

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI

XXXVIII Ciclo

(Anni 2022-2025)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

**IL RUOLO DEL PATHWAY DELL'ACTIVINA NELL'IPERTENSIONE
POLMONARE CRONICA TROMBOEMBOLICA**

TUTOR/RELATORE

Chiar.mo

Prof. Carlo Gabriele Tocchetti

CANDIDATA

Dott.ssa Alessandra Cuomo

SOMMARIO

ABSTRACT	4
CAPITOLO 1: IPERTENSIONE POLMONARE.....	6
<i>1.1 Ipertensione polmonare cronica tromboembolica</i>	9
<i>1.1.1 Fattori di rischio per lo sviluppo di CTEPH.....</i>	9
<i>1.1.2 Work-up diagnostico per la diagnosi di CTEPH</i>	10
<i>1.1.3 Fisiopatologia della CTEPH.....</i>	13
<i>1.1.4 Terapia della CTEPH.....</i>	15
CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO	18
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	20
<i>3.1 Popolazione in studio</i>	20
<i>3.2 Outcome</i>	21
<i>3.3 Dosaggio dei biomarcatori plasmatici</i>	21
<i>3.4 Immunofluorescenza e valutazione mediante microscopiaconfocale</i>	22
<i>3.5 Western blot</i>	23
<i>3.6 Analisi statistica.....</i>	23
CAPITOLO 4: RISULTATI	25
<i>4.1 Caratteristiche della popolazione in studio e confronto con i controlli</i>	25
<i>4.2 Livelli plasmatici per-PEA dei biomarcatori nei pazienti con CTEPH.....</i>	26
<i>4.3 Biomarcatori predittivi di risposta chirurgica</i>	27
<i>4.4 Variazioni dinamiche dei biomarcatori post-PEA</i>	31
<i>4.5 Espressione vascolare polmonare della via dell'activina</i>	32
CAPITOLO 5: DISCUSSIONE	37
<i>5.1 Limiti dello studio</i>	42
CAPITOLO 6: CONCLUSIONI.....	44
BIBLIOGRAFIA	45

ABSTRACT

Background: L'ipertensione polmonare cronica tromboembolica (*chronic thromboembolic pulmonary hypertension* - CTEPH) è caratterizzata dalla presenza di un'ostruzione persistente a livello del circolo vascolare polmonare, legata a lesioni tromboemboliche non risolte e al conseguente rimodellamento vascolare polmonare distale. Diversi studi recenti hanno dimostrato il ruolo del pathway dell'attivina nella fisiopatologia del rimodellamento vascolare polmonare, ma il suo coinvolgimento nella CTEPH rimane ancora poco esplorato.

In questo studio abbiamo esplorato la presenza di componenti della via dell'attivina nella microvasculopatia della CTEPH e ne abbiamo valutato il potenziale valore come biomarcatori.

Materiali e Metodi: livelli plasmatici di diversi biomarcatori della via dell'attivina e di alcuni mediatori dell'infiammazione sono stati valutati in pazienti con CTEPH candidati a trattamento chirurgico, sia prima che dopo l'intervento chirurgico, e confrontati, inoltre con i livelli presenti in soggetti sani. In particolare, sono stati analizzati i livelli plasmatici di attivina-A, attivina-B, endotelina-1, FSTL3, chemioquina C-X-C ligando 9 (CXCL9), fattore di crescita dei nervi β (β -NGF), proteina C-reattiva (PCR), pro-peptide natriuretico cerebrale (pro-BNP), proteina morfogenica dell'osso-9 (BMP-9) e TRAIL. La concentrazione plasmatica di tali proteine è stata valutata prima dell'intervento chirurgico in pazienti con CTEPH e confrontata con quella dei soggetti sani arruolati come controlli.

Sono stati arruolati 69 pazienti (età media 62 ± 13 anni, 51% uomini) affetti da CTEPH candidati ad intervento chirurgico di endoarteriectomia polmonare (*pulmonary endoarterectomy* – PEA). Di questi, a 6 mesi dall'intervento chirurgico, 29 presentavano ipertensione polmonare residua mentre 2 sono deceduti dopo l'intervento di PEA. Inoltre, in un sottogruppo di 22 pazienti è stato possibile analizzare i livelli di questi biomarcatori a 6 mesi dall'intervento di PEA.

Risultati: i pazienti con CTEPH, prima dell'intervento di PEA, hanno mostrato livelli aumentati di attivina-A, attivina-B, FSTL3, chemioquina C-X-C ligando 9 (CXCL9), fattore di crescita nervoso beta (β -NGF), proteina C-reattiva (CRP) e pro-peptide natriuretico cerebrale (pro-BNP) rispetto ai controlli.

I livelli preoperatori di attivina-A sono risultati associati a un rischio aumentato di ipertensione polmonare residua o mortalità post-operatoria (odds ratio 2,469 [IC 95%, 1,011 – 5,487]; $p=0,027$), dopo correzione per età, pressione arteriosa polmonare media (*mean pulmonary arterial pressure* - m-PAP) pre-PEA e PCR.

L'analisi istologica di campioni di tessuto polmonare di pazienti con CTEPH ha rivelato un accumulo nucleare di Smad2 fosforilato e una sovra-regolazione di inibina- β A, inibina- β B, recettore dell'activina di tipo IIB (ACTRIIB) e FSTL3 nelle arteriole polmonari muscolarizzate, suggestivo di un'iperattivazione del pathway dell'activina in questi tessuti.

Conclusioni: questi risultati suggeriscono che il pathway dell'activina possa essere coinvolto nella fisiopatogenesi della microvasculopatia dei pazienti affetti da CTEPH e che l'activina-A possa avere un potenziale ruolo come biomarcatore predittivo di ipertensione polmonare residua dopo endoarteriectomia polmonare nei pazienti con CTEPH.

Ulteriori ricerche sulla via dell'activina potrebbero portare all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento del rimodellamento vascolare associato alla CTEPH.

Keywords:

Ipertensione polmonare tromboembolica cronica (CTEPH); Ipertensione polmonare residua; Rimodellamento vascolare polmonare; Via dell'activina; Biomarcatori.

CAPITOLO 1: IPERTENSIONE POLMONARE

L'ipertensione polmonare (*pulmonary hypertension* – PH) si caratterizza per un aumento anomalo delle pressioni a livello del circolo vascolare polmonare e può essere legata alla presenza di diverse patologie cardiovascolari o dell'apparato respiratorio. È una condizione complessa il cui trattamento richiede un approccio olistico e multidisciplinare. La PH presenta una prevalenza dell'1% circa nel complesso della popolazione mondiale¹.

Secondo le più recenti linee guida della società europea di cardiologia e della società europea di malattie dell'apparato respiratorio (*European Society of Cardiology/European Respiratory Society* – ESC/ERS) la PH è definita dalla presenza di una pressione arteriosa polmonare media (*mean pulmonary arterial pressure* - mPAP) > 20 mmHg, valutata mediante cateterismo cardiaco destro. Nella definizione emodinamica di PH è importante anche valutare, sempre mediante cateterismo cardiaco destro, le resistenze vascolari polmonari (*pulmonary vascular resistance* – PVR) e la pressione di incuneamento capillare polmonare (*pulmonary arterial wedge pressure* – PAWP). Infatti, la PH si divide in una forma pre-capillare, caratterizzata da $PAWP \leq 15$ mmHg e $PVR > 2$ unità Wood (*Wood units* – WU), una forma post-capillare, caratterizzata da $PAWP > 15$ mmHg e $PVR \leq 2$ WU ed una forma combinata, caratterizzata da $PAWP > 15$ mmHg e $PVR > 2$ WU¹.

L'attuale classificazione clinica della PH individua 5 sottogruppi principali:

- **Gruppo 1:** ipertensione arteriosa polmonare (*pulmonary arterial hypertension* - PAH). Comprende PH idiopatica, ereditaria, iatrogena, associata a connettivo-patie, a infezione da virus dell'immunodeficienza umana o a schistosomiasi, associata a patologie cardiache congenite, associata alla presenza di ipertensione portale, PAH con coinvolgimento veno-capillare e la PH persistente del neonato.
- **Gruppo 2:** PH associata a patologie del cuore sinistro. Di questo gruppo fanno parte le forme di PH legate a insufficienza cardiaca, sia a ridotta che preservata frazione di eiezione, forme legate a valvulopatia del cuore sinistro, forme legate a qualsiasi cardiopatia congenita o acquisita. Sono tutte forme caratterizzate da PH post-capillare.
- **Gruppo 3:** PH associata a patologie dell'apparato respiratorio e/o ad ipossia. Comprende forme dovute alla presenza di enfisema polmonare o altre patologie ostruttive polmonari, forme legate a patologie restrittive polmonari o con pattern

misti di patologie polmonare restrittiva/ostruttiva, forme legate a sindromi caratterizzate dalla presenza di iperventilazione, condizioni di ipossiemia anche in assenza di patologie respiratorie di base (per esempio la PH da altitudine)

- **Gruppo 4:** comprende forme caratterizzate dalla presenza di ostruzione arteriosa del circolo vascolare polmonare. Di questo gruppo fa parte l'ipertensione polmonare cronica tromboembolica (*chronic thromboembolic pulmonary hypertension* - CTEPH). Altre forme rare di ostruzione del circolo arterioso polmonare sono legate alla presenza di angiosarcomi dell'arteria polmonare, stenosi congenita dell'arteria polmonare, idatidosi, presenza di tumori maligni o benigni con coinvolgimento dell'arteria polmonare.
- **Gruppo 5:** di questo gruppo fanno parte forme di PH caratterizzate da meccanismi fisiopatologici non ancora chiariti o misti, come forme legate a patologie ematologiche, forme legate a malattia renale cronica, fibrosi mediastinica, disordini metabolici o sistemici.

