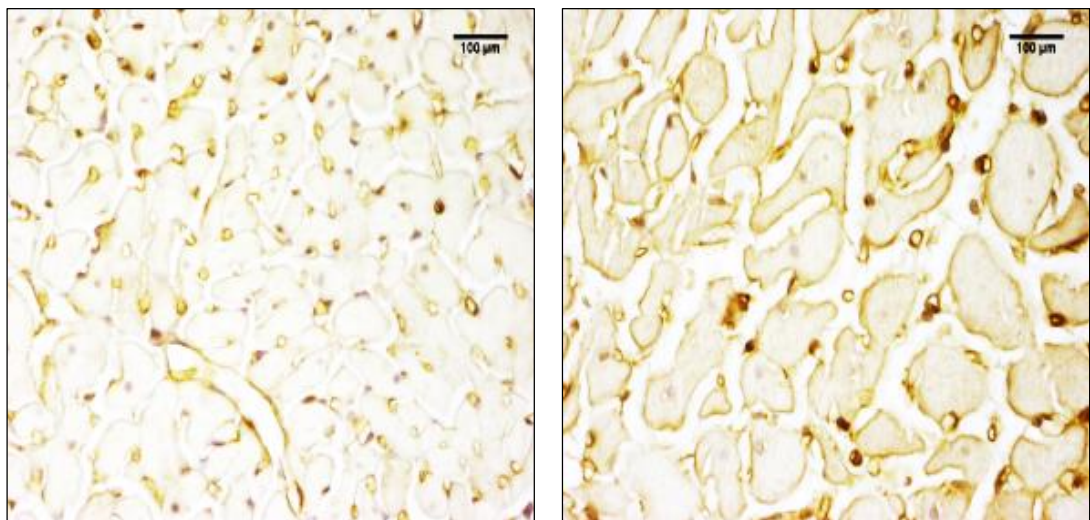


Figura 2D. Valutazione dell'ipertrofia ventricolare nel cuore giovane ed anziano. Immagini rappresentative (pannelli superiori) di sezioni istologiche e relativa analisi quantitativa (pannello inferiore) della dimensione dei cardiomiociti in sezioni di ventricolo sinistro dei ratti giovani ed anziani, valutata tramite il saggio dell'agglutinina di germe di grano (WGA). La significatività rilevata è $*p < 0.05$ vs Giovane.

2D

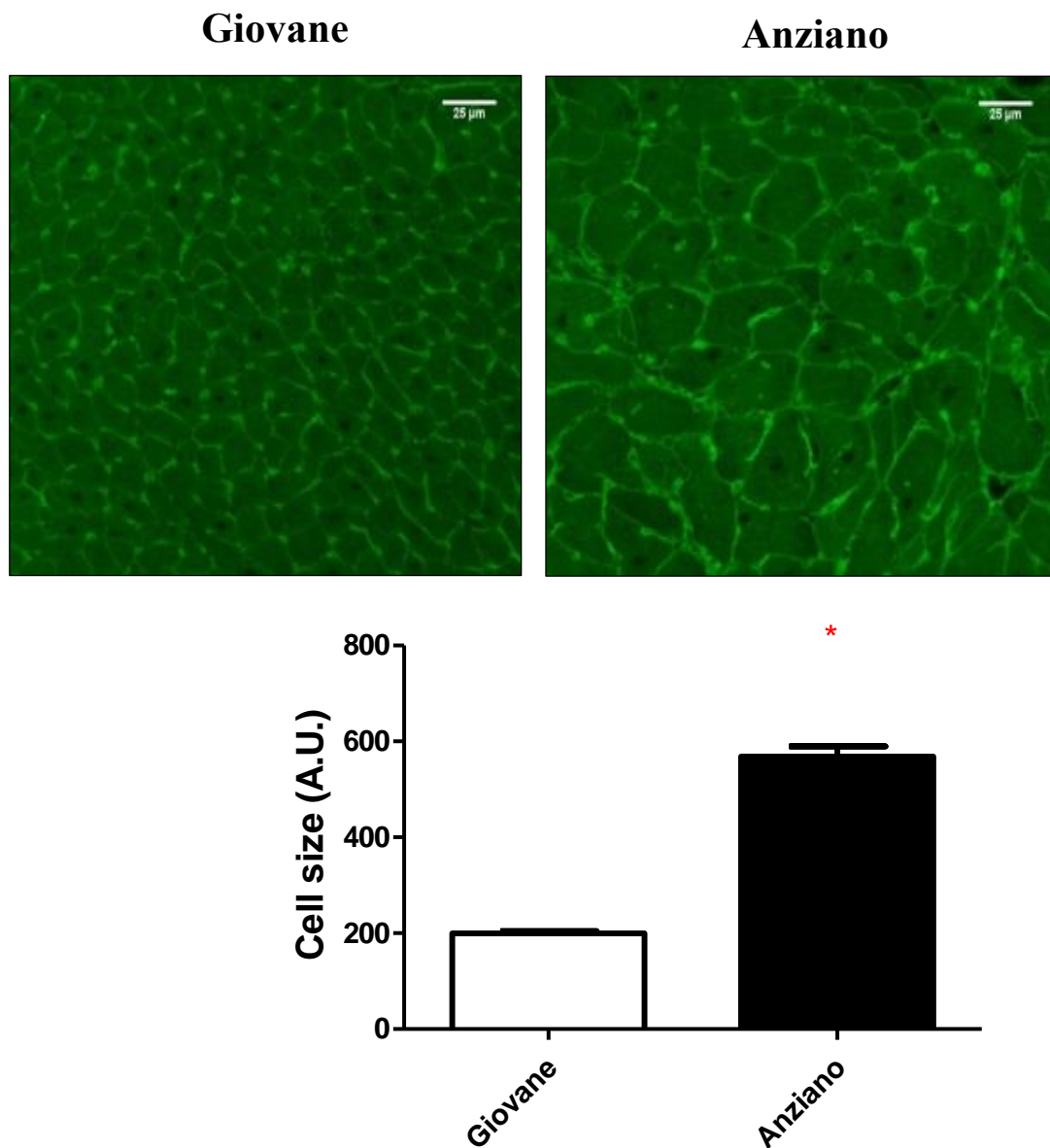


Figura 2E. Livelli di espressione della Caspasi Clivata3 (CC3) in un modello murino d'invecchiamento fisiologico. *Immagine rappresentativa (sopra) ed analisi densitometrica (sotto) di molteplici esperimenti indipendenti effettuati per la valutazione dei livelli proteici di CC3. Sono evidenziati dal confronto dei lisati di ventricolo sinistro di ratti giovani ed anziani, i livelli di CC3 risultati essere significativamente incrementati nel cuore dei ratti anziani. I livelli di espressione di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. La significatività rilevata è di $*p < 0.05$ vs Giovane.*