Data la complessità fisiopatologica delle diverse forme, il trattamento differisce tra i vari gruppi. Per esempio, il trattamento delle forme del Gruppo 2, legato a patologia del cuore sinistro, si basa principalmente sul trattamento della patologia cardiaca di base, seguendo quelle che sono le più recenti linee guida. Stesso discorso per quanto riguarda le forme del Gruppo 3 per cui il trattamento di elezione si basa sul trattamento della patologia respiratoria alla base dell'insorgenza di PH¹.

In questo capitolo ci concentreremo soprattutto sulla fisiopatologia e sul trattamento della CTEPH, appartenente al Gruppo 4.

La **Figura 1** riassume le caratteristiche principali delle diverse forme di PH.

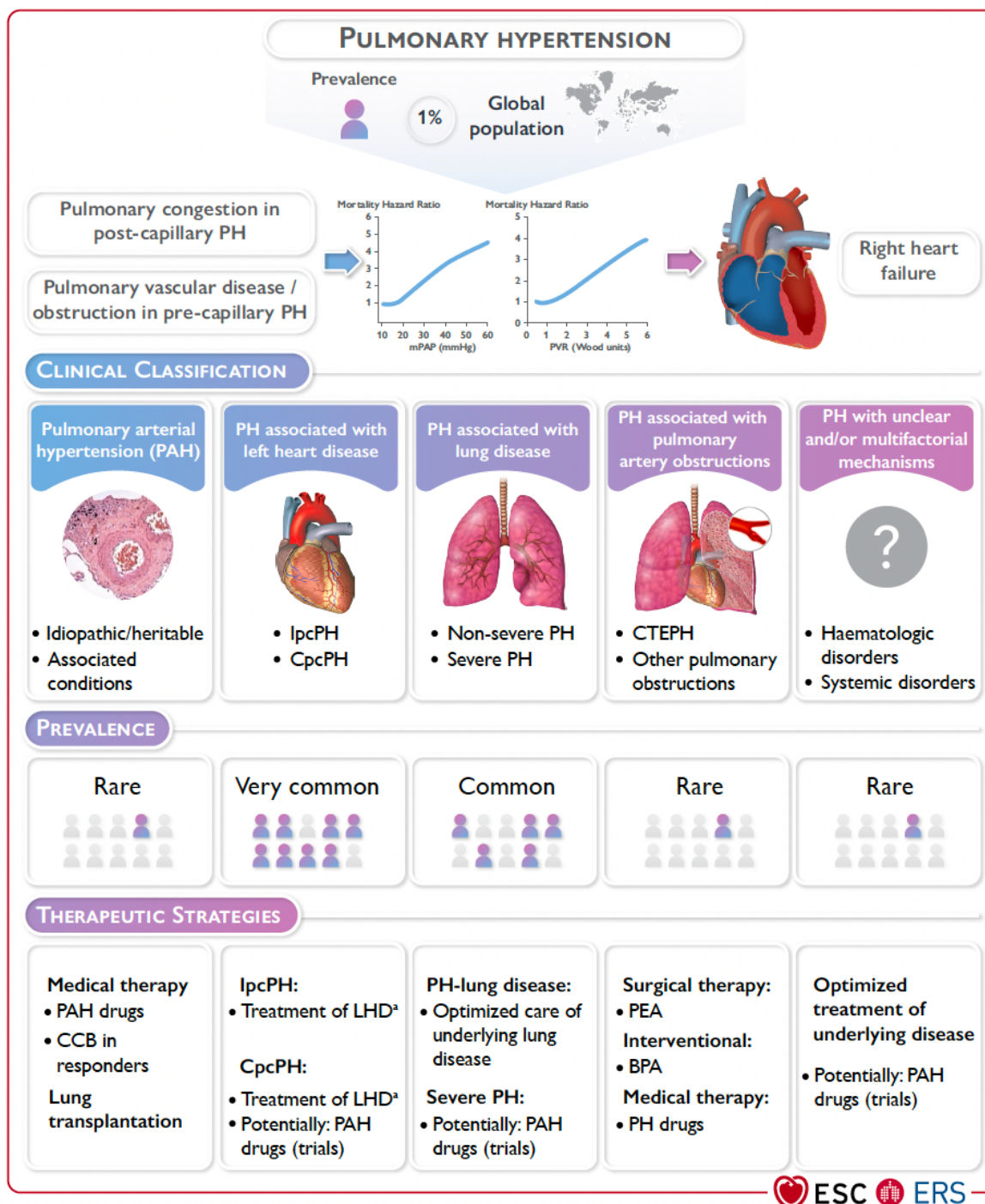


Figura 1. Classificazione dell'ipertensione polmonare.

Lista delle abbreviazioni: BPA, angioplastica polmonare; CCB, bloccanti del canale del calcio; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; CpCPH, ipertensione polmonare combinata pre- e post- capillare; IpcPH, ipertensione polmonare isolata post-capillare; LHD, patologia del cuore sinistro; PAH, ipertensione arteriosa polmonare; PEA, endoarteriectomia polmonare; PH, ipertensione polmonare. ^a trattamento dell'insufficienza cardiaca secondo le linee guida ESC per la diagnosi ed il trattamento dell'insufficienza cardiaca acuta e cronica¹

1.1 Ipertensione polmonare cronica tromboembolica

La CTEPH, come precedentemente accennato, è una forma rara di ipertensione polmonare precapillare legata alla presenza di materiale ostruttivo a carico del circolo vascolare polmonare. Da un punto di vista epidemiologico, la sua incidenza è aumentata negli ultimi decenni, soprattutto grazie ad una maggiore conoscenza della patologia che ha portato ad una maggiore diffusione di programmi di screening più accurati delle popolazioni a rischio. Dati estrapolati dai registri nazionali suggeriscono che l'incidenza di CTEPH sia di 5-6 casi ogni milione di adulti, con una prevalenza di 26-38 casi ogni milione di adulti^{2,3}. Alcuni pazienti inoltre presentano una malattia polmonare tromboembolica cronica (*chronic thromboembolic pulmonary disease* – CTED) in assenza di aumento delle pressioni del circolo polmonare. Se la CTED sia una malattia a sé stante o se sia lo stato iniziale della CTEPH è ancora da chiarire, così come non è ancora completamente noto quali siano i fattori di rischio di evoluzione da CTED a CTEPH. Per quanto riguarda la CTED è definita, in pazienti sintomatici per dispnea, dalla presenza di mismatch ventilo-perfusivi alla scintigrafia polmonare ventilo-perfusoria (V/Q scan), associati al rilievo delle tipiche ostruzioni croniche, organizzate e fibrotiche valutate mediante angio-TC polmonare o all'angiografia a sottrazione digitale (DSA), quali stenosi ad anello, web/slits, riscontrate almeno 3 mesi dopo terapia anticoagulante. La presenza di dispnea nei pazienti affetti da CTED potrebbe essere legata alla presenza di PH da sforzo e/o all'aumento dello spazio morto ventilatorio.

1.1.1 Fattori di rischio per lo sviluppo di CTEPH

Diversi fattori sembrano contribuire all'aumento di rischio di sviluppo di CTEPH. Innanzitutto, è importante chiarire che lo 0,1-11,8% dei pazienti che sviluppano CTEPH presentano anamnesi patologica prossima o remota di embolia polmonare. Tale percentuale tende a variare molto a seconda dei registri consultati, esistendo delle importanti differenze etniche e quindi geografiche nell'epidemiologia della CTEPH¹.

Esistono quindi, una serie di condizioni concomitanti che aumentano il rischio di sviluppo di CTEPH in seguito ad un evento di embolia polmonare acuta, come mostrato in **Tabella 1**⁴.

Dopo un evento di embolia polmonare, secondo le più recenti linee guida, si deve offrire lo screening per CTEPH a tutti i pazienti che presentano sintomi suggestivi, quali dispnea

persistente o di nuova insorgenza dopo un evento di embolia polmonare, così come pazienti che presentano mismatch ventilo-perfusivo dopo 3 mesi di anticoagulazione ottimale post-evento embolico polmonare. Infine, pazienti ad alto rischio di sviluppare CTEPH dopo un evento di embolia polmonare dovrebbero essere sottoposti a screening dopo 3-6 mesi dall'evento a prescindere dalla presenza di sintomi suggestivi di CTEPH, come per esempio pazienti affetti da patologia neoplastica maligna^{1,4}.