2E

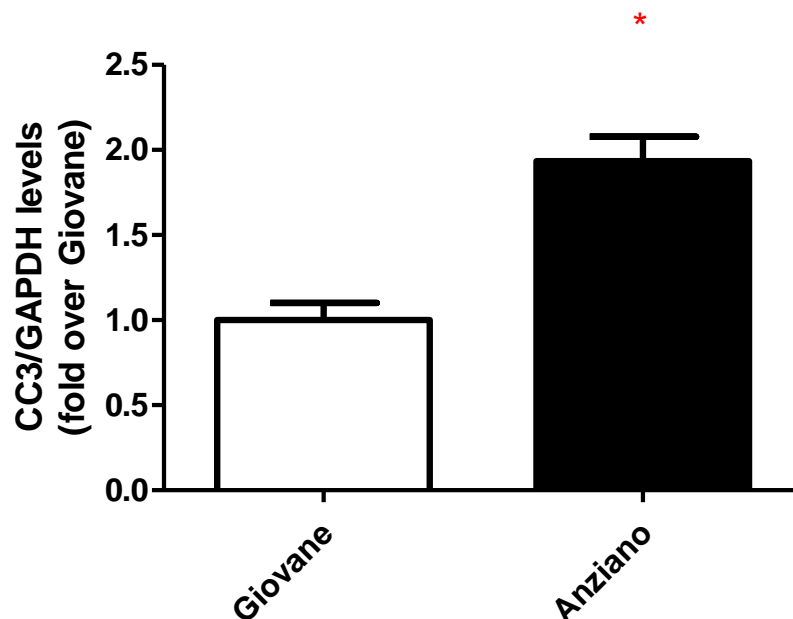
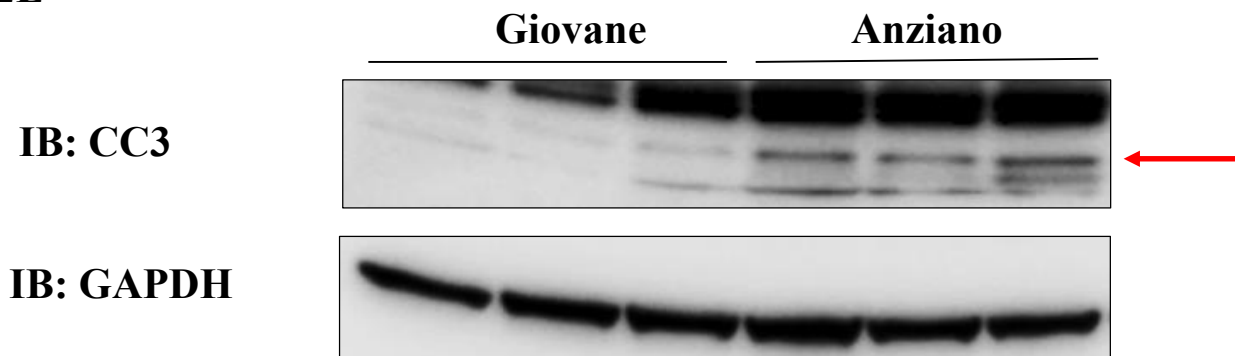


Figura 2F. Valutazione della denervazione adrenergica nel cuore di animali anziani. Immagini rappresentative (pannelli superiori) delle fibre positive per la dopamina beta-idrossilasi ($D\beta h+$) e colorate in verde, con relativa analisi quantitativa (pannello inferiore) dell'innervazione cardiaca rilevata mediante immunofluorescenza indiretta, esprime la densità delle fibre nervose miocardiche (fibre/mm²) simpatiche in sezioni di ventricolo sinistro dei ratti giovani ed anziani. La significatività rilevata è di $*p < 0.05$ vs Giovane.

2F

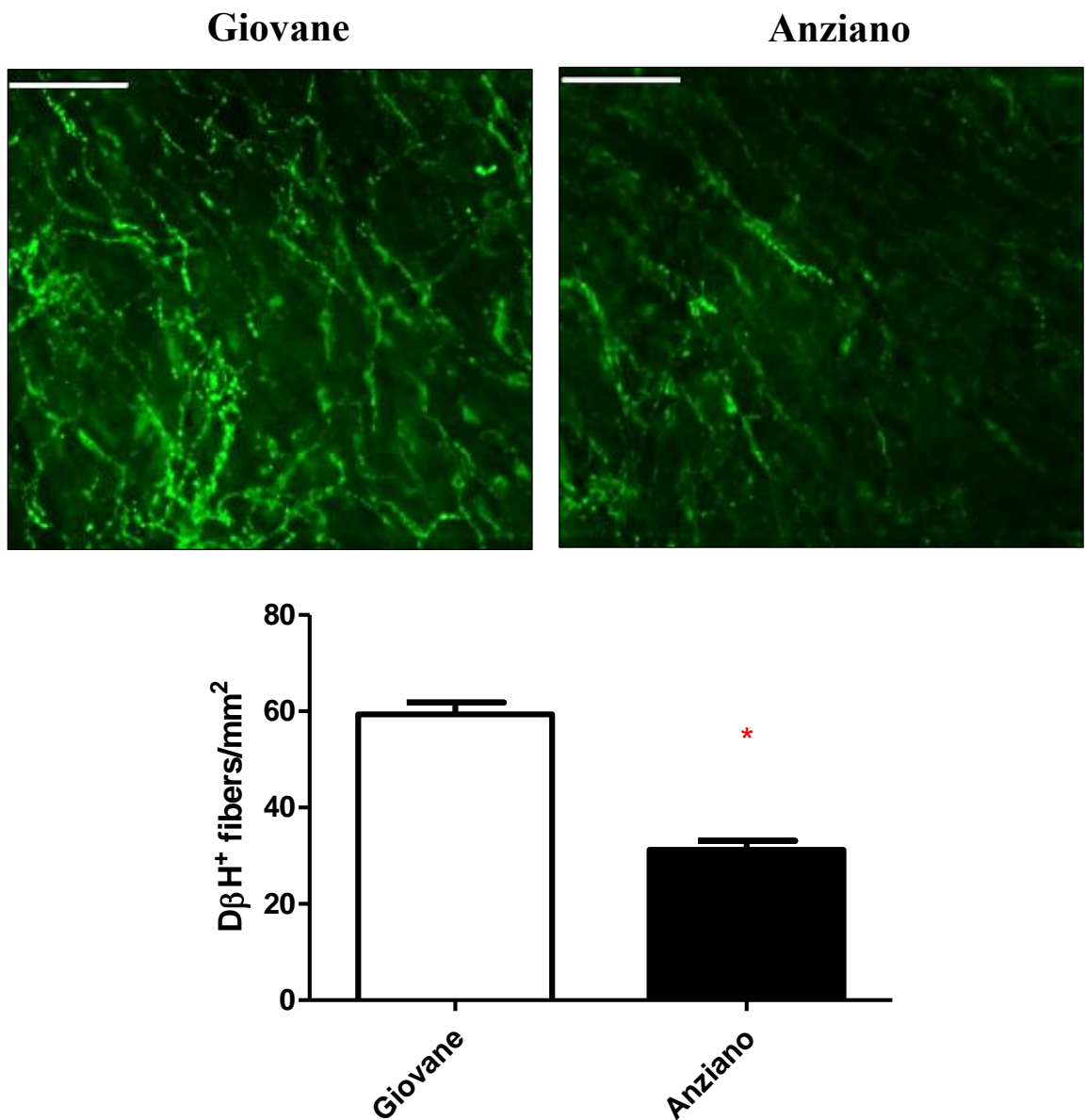


Figura 2G. Valutazione dell'alterazione dell'innervazione colinergica nel cuore di animali anziani. Immagini rappresentative (pannelli superiori) delle fibre positive per il trasportatore vescicolare dell'acetilcolina (VAcHT+) colorate in rosso, con relativa analisi quantitativa (pannello inferiore) dell'innervazione miocardica rilevata mediante immunofluorescenza indiretta, esprime la densità delle fibre nervose ventricolari (fibre/mm²) parasimpatiche nelle sezioni di cuore, dei ratti giovani ed anziani. La significatività rilevata è di * $p < 0.05$ vs Giovane.