Condizioni croniche concomitanti e condizioni predisponenti allo sviluppo di CTEPH (al momento della diagnosi di embolia polmonare acuta o al follow-up a 3-6 mesi)

Shunt ventricolo-arteriosi

Presenza di infezioni a carico di cateteri di dispositivi intracardiaci o di cateteri endovenosi cronici

Pregressa splenectomia

Disturbi trombofilici, in particolare sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi e alti livelli del fattore VIII della coagulazione

Gruppo sanguigno non 0

Ipotiroidismo in terapia con ormoni tiroidei

Anamnesi positiva per neoplasie maligne

Disordini mieloproliferativi

Malattia infiammatoria cronica intestinale

Osteomielite cronica

***Tabella 1.** Condizioni croniche concomitanti e condizioni predisponenti allo sviluppo di CTEPH (al momento della diagnosi di embolia polmonare acuta o al follow-up a 3-6 mesi). Adattato dalle linee guida ESC/ERS per la diagnosi ed il trattamento dell'embolia polmonare⁴*

1.1.2 Work-up diagnostico per la diagnosi di CTEPH

Considerando che PH di Gruppo 1 e CTEPH presentano alcune differenze sostanziali in termine di gestione terapeutica, è fondamentale effettuare una corretta diagnosi. Come già accennato, tutti i pazienti che presentano dispnea persistente o refrattaria insorta dopo un episodio noto di embolia polmonare acuta dovrebbero effettuare lo screening per CTEPH, dopo almeno 3 mesi di terapia anticoagulante ottimizzata. Inoltre, tutti i pazienti, anche asintomatici con fattori di alto rischio di sviluppare CTEPH, come i pazienti oncologici, dovrebbero effettuare lo screening dopo 3 mesi di terapia anticoagulante ottimizzata in seguito ad episodio di embolia polmonare acuta. Infine, in tutti i pazienti con ipertensione polmonare precapillare di nuova diagnosi può essere opportuno eseguire lo screening per la CTEPH in caso suggestivi¹.

Purtroppo, in comune con tutte le forme di PH, i segni e sintomi suggestivi di CTEPH sono altamente aspecifici, essendo i più comuni dispnea da sforzo, sincope, affaticamento generalizzato, tosse ed emottisi, cardiopalmo, edema degli arti inferiori, segni di congestione

venosa e insufficienza del cuore destro, cianosi. Tutti i pazienti che presentano tali segni e sintomi dovrebbero eseguire un Eco Color Doppler Cardiaco a riposo, che rappresenta il primo esame di screening per tutte le forme di PH¹.

Il work-up diagnostico di CTEPH nei pazienti è illustrato nella **Figura 2**.

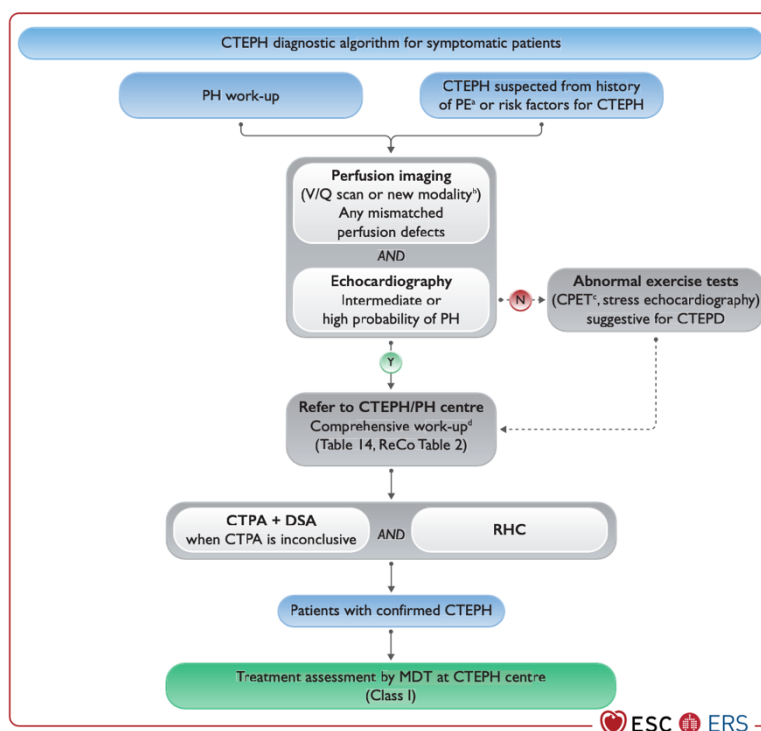


Figura 2. Work-up diagnostico del paziente CTEPH¹.

Lista delle abbreviazioni: CPET, test da sforzo cardiopolmonare; CTEPD, malattia tromboembolica polmonare; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; CTPA, angio-TC polmonare; DECT, tomografia computerizzata dual-energy; DSA, angiografia a sottrazione digitale; MDT, team multidisciplinare; MRI, risonanza magnetica; PE, embolia polmonare; $P_{ET}CO_2$, pressione parziale end-tidale della CO_2 ; PH, ipertensione polmonare; ReCo, raccomandazioni; RHC, cateterismo cardiaco destro; sPAP, pressione arteriosa polmonare sistolica; V/Q, ventilo-perfusivo; VE/ VCO_2 , equivalente respiratorio della CO_2 ; VO_2/HR , polso di ossigeno; VO_2 consumo di ossigeno; Y, sì. ^a CTEPH sospettata sulla base dell'anamnesi di PE e presenza di aumento sPAP all'ecocolordoppler cardiaco a riposo e segni suggestivi di CTEPH alla CTPA eseguita nel momento della PE acuta. ^b In fase di valutazione: tecniche alternative di imaging a perfusione, come la mappatura con sottrazione dello iodio, la DECT e la MRI. ^c Il pattern tipico include una bassa $P_{ET}CO_2$, un rapporto VE/ VCO_2 elevato, un basso VO_2/HR e un basso VO_2 di picco. ^d Una valutazione diagnostica completa deve essere effettuata dopo 3 mesi di terapia anticoagulante, o prima in pazienti instabili o in rapido peggioramento.

La diagnosi di CTEPH dovrebbe essere presa in considerazione in tutti quei pazienti in cui riscontriamo segni radiologici, valutati con angio-TC o DSA, suggestivi di CTEPH, quali stenosi ad anello dei vasi arteriosi polmonari e/o presenza di web/slits, in concomitanza o meno della presenza di una pressione polmonare sistolica stimata > 60 mmHg valutata mediante Eco Color Doppler cardiaco a riposo¹.

Per quando riguarda i rilievi ecocardiografici suggestivi di PH sono riassunti in **Figura 3**.

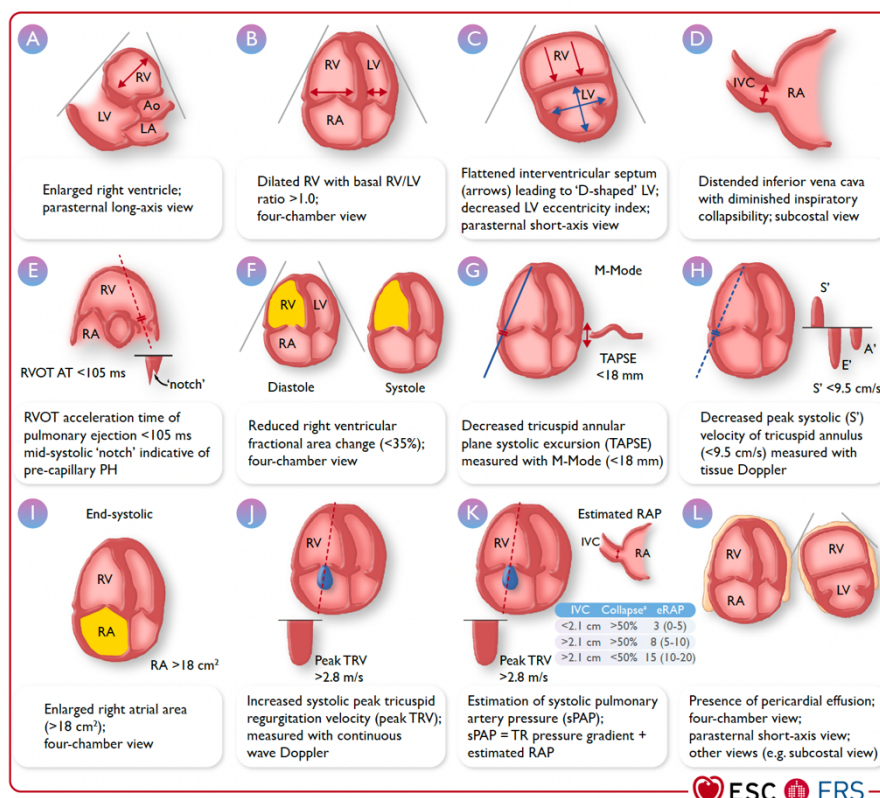


Figura 3. Parametri all'ecocardiografia transtoracica per la valutazione dell'ipertensione polmonare¹.

Lista delle abbreviazioni: Ao, aorta; IVC, vena cava inferiore; L, atrio sinistro; LV, ventricolo sinistro; PH, ipertensione polmonare; RA, atrio destro; RAP, pressione atriale destra; RV, ventricolo destro; RVOT AT, tempo di accelerazione del flusso a livello del tratto di efflusso del ventricolo destro; sPAP, pressione arteriosa polmonare sistolica; TAPSE, escursione del piano valvolare tricuspidalico; TR, insufficienza tricuspidalica; TRV, velocità dell'insufficienza tricuspidalica. ^a si riferisce al collassamento inspiratorio.