2G

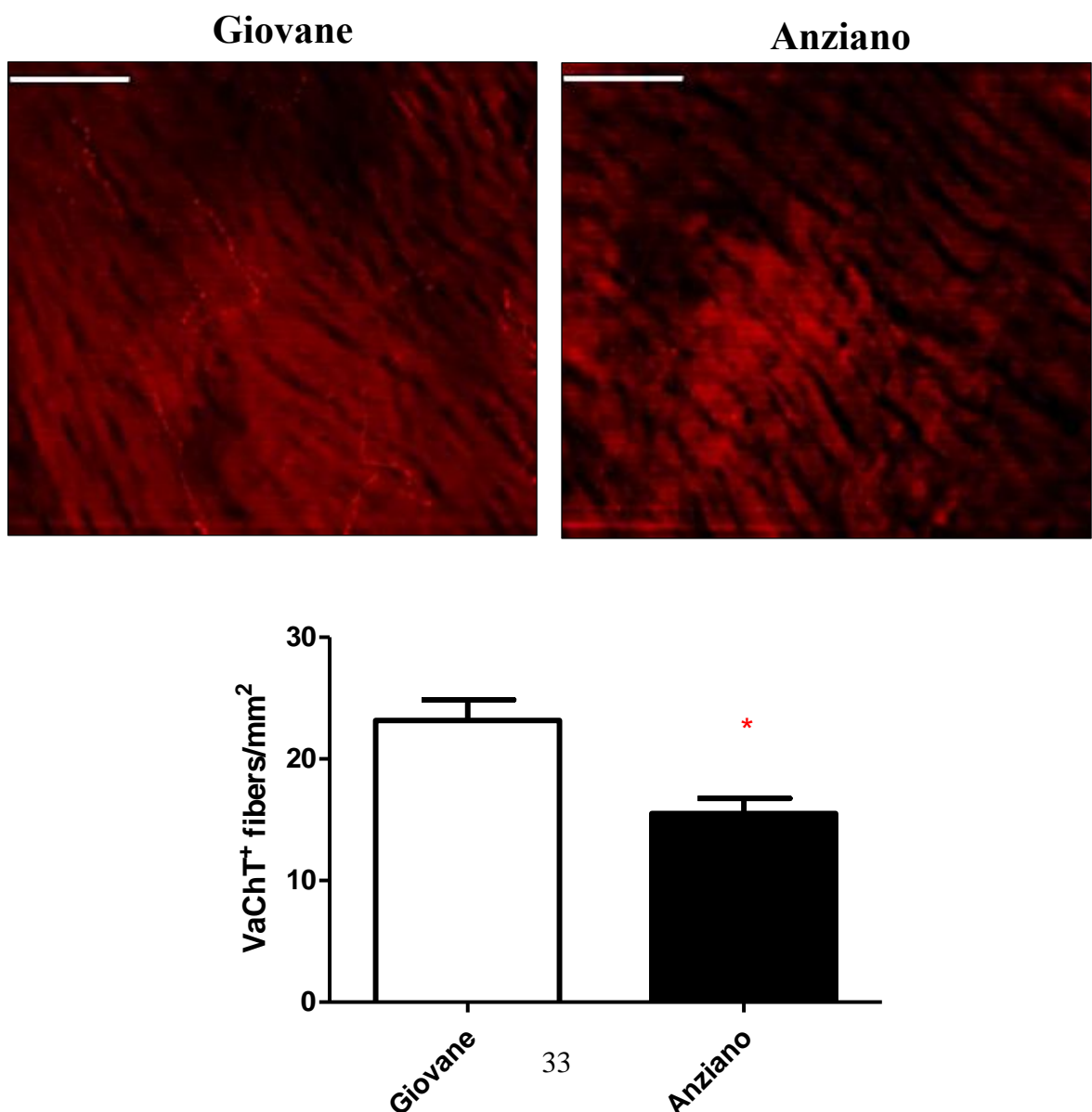
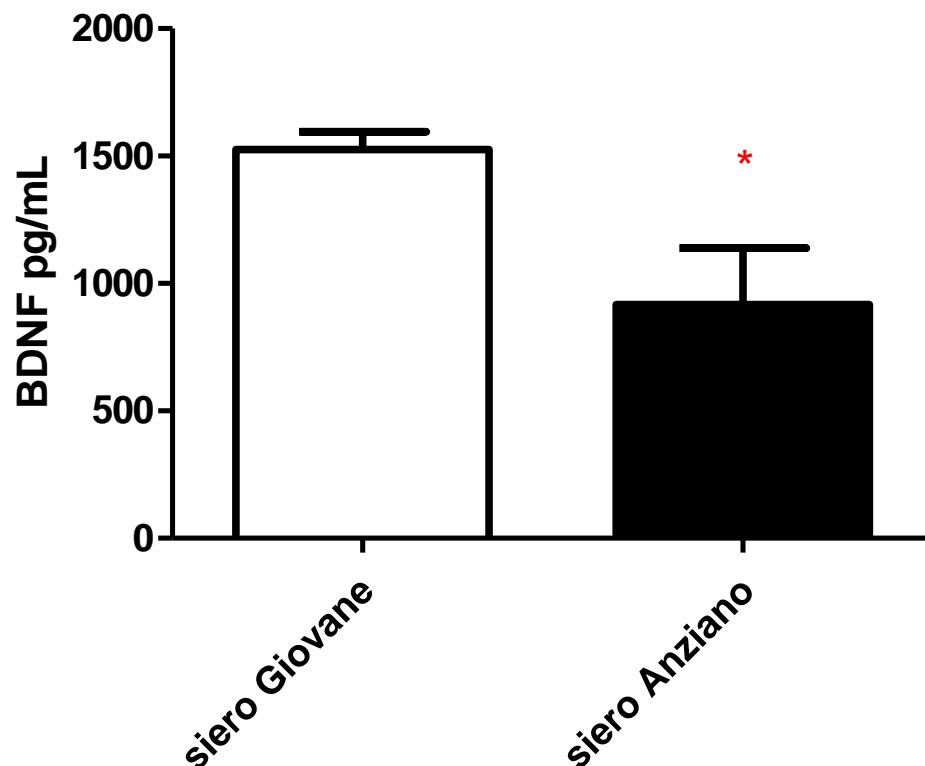


Figure 3A-B. Valutazione dei livelli circolanti e tissutali cardiaci di BDNF nei ratti giovani ed anziani. A) *Analisi densitometrica esprime i livelli sistemici di BDNF valutati mediante saggio ELISA in ratti giovani e anziani. B) Immagini rappresentative (sopra) ed analisi densitometrica (sotto) di molteplici esperimenti indipendenti effettuati per la valutazione dei livelli proteici di BDNF. Sono evidenziati dal confronto dei lisati di ventricolo sinistro di ratti giovani ed anziani, i livelli di BDNF, risultati essere significativamente ridotti nel cuore degli animali anziani. I livelli di espressione di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. La significatività rilevata è di $*p < 0.05$ vs Giovane.*