In presenza di un jet di insufficienza tricuspidalica $\leq 2,8$ m/s la probabilità di PH risulta bassa, soprattutto in assenza di altri segni ecocardiografici di PH, quali quelli mostrati in **Figura 3**. In caso di velocità comprese tra 2,9 e 3,4 m/s la probabilità di presenza di PH risulta intermedia, in assenza di altri segni ecocardiografici indiretti di PH, oppure alta quando tali segni sono presenti. Infine, nel caso in cui la velocità del jet trans-tricuspidalico sia $> 3,4$ m/s la probabilità di PH risulta alta, a prescindere dalla presenza di altri segni ecocardiografici indiretti. Il ruolo dell'ecocardiografia nella diagnosi di PH risulta ancora più fondamentale se consideriamo che le forme del Gruppo 2, definite post-capillari pure, sono in larga parte diagnosticabili direttamente durante l'esame ecocardiografico, potendo risparmiarsi così al paziente ulteriori esami¹.

In tutti i casi in cui, invece, possiamo sospettare la presenza di forme del Gruppo 1 o del Gruppo 4, come di nostro interesse in questo caso, è necessario sottoporre il paziente a cateterismo cardiaco destro per la valutazione delle pressioni del circolo polmonare¹. Come

mostrato in **Figura 2** una volta posto il sospetto ecocardiografico di CTEPH è fondamentale eseguire esami di *imaging perfusionale* per valutare la presenza di mismatch ventilo/perfusivi compatibili con la diagnosi di CTEPH. Tra tutti, l'esame di scelta è la scintigrafia ventilo-perfusiva. Alternative sono descritte in **Figura 2**. È, inoltre, importante effettuare un angio-TC del circolo polmonare per quantificare l'estensione e la localizzazione dell'ostruzione polmonare, soprattutto fondamentale per l'individuazione del corretto approccio terapeutico. Ovviamente, un'angio-TC negativa, soprattutto se di bassa qualità può richiedere, in caso di forse sospetto di CTEPH, *imaging* complementare, come l'angiografia a sottrazione digitale per lo studio del circolo vascolare polmonare¹.

Una volta confermata la presenza dei difetti di perfusione tipici, si può procedere con il cateterismo cardiaco destro, che come già menzionato, rappresenta non solo il *gold standard* diagnostico della PH, ma risulta essere fondamentale per caratterizzare il paziente affetto da CTEPH¹.

Ovviamente in questa fase è anche fondamentale escludere altre cause appartenenti al Gruppo 4 di PH, quali sarcomi dell'arteria polmonare, presenza di altre patologie neoplastiche maligne con interessamento dell'arteria polmonare (come, ad esempio, carcinomi uterini, tumori a cellule germinali testicolari o carcinomi renali), patologia tumorale benigna (quali leiomioma uterino), stenosi acquisite o congenite dell'arteria polmonare, arteriti dei grandi vasi polmonari in assenza di connettivopatie concomitanti, o la presenza di parassiti con trofismo per il circolo polmonare che possono essere causa di ostruzione arteriosa polmonare, come ad esempio le cisti da *Ecchinococcus*¹.

1.1.3 Fisiopatologia della CTEPH

Come abbiamo già detto la CTEPH è una condizione grave caratterizzata dalla presenza di un'ostruzione delle arterie polmonari, che si manifesta spesso dopo un episodio noto di embolia polmonare, ed è dovuta a trombi organizzati residui, che possono localizzarsi a livello delle arterie prossimali o sub-segmentarie. Questa ostruzione cronica determina un progressivo rimodellamento vascolare distale non trombotico, che comporta un aumento cronico della pressione arteriosa polmonare media (mPAP) e della resistenza vascolare polmonare (PVR), con conseguente possibile insufficienza ventricolare destra se non trattata¹.

Lo sviluppo di CTEPH è complesso e coinvolge diversi fattori. Da un punto di vista anatomico, sono due i principali attori coinvolti nel processo di aumento delle pressioni polmonare vascolari e aumento delle resistenze vascolari polmonari. Da un lato abbiamo la presenza di un coagulo fibro-trombotico cronico che determina un'ostruzione a carico delle arterie polmonari, dall'altro si attivano una serie di meccanismi fisiopatologici che determinano la comparsa di microvasculopatia del circolo vascolare polmonare¹.

Per quanto riguarda le caratteristiche del materiale trombotico reperibile nei vasi arteriosi polmonari dei pazienti affetti da CTEPH, questo è drasticamente diverso rispetto ai trombi reperibili nei vasi dei pazienti affetti da embolia polmonare. In particolare, il trombo presente in vasi con embolia polmonare acuta è un trombo “fresco”, che mediamente si risolve con il trattamento anticoagulante. Invece, il materiale fibrotrombotico presente nei vasi dei pazienti affetti da CTEPH è caratterizzato da materiale fortemente organizzato, presenta un'alta concentrazione di elastina e collagene, che gli dona il caratteristico colore giallo, ed è fortemente aderente alle pareti del vaso arterioso polmonare. In ultimo, caratteristica tipica del materiale trombotico cronicamente apposto nei vasi dei pazienti affetti da CTEPH è la ricanalizzazione del trombo, cioè la presenza di una rivascolarizzazione a valle dell'ostruzione, legata ad un processo cronico di ricanalizzazione attraverso il materiale di apposizione trombotica^{3,5}. Meno di frequente è possibile reperire anche aree di calcificazione all'interno del materiale trombotico.

La presenza di questo materiale trombotico che determina ostruzione cronica del letto arterioso polmonare è responsabile dell'attivazione di meccanismi di rimodellamento vascolare polmonare, indotte e potenziate anche dalla presenza di difetti dell'angiogenesi, alterazione dei meccanismi di fibrinolisi e disfunzione endoteliale che possono coesistere. Non è ancora fino in fondo chiarito come e quanto questi diversi processi contribuiscano, nei pazienti che sviluppano CTEPH, all'instaurarsi di un quadro di microvasculopatia che, sorprendentemente, interessa non solo le aree a valle di vasi occlusi dalla presenza del materiale fibro-trombotico sopra descritto, ma anche arteriole di aree la cui vascolarizzazione non è stata coinvolta^{3,5}.

Recenti studi suggeriscono che nell'instaurarsi della microvasculopatia presente nelle arteriole distali dei pazienti affetti da CTEPH possano essere implicate le stesse vie che sono alla base della fisiopatogenesi delle forme di PAH del Gruppo 1. In particolare, la disregolazione delle vie di segnalazione del monossido di azoto, dell'endotelina-1 e della

prostaciclina potrebbero giocare un ruolo fondamentale nel rimodellamento dei piccoli vasi dei pazienti affetti da CTEPH, proprio come succede nei pazienti affetti da PAH^{3,5}.

Diverse evidenze suggeriscono che ci siano delle similitudini tra la fisiopatologia della microvasculopatia dei pazienti affetti da CTEPH e quelli affetti da PAH di Gruppo 1, avvalorati anche dall'evidenza che farmaci vasodilatatori polmonari tipicamente impiegati nel trattamento della PAH possono trovare un ruolo importante nel trattamento dei pazienti affetti da CTEPH¹.

Infine, è stato dimostrato che l'infiammazione cronica che si instaura in tali pazienti possa contribuire, come accade per la PAH di Gruppo 1, all'instaurarsi ed alla progressione del danno vascolare polmonare^{6,7}.

1.1.4 Terapia della CTEPH

Il trattamento della CTEPH, si avvale di un approccio multimodale basato sulla rimozione meccanica del materiale tromboembolico organizzato nelle forme prossimali di CTEPH, e sulla terapia medica, nelle forme distali e combinate¹, come mostrato in **Figura 4**.

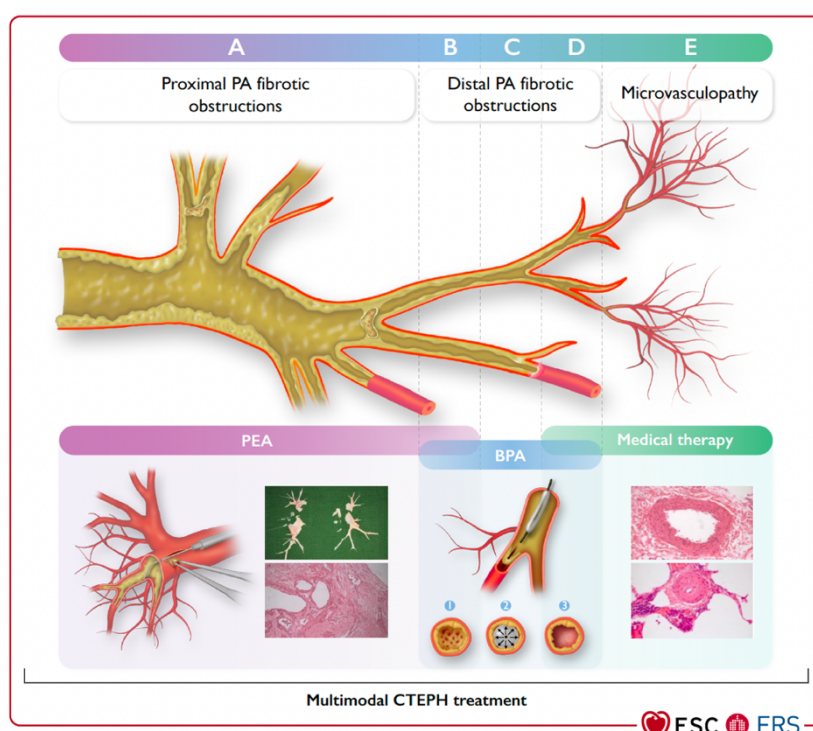


Figura 4. Approccio multimodale nel trattamento della CTEPH.

Lista delle abbreviazioni: BPA, angioplastica polmonare; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; PA, arteria polmonare; PEA, endoarteriectomia polmonare; Pannello superiore: (A) ostruzione fibrotica prossimale dell'arteria polmonare (diametro vascolare di 10-40 mm). (B) ostruzione fibrotica distale segmentaria e sub-segmentaria della PA potenzialmente candidabile sia a PEA che BPA (diametro vascolare 2-10 mm). (C) Ostruzioni fibrotiche a carico dei vasi sub-segmentari della PA con *web-lesion* nei vasi sub-segmentari candidabile a BPA (diametro vascolare di 0,5-1 mm). (D) Ostruzioni fibrotiche a carico dei vasi sub-segmentari della PA con *web-lesion* nei vasi sub-segmentari con possibile concomitanza di microvasculopatia (diametro dei vasi di < 0,5 mm). (E) Microvasculopatia (diametro dei vasi < 0,5 mm) candidabile a terapia medica.

Per le forme più prossimali si può ricorrere all'intervento di endoarteriectomia polmonare (PEA) che consiste nella rimozione meccanica del trombo. Viene incisa l'arteria polmonare di destra e viene introdotto un dissetto a suzione posto tra il materiale fibrotrombotico e la parete del vaso, scollando il coagulo adeso alle pareti vascolari per tutta la lunghezza del vaso, fino al livello segmentario e sub-segmentario del circolo vascolare polmonare. Si procede poi alla rimozione del materiale fibro-trombotico. Data l'invasività dell'intervento e la sua complessità, tale chirurgia viene eseguita solo in centri esperti e, se il materiale ostruttivo risulta localizzato solo nella parte prossimale del vaso e viene completamente rimosso, tale intervento può portare ad una guarigione completa del paziente. Purtroppo, alcuni pazienti risultano non idonei, anche nei centri più esperti, ad eseguire questo tipo di chirurgia, sia per problemi legati alla localizzazione delle lesioni trombotiche, sia per quanto riguarda patologie concomitanti e condizioni cliniche tali da rendere l'intervento troppo rischioso¹.

In forme miste e/o caratterizzate da interessamento distale e sub-segmentario del circolo polmonare si può ricorrere ad un altro approccio invasivo per la rimozione del materiale ostruttivo, l'angioplastica polmonare. In questo approccio si introduce una sonda tra il materiale trombotico ed il vaso e si gonfia il pallone emodinamico per scollare il materiale e rompere le *web* di materiale trombotico apposto alla parete del vaso¹.

Infine, forme caratterizzate dalla presenza di microvasculopatia possono giovare della terapia medica a base di vasodilatatori polmonari specifici. In particolare, per il trattamento della CTEPH è indicato l'uso di farmaci in grado di stimolare la guanilato-ciclasa solubile (sGCs), aumentando così la produzione polmonare di ossido nitrico, di cui l'unico attualmente in commercio è il riociguat. Tale molecola si è dimostrata efficace nel ridurre le PVR e aumentare la distanza percorsa al test del cammino dopo già 16 settimane di terapia in pazienti affetti da CTEPH inoperabile o persistente dopo PEA^{8,9}. Anche il treprostinil, un analogo di sintesi della prostaciclina e potente vasodilatatore polmonare è approvato per il trattamento dei pazienti affetti da CTEPH¹⁰. Infine, dati preliminari indicano che la somministrazione di macitentan e bosentan, antagonisti del recettore dell'endotelina-1, sia associata ad un miglioramento dei parametri emodinamici e clinici dei pazienti affetti da CTEPH^{1,10,11}.

Oltre al trattamento delle eventuali comorbidità, i pazienti affetti da CTEPH dovrebbero essere sottoposti a terapia anticoagulante a vita con farmaci inibitori della vitamina K. Dati preliminari suggeriscono che anche gli anticoagulanti orali possono essere utilizzati in questi pazienti, ma i risultati degli studi sono ancora controversi¹.

Nonostante la combinazione di approcci terapeutici, una percentuale significativa di pazienti continua a presentare PH persistente e/o ricorrente, suggerendo che ci possa essere una persistenza della microvasculopatia in questi soggetti. Purtroppo, le moderne tecniche di imaging e gli strumenti diagnostici a nostra disposizione non consentono di caratterizzare l'entità della microvasculopatia, che viene dedotta, indirettamente, dalla persistenza di aumentate PVR¹.

CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO

È quindi chiaro che una percentuale significativa di pazienti affetti da CTEPH presenti persistenza di PH nonostante terapia medica e chirurgica ottimale, suggestivo di presenza di microvasculopatia, ed è altresì evidente che gli strumenti diagnostici attualmente disponibili non siano in grado di caratterizzare e quantificare l'entità dell'interessamento dei piccoli vasi polmonari, né tantomeno di prevedere quali pazienti svilupperanno PH persistente post-terapia invasiva. In questo contesto si rende indispensabile lo sviluppo di nuovi tool diagnostici in grado di identificare e caratterizzare la microvasculopatia dei pazienti affetti da CTEPH, inclusi nuovi biomarcatori di danno microvascolare.

Recenti studi hanno dimostrato che il rimodellamento vascolare distale tipico delle forme del Gruppo 1 di PH è legato ad alterazione di un altro pathway, oltre quello dell'endotelina-1 e dell'ossido nitrico. In particolare, in pazienti affetti da PAH diversi studi hanno esplorato l'efficacia del sotatercept, un "*ligand trap*" altamente selettivo per diverse proteine appartenenti alla superfamiglia del TGF- β , tra cui l'attivina-A, mettendo in evidenza che il pathway del TGF- β e dell'attivina-A potrebbero giocare un ruolo fondamentale nella fisiopatogenesi del rimodellamento vascolare tipico dei pazienti con PAH¹²⁻¹⁵. Inoltre, in pazienti affetti da PAH, elevate concentrazioni plasmatiche di attivina-A e FSTL-3 hanno dimostrato avere un valore predittivo positivo di mortalità¹⁶.

Date le similitudini dal punto di vista fisiopatologico che intercorrono tra PAH di Gruppo 1 e la CTEPH, si ritiene sia doveroso valutare che ruolo possa avere il pathway dell'attivina-A nella fisiopatologia della microvasculopatia dei pazienti affetti da CTEPH.

Date le premesse fatte nel capitolo precedente e di quanto appena specificato, appare evidente come esplorare il ruolo del pathway dell'attivina-A in questi pazienti, così come di altri biomarcatori dell'infiammazione possa avere un ruolo prezioso per meglio caratterizzare i soggetti affetti da CTEPH e per una migliore discriminazione diagnostica e terapeutica.

Scopo di questo studio è quindi quello di:

- 1) Dosare le concentrazioni plasmatiche dei ligandi e degli inibitori che compongono il pathway dell'attivina-A per predire la presenza di PH residua dopo PEA
- 2) Esplorare la via di segnalazione dell'attivina nelle lesioni vascolari polmonari di soggetti affetti da CTEPH

L'obiettivo clinico è quello di migliorare la comprensione della fisiopatologia di questa malattia e di chiarirne quali possano essere gli esiti post-chirurgici, così da migliorare la gestione terapeutica dei pazienti CTEPH per definire interventi terapeutici più mirati.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione in studio

Prelievi plasmatici di 76 pazienti incidenti con diagnosi di CTEPH operabile sono stati raccolti tra agosto del 2017 e ottobre 2020, presso il Centro di riferimento francese per l'ipertensione polmonare e successivamente indirizzati al Centro chirurgico Marie Lannelongue di Le Plessis-Robinson per essere sottoposti a PEA. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato prima dell'arruolamento e lo studio è stato condotto in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale, in tutte le sue fasi.