3A



3B

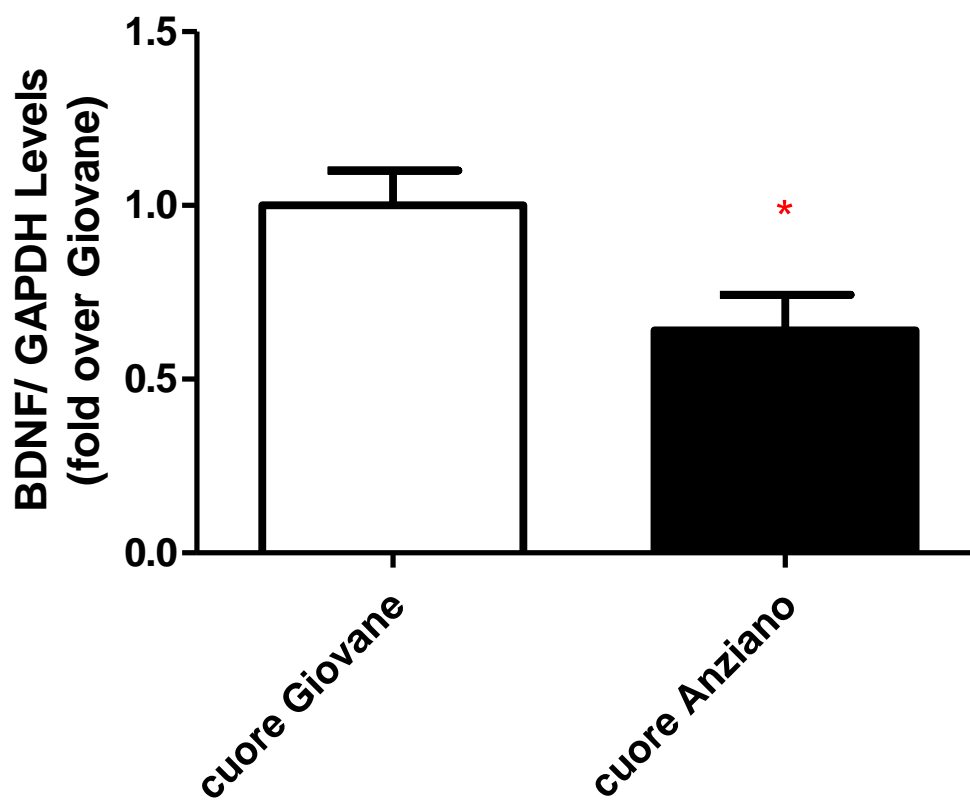
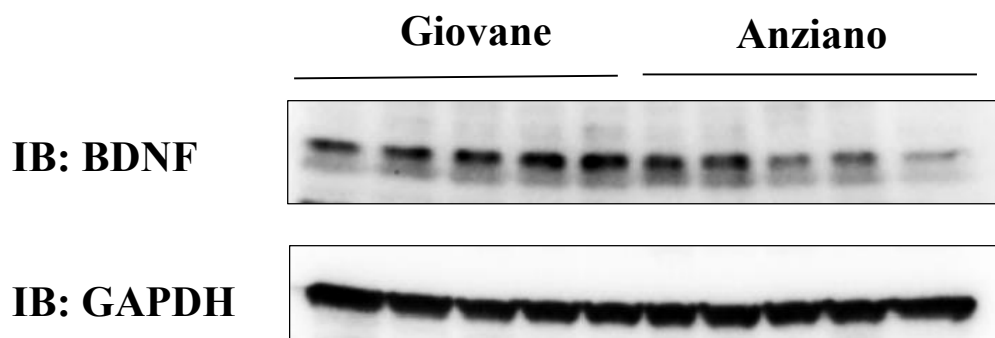
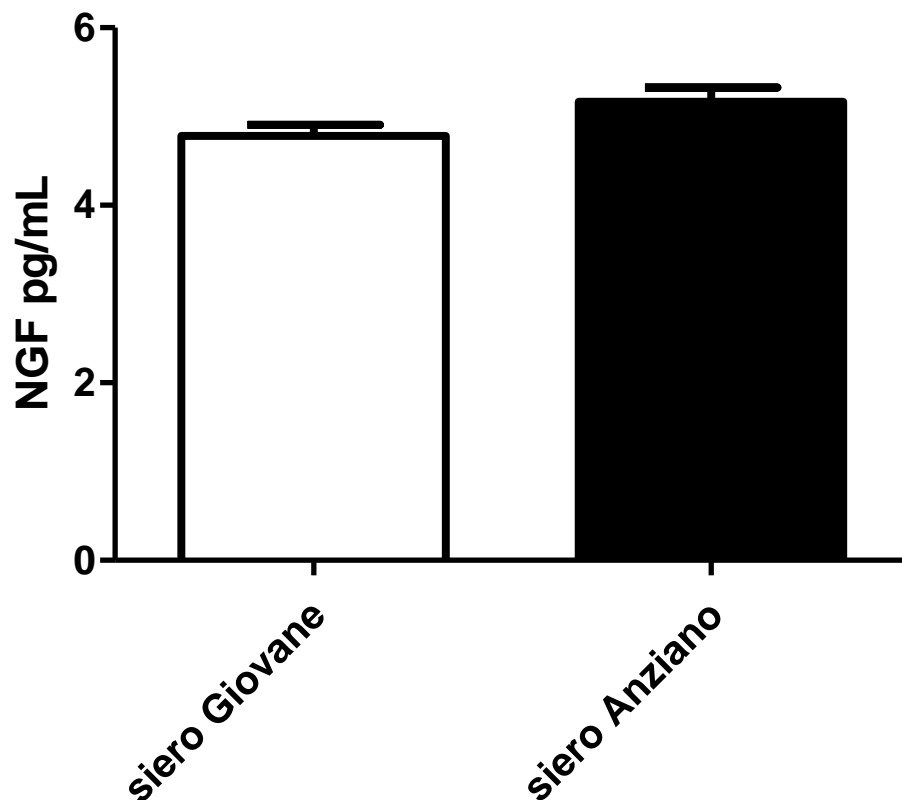


Figure 3C-D. Valutazione dei livelli circolanti e tissutali cardiaci di NGF in un modello d'invecchiamento fisiologico. A) *Analisi densitometrica esprime i livelli sierici di NGF valutati mediante saggio immunoenzimatico ELISA in ratti giovani e anziani. B) Immagini rappresentative (sopra) ed analisi densitometrica (sotto) di molteplici esperimenti indipendenti effettuati per la valutazione dei livelli proteici di NGF. I livelli di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. Non sono state evidenziate alcune differenze nei livelli di espressione di NGF tra i due gruppi sperimentali, sia a livello sistemico che cardiaco.*

3C



3D

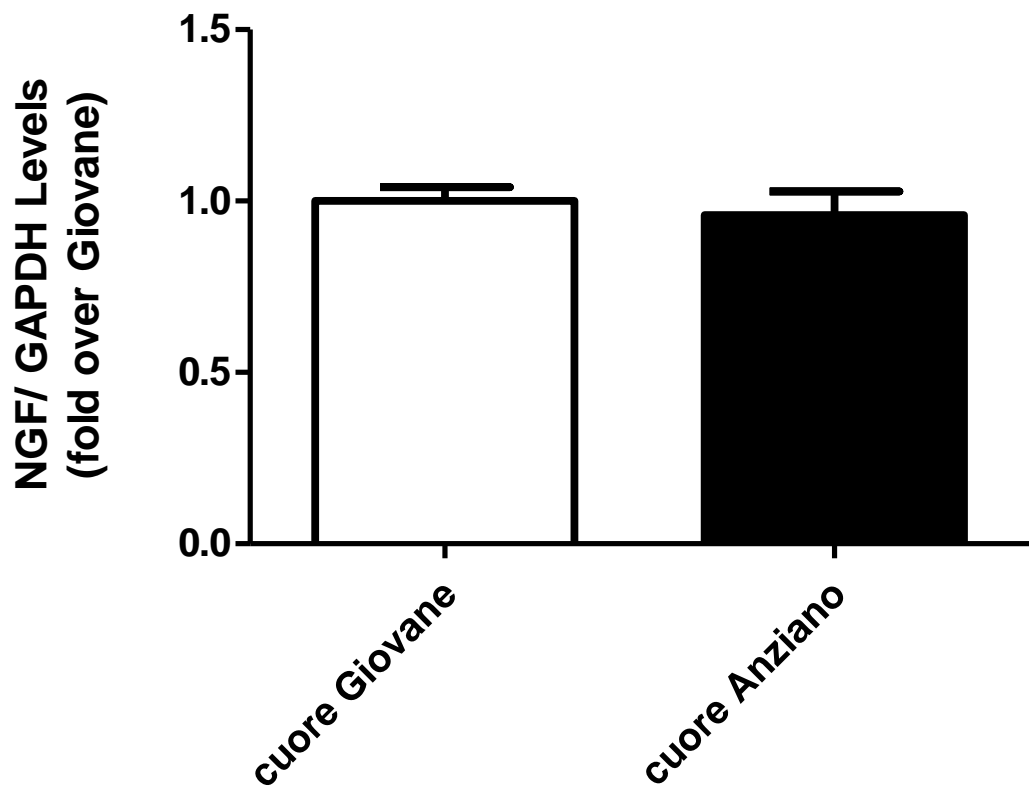
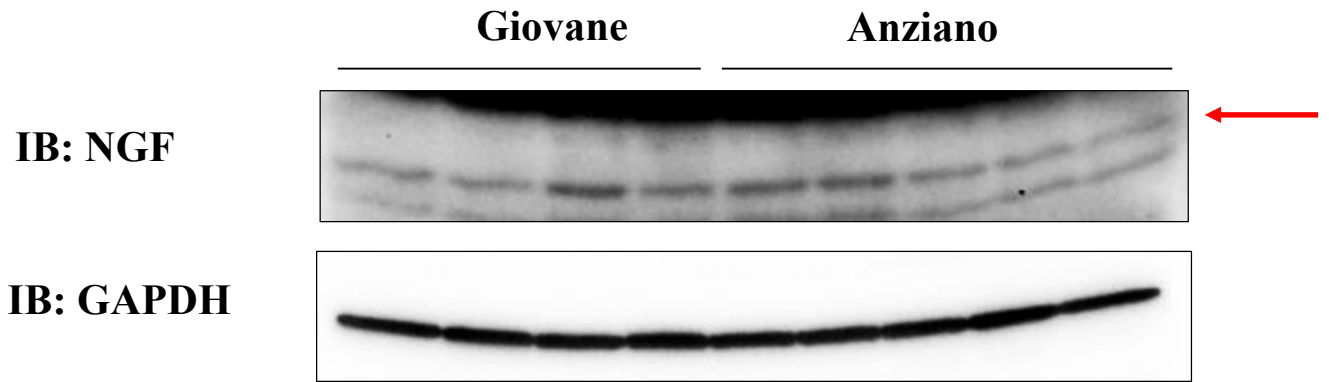


Figura 3E. Livelli di espressione del GAP-43 nel cuore di animali anziani. Immagini rappresentative (sopra) ed analisi densitometrica (sotto) di molteplici esperimenti indipendenti effettuati per la valutazione dei livelli proteici di GAP-43. Sono evidenziati dal confronto dei lisati di ventricolo sinistro di ratti giovani ed anziani, i livelli di GAP-43, risultati essere significativamente ridotti nel cuore degli animali anziani. I livelli di espressione di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. La significatività rilevata è di $*p < 0.05$ vs Giovane.

3E

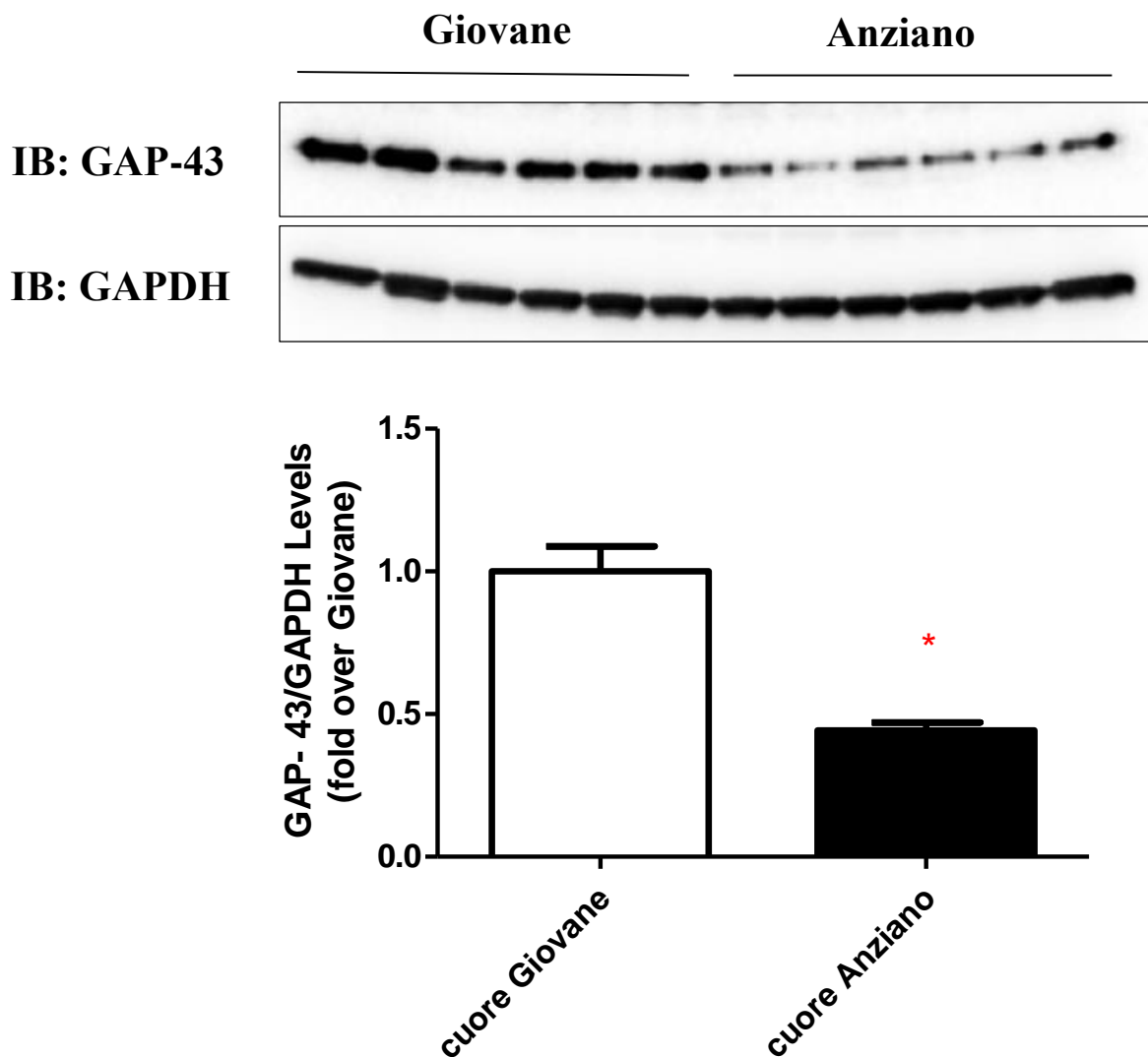
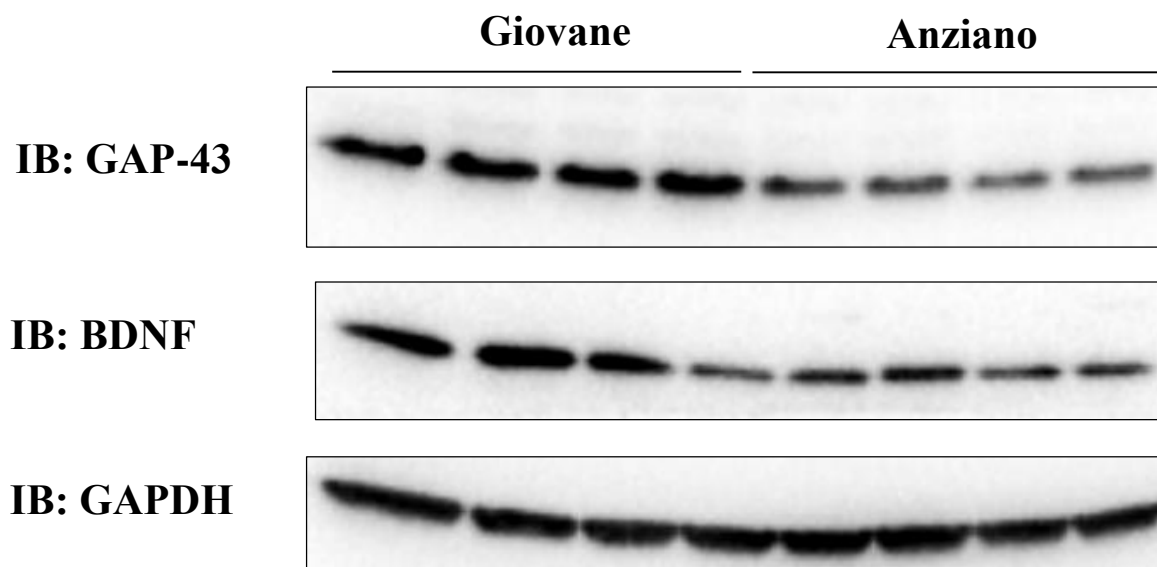
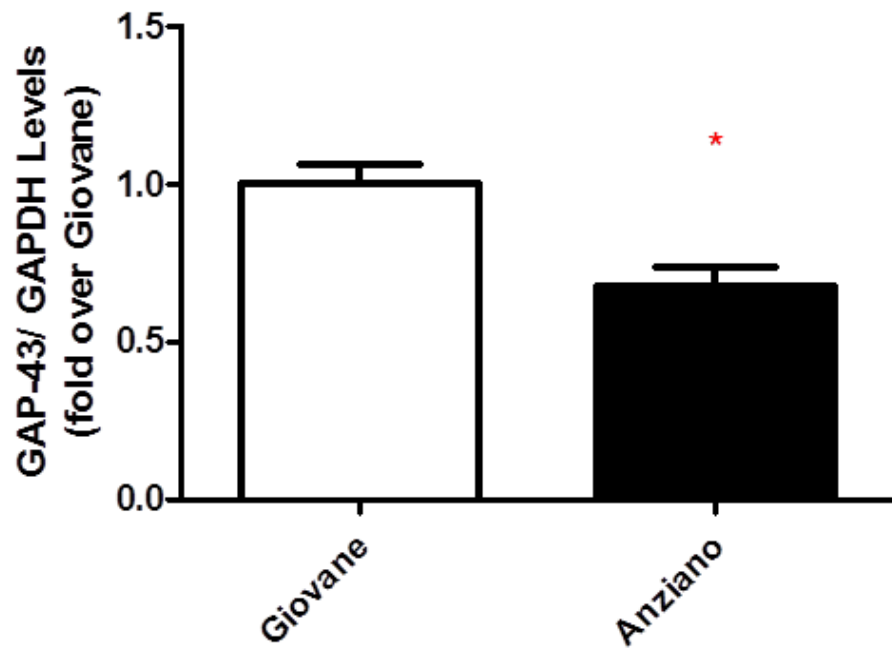