I criteri in inclusione per lo studio sono stati:

- età ≥ 18 anni,
- presenza dei criteri di **ipertensione polmonare precapillare** stabiliti dalle linee guida vigenti al momento dell'arruolamento¹⁷ (prima della pubblicazione delle linee guida ESC/ERS 2022 con i nuovi criteri emodinamici descritti in precedenza):
 - pressione arteriosa polmonare media (mPAP) ≥ 25 mmHg,
 - resistenza vascolare polmonare (PVR) ≥ 3 unità Wood (WU), e
 - pressione capillare polmonare (PCWP) ≤ 15 mmHg 17.
- diagnosi di CTEPH confermata alla discussione multidisciplinare

Sono stati esclusi dallo studio:

- pazienti con diagnosi di CTEPH considerati inoperabili o che hanno rifiutato di sottoporsi all'intervento di PEA
- pazienti affetti da altre forme di PH
- pazienti non in grado di firmare il consenso informato o che hanno rifiutato di partecipare allo studio

Le valutazioni cliniche ed emodinamiche che sono state effettuate prima dell'intervento di PEA (valutazione basale) e ad una distanza di almeno 3 mesi dall'intervento chirurgico comprendevano:

- cateterismo cardiaco destro
- distanza percorsa al test del cammino in 6 minuti (6MWD, *6-minutes walking distance*) effettuato senza incoraggiamento, come da linee guida dell'American Thoracic Association
- valutazione della classe funzionale secondo la New York Heart Association (NYHA-FC, *New York Heart Association- functional class*)

Per tutti i pazienti arruolati nello studio sono stati raccolti, prima dell'intervento, campioni di plasma venoso e, per un sottogruppo di 22 pazienti, sono stati raccolti nuovi campioni plasmatici in un secondo tempo, ad almeno 5 mesi dall'intervento di PEA, durante una visita di controllo.

Come gruppo di controllo, sono stati utilizzati i campioni plasmatici di 43 pazienti (età media 44 ± 13 anni, 65% uomini) forniti dall'Etablissement Français du Sang (EFS, Parigi, Francia) per paragonare i livelli plasmatici dei biomarcatori in esame tra soggetti sani e pazienti affetti da CTEPH operabile.

3.2 Outcome

I pazienti sono stati classificati come “non responders” alla PEA nel caso di una o più delle seguenti:

- decesso entro una settimana dall'intervento chirurgico
- presenza di pressione arteriosa polmonare media (mPAP) ≥ 25 mmHg al cateterismo cardiaco di controllo effettuato al almeno 3 mesi dopo l'intervento di PEA (*cut-off* in accordo alle linee guida vigenti al momento della valutazione)

3.3 Dosaggio dei biomarcatori plasmatici

Il dosaggio dei biomarcatori plasmatici è stato effettuato presso il laboratorio di ricerca UMR_S 999 dell'Université Paris-Saclay/Inserm (Le Kremlin-Bicêtre, Francia), da personale esperto.

Sono state dosate le concentrazioni plasmatiche di:

- **attivina-A** (DAC00B, Biotechne, Boston, MA),
- **FSTL3** (DFLRG0, Biotechne, Boston, MA),
- **attivina-B** (NBP2-66432, Biotechne, Boston, MA),
- **proteina C-reattiva (CRP)** (Quantikine Quickit QK1707, Biotechne, Boston, MA)
- **pro-BNP** (Invitrogen Thermo Fisher Scientific)

utilizzando kit per ELISA specifici, seguendo rigorosamente le istruzioni fornite dal produttore.

La piattaforma Ella Microfluidic (Protein Simple, San Jose, CA) è stata utilizzata per la valutazione della concentrazione plasmatica di:

- **proteina morfogenetica ossea-9 (BMP-9),**
- **chemiochina CXCL9 (C-X-C motif ligand 9),**
- **fattore di crescita nervoso beta (β -NGF),**
- **TRAIL** (ligando induttore di apoptosi correlato al TNF)

3.4 Immunofluorescenza e valutazione mediante microscopia confocale

La valutazione immunofluorescenza è stata eseguita su campioni di tessuto polmonare ottenuta da 6 pazienti affetti da CTEPH non operabile e sottoposti a trapianto di polmone (campioni risalenti ad un'epoca pre-BPA e conservati presso il laboratorio di ricerca UMR_S 999 dell'Université Paris-Saclay/Inserm, non appartenenti ai 76 pazienti arruolati nello studio) e 6 pazienti di controllo affetti da carcinoma polmonare sottoposti a pneumectomia o lobectomia (aree di tessuto lontane dalla neoplasia). Tutti i campioni polmonari sono stati riesaminati mediante analisi istopatologica retrospettivamente per escludere infiltrazioni neoplastiche. Nei pazienti di controllo, inoltre, è stata eseguita un'ecocardiografia transtoracica preoperatoria per escludere la presenza di ipertensione polmonare.

I tessuti polmonari dei pazienti CTEPH e dei controlli sono stati conservati in paraffina e le colorazioni immunofluorescenti sono state effettuate utilizzando i seguenti anticorpi:

- **p-Smad2** (1:200; Cell Signaling, Danvers, MA, USA),
- **catene β dell'attivina: inibina- β A** (1:100; R&D Biotechne, Minneapolis, MN, USA) e **inibina- β B** (1:100; R&D),
- **FSTL3** (1:200; R&D),
- **recettore ACTRIIB** (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA),
- **ALK4** (1:100; Abcam)

Gli studi sono stati eseguiti su sezioni di tessuto dello spessore di 5 μm che, dopo essere state deparaffinate, sono state immerse in tampone di recupero antigenico, saturate con soluzione bloccante, incubate per tutta la notte con anticorpi primari specifici e poi con anticorpi secondari fluorescenti (Thermo Fisher Scientific, Francia). I nuclei sono stati poi marcati con **DAPI** (4',6-diamidino-2-fenilindolo) e i vetrini montati con ProLong Gold antifade reagent.

Per individuare le cellule endoteliali (ECs – *endothelial cell*) e le cellule muscolari lisce delle arterie polmonari (PA-SMCs – *pulmonary artery smooth muscle cell*) sono stati utilizzati, rispettivamente, anticorpi anti-fattore di von Willebrand (vWF) o CD31, e α -actina della muscolatura liscia (Thermo Fisher Scientific).

Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato un microscopio confocale LSM900 (Zeiss, Francia) e per le analisi il software ZEN, per ottenere immagini ad alta risoluzione delle sezioni colorate.

3.5 Western blot

Per l'esecuzione dei western blot i tessuti polmonari dei pazienti affetti da CTEPH e dei pazienti di controllo sono stati omogeneizzati e sonificati in tampone contenente inibitori delle proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich). Dai lisati proteici ottenuti sono stati estratti 30 μg di soluzione, utilizzati poi per la rilevazione delle proteine p-Smad2/3.

3.6 Analisi statistica

I dati clinici dei pazienti affetti da CTEPH sono stati raccolti dal Registro francese dell'Ipertensione Polmonare (PAHTool; Inovultus Ltd., Santa Maria da Feira, Portogallo) e dalle cartelle cliniche ospedaliere dei pazienti ricoverati presso il Centro chirurgico Marie Lannelongue di Le Plessis-Robinson, contenenti informazioni riguardo il periodo perioperatorio dei pazienti arruolati.

La raccolta dati e le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software SPSS Statistics versione 29 (SPSS Inc., Chicago, IL). Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Le variabili categoriche sono state espresse come numeri assoluti e percentuali, mentre la distribuzione delle variabili continue è stata verificata tramite test di Shapiro–Wilk. In caso di variabili con distribuzione normale, queste sono state espresse come media $\pm$ deviazione standard, mentre quelle non normalmente distribuite come mediana e intervallo interquartile (IQR 25°–75° percentile).

Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per confrontare le variabili discrete tra gruppi, il test-T per dati non appaiati per confrontare variabili continue con distribuzione normale, mentre il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare dati non appaiati di variabili continue distribuite non normalmente.

Per valutare le variazioni longitudinali per dati appaiati (tra le concentrazioni plasmatiche al tempo basale e quelle a 5 mesi dall'intervento chirurgico) sono stati utilizzati il test-T per dati appaiati e il test di Wilcoxon per le variabili continue normalmente e non normalmente distribuite, rispettivamente,

Per valutare quali variabili fossero associate alla presenza di PH residua post-chirurgica sono state effettuate regressioni lineari aggiustate per età. Le variabili che risultassero avere una $p < 0,1$ sono state incluse in modelli multivariati effettuati successivamente. Inoltre, ogni biomarcatore facente parte della via dell'attivina è stato valutato in modelli distinti, aggiustati per altre variabili cliniche rilevanti.

Per determinare le soglie ottimali di ciascun biomarcatore sono state utilizzate curve di ROC (*receiver operating characteristic*) mediante indice di Youden.

Per quanto riguarda le colorazioni di immunofluorescenza ed i western blot, i risultati sono stati analizzati con software GraphPad Prism versione 10,0,0 (GraphPad Software, Boston, MA, USA) mediante l'esecuzione di test-T per dati non appaiati.

CAPITOLO 4: RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione in studio e confronto con i controlli

Nel periodo di arruolamento, sono stati raccolti campioni plasmatici di 76 pazienti affetti da CTEPH e considerati operabili.

La coorte finale di pazienti su cui è stata eseguita l'analisi era composta da 69 pazienti (età media 62±13 anni, 51% uomini), in quanto 7 sono stati esclusi, 5 per erronéo campionamento e 2 per mancanza di follow-up clinico e/o emodinamico ad almeno 3 mesi. Le caratteristiche demografiche dei pazienti sono descritte in **Tabella 2**.