Figure 4A-B-C. Effetti dell'invecchiamento sulla funzionalità neuronale in vitro. Immagini rappresentative e analisi densitometrica di molteplici esperimenti indipendenti per la valutazione dei livelli proteici di GAP-43 e BDNF, in lisati cellulari ottenuti da SH-SY5Y trattate con siero di ratto giovane ed anziano per 24h. I livelli di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. La significatività rilevata è $*p < 0.05$ vs Giovane.

4A



4B



4C

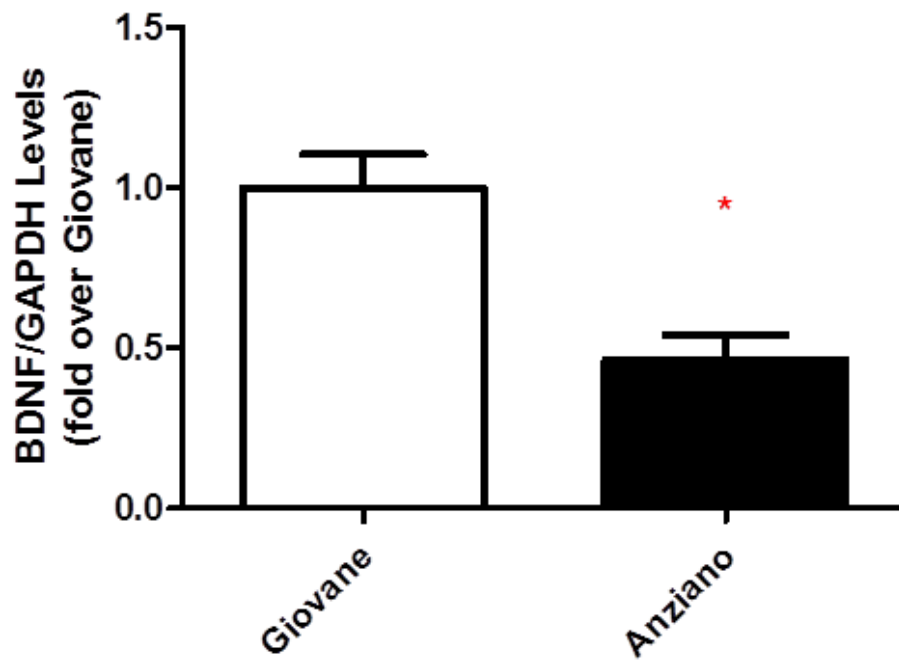


Figura 4D. Effetti dell'invecchiamento sui livelli d'espressione del fattore NGF in cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y). *Immagini rappresentative (sopra) e analisi densitometrica (sotto) di molteplici esperimenti indipendenti per la valutazione dei livelli proteici di NGF, in lisati cellulari ottenuti da SH-SY5Y stimulate con siero di ratto giovane ed anziano per 24h. I livelli di GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento. Non sono stati evidenziate alcune differenze nei livelli di espressione di NGF tra i due gruppi sperimentali.*

4D

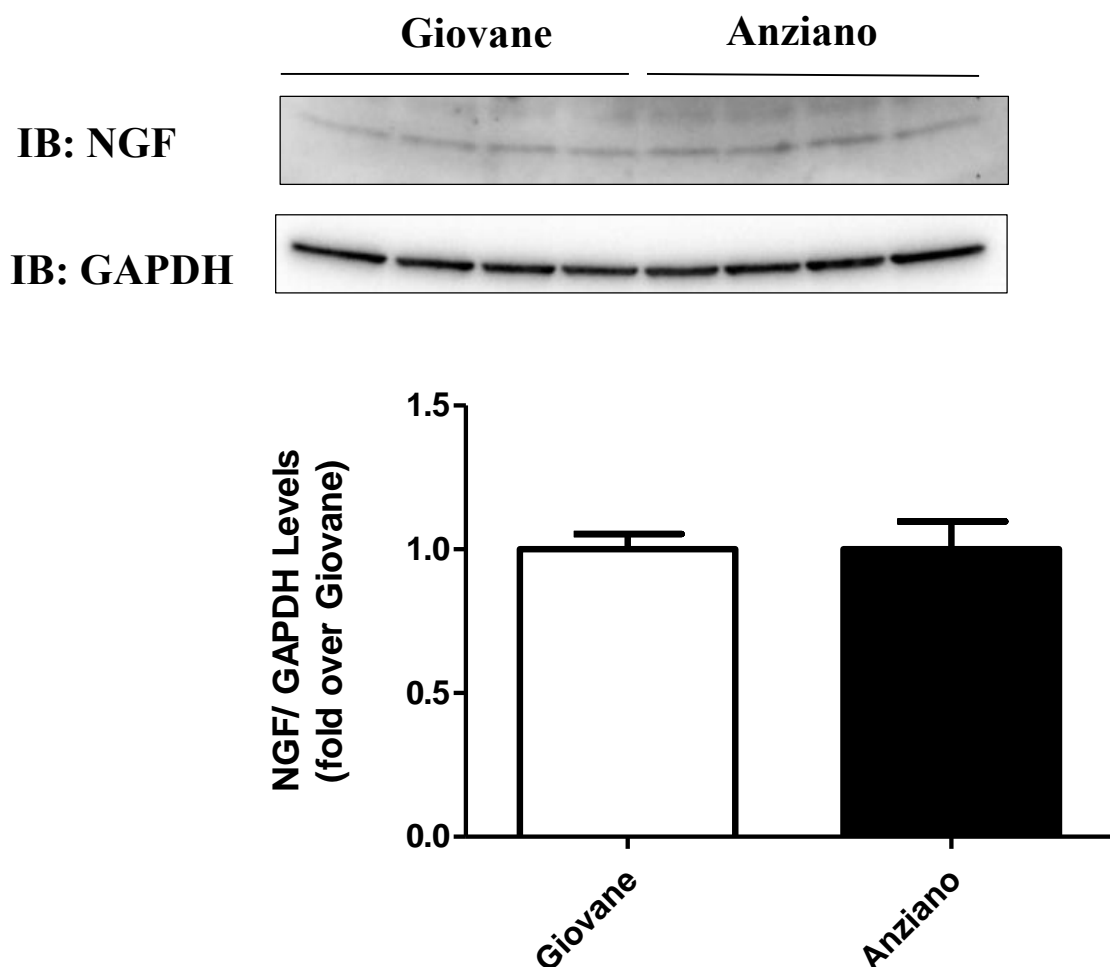
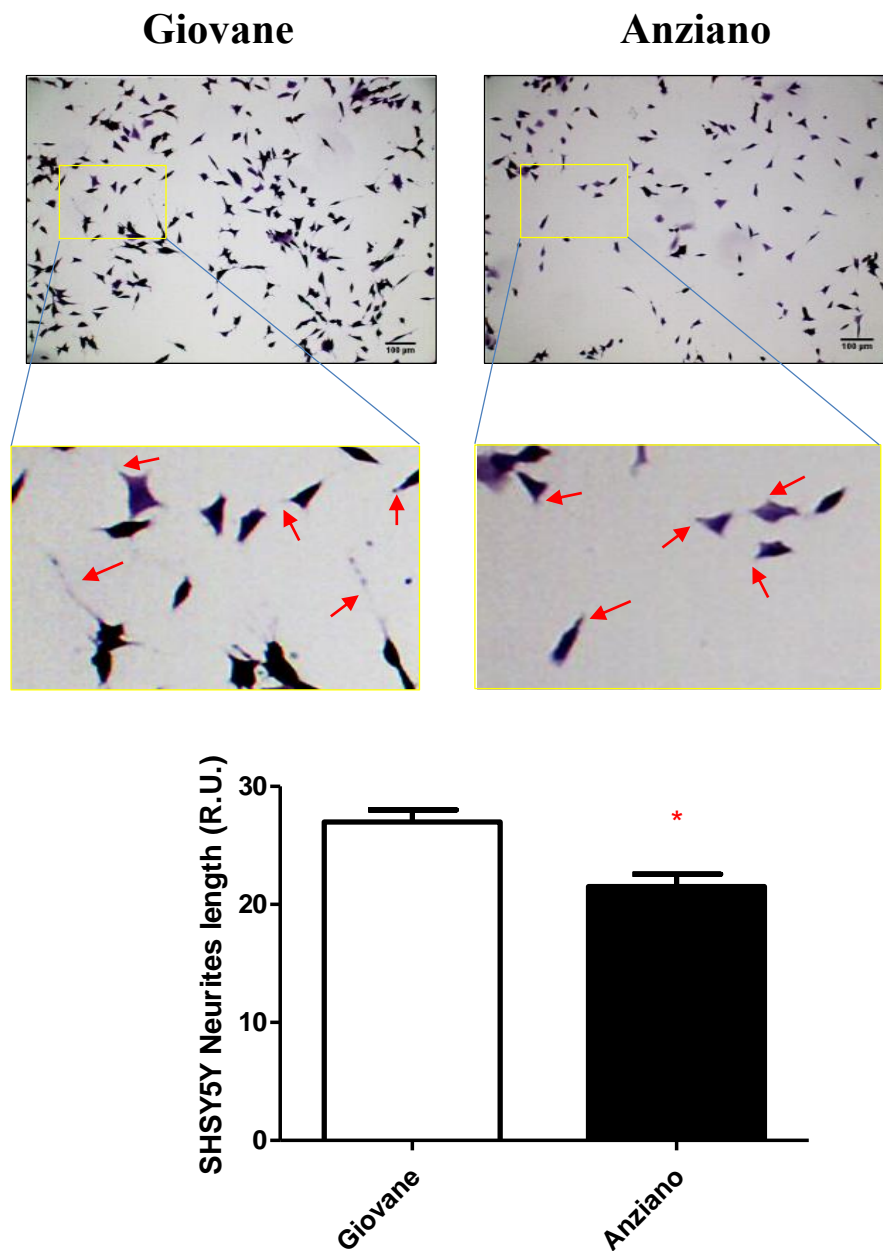


Figura 4E. Impatto dell'invecchiamento sulla crescita neuronale in vitro. Immagini rappresentative (pannelli superiori) ed analisi quantitativa (pannello inferiore) della crescita neuritica nelle cellule SH-SY5Y, trattate con siero di ratto giovane ed anziano per 24h, valutata mediante saggio con cristal violetto. La significatività rilevata è di $*p < 0.05$ vs Giovane.

4E



Bibliografia

1. Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, et al.
The aging process and potential interventions to extend life expectancy
Clin Interv Aging. 2007 Sep; 2(3): 401–412.
2. Abete P, Della Morte D, Mazzella F, et al. Lifestyle and prevention of cardiovascular disease in the elderly: an Italian perspective. Am J Geriatr Cardiol. 2006 Jan-Feb;15(1):28-34.
3. Ferrara N, Corbi G, Bosimini E, et al. Cardiac rehabilitation in the elderly: patient selection and outcomes. Am J Geriatr Cardiol. 2006 Jan-Feb;15(1):22-7.
4. Rengo F, Leosco D, Iacovoni A, et al. [Epidemiology and risk factors for heart failure in the elderly]. Ital Heart J. 2004 Dec;5 Suppl 10:9S-16S.
5. Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, clinical features and prognosis of diastolic heart failure: an epidemiologic perspective. J Am Coll Cardiol. 1995 Dec;26(7):1565-74. Review. Rich MW, Beckham V, Wittenberg C, Leven CL, Freedland KE, Carney RM.

6. Di Bari M, Pozzi C, Cavallini MC, et al. The diagnosis of heart failure in the community. Comparative validation of four sets of criteria in unselected older adults: the ICARE Dicomano Study. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Oct 19;44(8):1601-8.
7. Anversa P, Hiler B, Ricci R, et al. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:1441-1448.
8. Delp MD, Evans MV, Duan C. Effects of aging on cardiac output, regional blood flow, and body composition in Fischer-344 rats. *J Appl Physiol* (1985). 1998 Nov;85(5):1813-22.
9. Hacker TA, McKiernan SH, Douglas PS, et al. Age-related changes in cardiac structure and function in Fischer 344 x Brown Norway hybrid rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jan;290(1):H304-11.
10. Strait JB, Lakatta EG. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin*. 2012 Jan;8(1):143-64.