Variabili	Prima della PEA (n=69)	Dopo la PEA (≥3 mesi) (n=69)	p-value
Età, anni	65 [57 - 72]		NA
Donne, n (%)	34 (49)		NA
Obesità, n (%)	23 (33)		N/A
≥1 comorbidità CV*, n (%)	38 (55)		N/A
Pregressa neoplasia, n (%)	9 (13)		N/A
Storia di PE acuta, n (%)	58 (84)		N/A
creatinina, µmol/L	83 [71 - 116] (n=65)	87 [72 - 102] (n=63)	0,650
Emoglobina, g/dL	14,6 ± 1,7 (n=59)	13,9 ± 1,5 (n=57)	0,004
6MWD, m	418 ± 126 (n=56)	453 ± 128 (n=63)	<0,001
NYHA-FC I-II/III-IV, n (%)	39 (57)/29 (42) (n=68)	63 (91)/ 4 (6) (n=67)	<0,001
mPAP, mmHg	40 [35 - 46]	23 [20 - 26]	<0,001
PCWP, mmHg	10 [8 - 12] (n=67)	10 [8 - 13] (n=66)	0,494
RAP, mmHg	7 [5 - 10] (n=66)	6 [4 - 8] (n=65)	<0,001
PVR, WU	6 [4 - 8] (n=67)	2,2 [1,6 - 3] (n=66)	<0,001
CI, L/ min/m²	2,7 [2,3 - 3] (n=68)	2,8 [2,4 - 3.3] (n=66)	0,021
SvO₂, %	65 [62 - 70] (n=59)	71 [67 - 76] (n=42)	<0,001
Terapia specifica della PAH, n (%)	15 (22)	11 (16)	0,030

Tabella 2. Caratteristiche della corte CTEPH al tempo basale ed al follow-up eseguito almeno 3 mesi dopo l'intervento.

Le variabili discrete sono espresse con numero assoluto e percentuale relativa. Le variabili discrete distribuite in maniera normale sono espresse come media ± deviazione standard o come mediana e range interquartile [IQR, 25esimo - 75esimo percentile] se non normalmente distribuite (adattato da ¹⁸).

*comorbidità cardiovascolari: pregresso infarto del miocardio o storia di coronaropatia, diabete mellito di tipo 2, ipertensione essenziale.

Lista delle abbreviazioni: 6MWD = distanza al test del cammino in 6 minuti; CI, indice cardiaco; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; N/A, non applicabile; NYHA-FC, classe funzionale secondo la New York heart Association-; PAH, ipertensione arteriosa polmonare; PCWP, pressione di incuneamento capillare; PE, embolia polmonare; PVR, resistenza vascolari polmonari; RAP, pressione atriale destra; SvO₂, saturazione venosa mista di ossigeno; WU, unità Wood.

L'intervallo mediano tra la diagnosi di CTEPH e l'intervento di PEA è stato di 4 [2,5 – 6,5] mesi, con un follow-up mediano di 17 [10 – 24] mesi dalla diagnosi e 9 [6 – 18] mesi post-intervento chirurgico.

4.2 Livelli plasmatici per-PEA dei biomarcatori nei pazienti con CTEPH

Rispetto ai controlli, i pazienti con CTEPH presentavano livelli plasmatici significativamente più elevati di proteina C reattiva (CRP, *C-reactive protein*), pro-BNP (*pro-brain natriuretic peptide*), attivina-A, attivina-B, β -NGF, CXCL9 e FSTL3 ($p < 0,01$ per tutti), come mostrato in **Figura 5** e **Tabella 3**. Anche i livelli plasmatici di endotelina-1 risultavano essere più elevati nei pazienti con CTEPH rispetto ai controlli, come mostrato in **Tabella 3**.

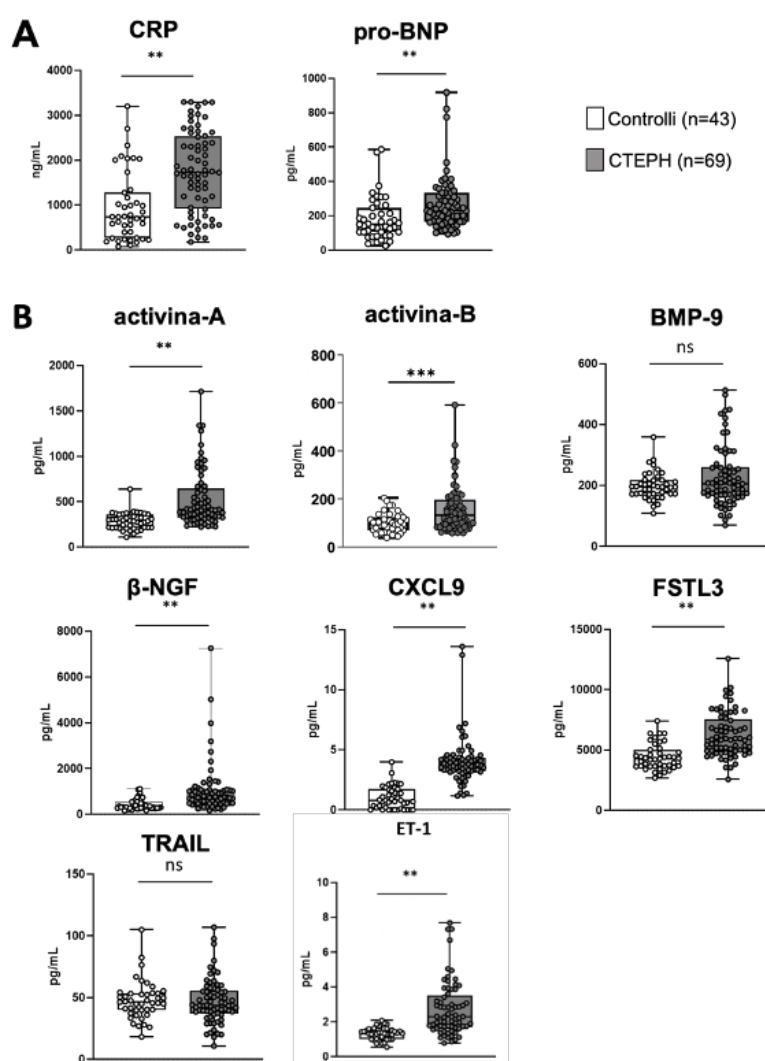


Figura 5. Confronto tra i livelli circolanti di biomarcatori plasmatici in pazienti CTEPH e controlli (adattato da ¹⁸). **A)** differenze significative nei livelli plasmatici di CRP e pro-BNP tra CTEPH e controlli; **B)** sono state riscontrate differenze significative delle concentrazioni plasmatiche tra controlli e CTEPH per l'attivina-A, l'attivina-B, β -NGF, endotelina-1 e FSTL3. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Lista delle abbreviazioni: β -NGF, β -nerve growth factor; BMP-9, bone morphogenic protein-9; CRP, C-reactive protein; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; CXCL9, C-X-C motif chemokine ligand 9; ET-1, endotelina-1; FSTL3, follistatin-like 3; ns, non significativo; pro-BNP, pro-brain natriuretic peptide; TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand.

Come mostrato in **Tabella 3**, inoltre, non sono state riscontrate differenze significative nelle concentrazioni plasmatiche, tra pazienti CTEPH e controlli, per quanto riguarda BMP-9 e TRAIL.

Variabili	Controlli (n=43)	CTEPH (n=69)	p-value
Età, anni	44 [31 - 53]	65 [57 - 72]	<0,001
Donne, n	15 (35)	34 (49)	0,171
CRP, ng/mL	736 [271 - 1278]	1725 [925 - 2532]	<0,001
pro-BNP, pg/mL	150 [106 - 246]	230 [166 - 334]	<0,001
Activina-A, pg/mL	285 [215 - 359]	413 [323 - 650]	<0,001
Activina-B, pg/mL	96 [69 - 124]	132 [87 - 132]	<0,001
BMP-9, pg/mL	195 [173 - 218]	206 [167 - 260]	0,351
β-NGF, pg/mL	0,8 [0,08 - 1,7]	3,8 [3,2 - 4,3]	<0,001
CXCL9, pg/mL	330 [284 - 547]	761 [481 - 1073]	<0,001
Endotelina-1, pg/mL	1,31 [1,02 - 1,51]	1,99 [1,62 - 2,85]	<0,01
	(n=41)	(n=60)	
FSTL3, pg/mL	4286 [3656 - 5029]	5884 [4914 - 7538]	<0,001
TRAIL, pg/mL	46,5 [39,8 - 53,4]	43,8 [37,0 - 55,7]	0,680

Tabella 3. Livelli plasmatici dei biomarcatori analizzati tra controlli e pazienti CTEPH (adattato da ¹⁸).

Le variabili discrete sono espresse con numero assoluto e percentuale relativa. Le variabili discrete distribuite in maniera normale sono espresse come media ± deviazione standard o come mediana e range interquartile [IQR, 25esimo – 75esimo percentile] se non normalmente distribuite.

Lista delle abbreviazioni: β-NGF, β-nerve growth factor; BMP-9, bone morphogenic protein-9; CRP, C-reactive protein; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; CXCL9, C-X-C motif chemokine ligand 9; ET-1, endotelina-1; FSTL3, follistatine-like 3; ns, non significativo; pro-BNP, pro-brain natriuretic peptide; TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand.