11. Ferrara N, Komici K, Corbi G, et al. β -adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. *Front Physiol.* 2014 Jan 9;4:396.

12. Zhang DY, Anderson AS.
The sympathetic nervous system and heart failure. *Cardiol Clin.* 2014 Feb;32(1):33-45, vii.

13. Kreusser MM, Lehmann LH, Haass M, et al.
Depletion of cardiac catecholamine stores impairs cardiac norepinephrine re-uptake by downregulation of the norepinephrine transporter. *PLoS One.* 2017 Mar 10;12(3):e0172070.

14. Nikolaidis LA, Hentosz T, Doverspike A, et al.
Catecholamine stimulation is associated with impaired myocardial O₂ utilization in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2002 Feb 1;53(2):392-404.

15. Jamali HK, Waqar F, Gerson MC. Cardiac autonomic innervation. *J Nucl Cardiol.* 2016 Nov 14.

16. Crasset V, Mezzetti S, Antoine M, et al.
Effects of aging and cardiac denervation on heart rate variability during sleep. *Circulation*. 2001 Jan 2;103(1):84-8.

17. Rengo G, Pagano G, Vitale DF, et al. Impact of aging on cardiac sympathetic innervation measured by ¹²³I-mIBG imaging in patients with systolic heart failure. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016 Dec;43(13):2392-2400.

18. Rascol O, Schelosky L. 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson's disease and related disorders. *Mov Disord*. 2009;24 Suppl 2:S732–S741.

19. Jaques S, Jr, Tobes MC, Sisson JC, et al. Comparison of the sodium dependency of uptake of metaiodobenzylguanidine and norepinephrine into cultured bovine adrenomedullary cells. *Mol Pharmacol*. 1984;26:539–546.

20. Sisson JC, Shapiro B, Meyers L, et al. Metaiodobenzylguanidine to map scintigraphically the adrenergic nervous system in man. *J Nucl Med*. 1987;28:1625–1636.

21. Sisson JC, Wieland DM, Sherman P, et al. Metaiodobenzylguanidine as an index of the adrenergic nervous system integrity and function. *J Nucl Med.* 1987;28:1620–1624.
22. Sisson JC, Lynch JJ, Johnson J, et al. Scintigraphic detection of regional disruption of adrenergic neurons in the heart. *Am Heart J.* 1988;116(1 Pt 1):67–76.
23. Lucio CG, Vincenzo C, Antonio R, et al. Neurological applications for myocardial MIBG scintigraphy. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2013;16:35–41.
24. Treglia G, Cason E, Stefanelli A, et al. MIBG scintigraphy in differential diagnosis of Parkinsonism: a meta-analysis. *Clin Auton Res.* 2012;22:43–55.
25. Treglia G, Stefanelli A, Cason E, et al. Diagnostic performance of iodine-123-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in differential diagnosis between Parkinson's disease and multiple-system atrophy: a systematic review and a meta-analysis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2011;113:823–829.

26. Nakajima K, Yoshita M, Matsuo S, et al. Iodine-123-MIBG sympathetic imaging in Lewy-body diseases and related movement disorders. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;52:378–387.
27. Yamashina S, Yamazaki J. Neuronal imaging using SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34:939–950.
28. Patel TD, Jackman A, Rice FL, et al. Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron*. 2000;25:345–357.
29. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987;237:1154–1162. 44.
30. Friedman WJ. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci* 2000;20:6340–6.
31. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609–42.

32. Francis N, Farinas I, Brennan C, et al. Nt-3, like NGF, is required for survival of sympathetic neurons, but not their precursors. *Dev Biol.* 1999;210:411–427.
33. Hasan W.
Autonomic cardiac innervation: development and adult plasticity. *Organogenesis.* 2013 Jul-Sep;9(3):176-93. doi: 10.4161/org.24892. Epub 2013 May 14. Review.
34. Frade JM, Barde YA. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioassays* 1998;20:137–45.
35. Rana OR, Saygili E, Meyer C, et al. Regulation of nerve growth factor in the heart: the role of the calcineurin-NFAT pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:568–578. 43.
36. Meloni M, Caporali A, Graiani G, et al. Nerve growth factor promotes repair following myocardial infarction. *Circ Res* 2010;106:1275–84.
37. Lorgis L, Amoureux S, Vergely C, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF): role of this neurotrophin in cardiovascular physiopathology. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2009;58:99–103.

38. Kimura K, Ieda M, Fukuda K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. *Circ Res.* 2012 Jan 20;110(2):325-36.
39. Fulgenzi G, Tomassoni-Ardori F, Babini L, et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. *J Cell Biol.* 2015 Sep 14;210(6):1003-12.
40. Feng N, Huke S, Zhu G, et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Feb 10;112(6):1880-5.
41. Cannavo A, Marzano F, Elia A, et al. Aldosterone Jeopardizes Myocardial Insulin and β -Adrenergic Receptor Signaling *via* G Protein-Coupled Receptor Kinase 2. *Front Pharmacol.* 2019 Aug 9;10:888.
42. Rengo G, Cannavo A, Liccardo D, et al. (2013) Vascular endothelial growth factor blockade prevents the beneficial effects of b-blocker

therapy on cardiac function, angiogenesis, and remodeling in heart failure. *Circ Heart Fail* 6:1259–1267

43. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, et al.

Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):1020-32.

44. de Lucia C, Gambino G, Petraglia L, et al. Long-Term Caloric

Restriction Improves Cardiac Function, Remodeling, Adrenergic Responsiveness, and Sympathetic Innervation in a Model of

Postischemic Heart Failure. *Circ Heart Fail*. 2018 Mar;11(3):e004153.

45. Parisi V, Rengo G, Perrone-Filardi P, et al. Increased Epicardial

Adipose Tissue Volume Correlates With Cardiac Sympathetic

Denervation in Patients With Heart Failure. *Circ Res*. 2016 Apr

15;118(8):1244-53.

46. Kishore R, Krishnamurthy P, Garikipati VN, et al. Interleukin-

10 inhibits chronic angiotensin II-induced pathological autophagy. *J*

Mol Cell Cardiol. 2015 Dec;89(Pt B):203-13.

47. Chong CM, Kou MT, Pan P, et al. Discovery of a novel ROCK2 inhibitor with anti-migration effects via docking and high-content drug screening. *Mol Biosyst.* 2016 Aug 16;12(9):2713-21.
48. Anversa P, Puntillo E, Nikitin P, et al. Effects of age on mechanical and structural properties of myocardium of Fischer 344 rats. *Am J Physiol.* 1989 May;256(5 Pt 2):H1440-9.
49. Capasso JM, Palackal T, Olivetti G, et al. Severe myocardial dysfunction induced by ventricular remodeling in aging rat hearts. *Am J Physiol.* 1990 Oct;259(4 Pt 2):H1086-96.
50. Boyle AJ, Shih H, Hwang J, et al. Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy. *Exp Gerontol.* 2011 Jul;46(7):549-59.
51. Dai DF, Santana LF, Vermulst M, et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation.* 2009 Jun 2;119(21):2789-97.

52. Balasubramanian P, Hall D, Subramanian M.

Sympathetic nervous system as a target for aging and obesity-related cardiovascular diseases. *Geroscience*. 2019 Feb;41(1):13-24.

53. Boluyt MO, Converso K, Hwang HS, et al.

Echocardiographic assessment of age-associated changes in systolic and diastolic function of the female F344 rat heart. *J Appl Physiol* (1985). 2004 Feb;96(2):822-8.