4.3 Biomarcatori predittivi di risposta chirurgica

Dei 69 pazienti arruolati nello studio, 38 (55%) hanno avuto una risposta favorevole all'intervento di PEA, con il raggiungimento di una mPAP < 25 mmHg, valutata mediante cateterismo cardiaco destro ad almeno 3 mesi dall'intervento chirurgico. Il restante 45% (31 pazienti), invece, sono risultati essere “non responders”, di cui 2 sono deceduti entro 7 giorni dall'intervento di PEA e 29 pazienti hanno mantenuto una mPAP ≥ 25 mmHg al controllo con cateterismo cardiaco destro effettuato ad almeno 3 mesi dall'intervento chirurgico. Di questi 29 pazienti non responders, 3 sono stati ulteriormente trattati con BPA, a 4 pazienti è stata prescritta terapia con vasodilatatori polmonari specifici e in 2 casi si è optato per una terapia di combinazione tra BPA e terapia medica. Un paziente non responder è deceduto dopo 3,6 anni dall'intervento chirurgico di PEA.

Nella **Tabella 4** sono riassunte le caratteristiche cliniche e i dosaggi plasmatici dei biomarcatori in studio dei pazienti responders e non responders.

Variabili	Responder (n=38)	Non-responder (n=31)	p-value
Età, anni	63 [58 – 71]	70 [55 – 73]	0,299
Donne, n (%)	17 (48)	17 (52)	0,277
Obesità, n (%)	26 [23,8 – 30,4]	26,7 [22,3 – 33,8]	0,962
≥1 comorbidità CV*, n (%)	13 (34)	10 (32)	0,864
Pregressa neoplasia, n (%)	20 (53)	18 (58)	0,418
Storia di PE acuta, n (%)	5 (13)	4 (13)	0,975
Creatinina, µmol/L	32 (84)	26 (83)	0,969
Emoglobina, g/dL	22 (58)	17 (55)	0,928
6MWD, m	436 ± 141 (n=31)	395 ± 103 (n=25)	0,159
NYHA-FC I-II/III-IV, n (%)	38 [34 – 42]	42 [37- 49]	0,011
mPAP pre-PEA, mmHg	10 [8 – 12]	10 [9 – 13] (n=29)	0,212
PCWP pre-PEA, mmHg	7 ± 3 (n=37)	8 ± 4 (n=29)	0,243
RAP pre-PEA, mmHg	6,0 [3,9 – 7,2]	6,0 [4,5 – 9,0] (n=29)	0,127
PVR pre-PEA, WU	2,6 [2,3 – 3,0] (n=37)	2,7 [2,4 – 3,1]	0,264
CI pre-PEA, L/ min/m ²	65 [61 – 69] (n=33)	65 [62 – 70] (n=26)	0,957
Terapia specifica PAH, n (%)	11 (29)	4 (13)	0,093
CRP, ng/mL	1486 [695 – 2021]	2300 [1493 – 2778]	0,005
pro-BNP, pg/mL	226 [165 – 287]	274 [170 - 346]	0,385
Activina-A, pg/mL	371 [295 – 483]	521 [361 – 957]	0,002
Activina-B, pg/mL	107 [81 – 107]	150 [108 – 232]	0,016
BMP-9, pg/mL	193 [161 – 255]	208 [171 – 314]	0,392
β-NGF, pg/mL	3,7 [3,2 – 4,3]	3,8 [3,3 – 4,4]	0,538
CXCL9, pg/mL	692 [457 – 994]	991 [573 – 1333]	0,039
Endotelina-1, pg/mL	2,2 [1,4 – 3,2]	2,3 [1,8 – 3,9]	0,862
FSTL3, pg/mL	5243 [4669 – 6845]	6221 [5434 – 8156]	0,018
TRAIL, pg/mL	44,1 [37,2 – 56,7]	43,5 [34,3 – 54,9]	0,947

Tabella 4. Caratteristiche dei pazienti CTEPH divisi in responder e non responder in base al riscontro emodinamico ad almeno 3 mesi dell'intervento di PEA, di pressione arteriosa polmonare media (mPAP) < 25 mmHg o ≥ 25 mmHg, rispettivamente (adattato da ¹⁸).

Le variabili discrete sono espresse con numero assoluto e percentuale relativa. Le variabili discrete distribuite in maniera normale sono espresse come media ± deviazione standard o come mediana e range interquartile [IQR, 25esimo – 75esimo percentile] se non normalmente distribuite.

*comorbidità cardiovascolari: pregresso infarto del miocardio o storia di coronaropatia, diabete mellito di tipo 2, ipertensione essenziale.

Lista delle abbreviazioni: 6MWD = distanza al test del cammino in 6 minuti; CI, indice cardiaco; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; N/A, non applicabile; NYHA-FC, classe funzionale secondo la New York heart Association-; PAH, ipertensione arteriosa polmonare; PCWP, pressione di incuneamento capillare; PE, embolia polmonare; PVR, resistenza vascolari polmonari; RAP, pressione atriale destra; SvO₂, saturazione venosa mista di ossigeno; WU, unità Wood, β-NGF, β-nerve growth factor; BMP-9, bone morphogenic protein-9; CRP, C-reactive protein; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; CXCL9, C-X-C motif chemokine ligand 9; ET-1, endotelina-1; FSTL3, follistatin-like 3; ns, non significativo; pro-BNP, pro-brain natriuretic peptide; TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand.

Per definizione, i non responders presentavano valori di mPAP maggiori dei responders, (42 [37–49] vs. 38 [34–42] mmHg; p = 0,011), sebbene gli altri parametri emodinamici risultassero essere sovrapponibili tra i due gruppi, come evidente dalla **Tabella 4**.

I livelli plasmatici di CRP, CXCL9, activina-A, activina-B ed FSTL3 risultavano, invece essere maggiori nei non responders rispetto ai responders. Le concentrazioni plasmatiche di pro-BNP, BMP-9, β -NGF, endotelina-1 e TRAIL, invece, non mostravano differenza tra i due sottogruppi di pazienti CTEPH, come mostrato in **Tabella 4** e **Figura 6**.

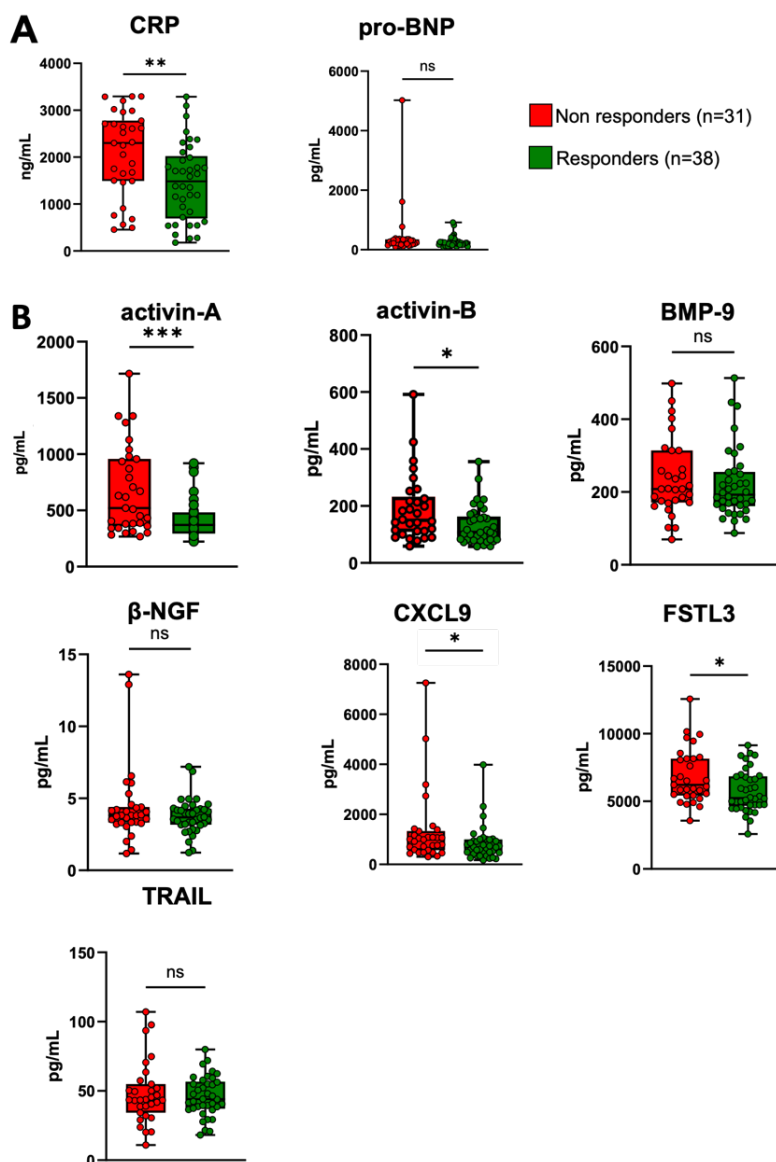


Figura 6. Confronto tra le concentrazioni plasmatiche dei principali biomarcatori in studio valutati al tempo basale tra pazienti responder e non responder all'intervento di PEA (definiti dal criterio emodinamico di $mPAP < 25$ mmHg al cateterismo cardiaco destro effettuato almeno 3 mesi post-intervento chirurgico) (adattato da ¹⁸).

A) differenze significative nei livelli plasmatici di CRP; **B)** sono state riscontrate differenze significative delle concentrazioni plasmatiche per l'activina-A, l'activina-B, CXCL9 e FSTL3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Lista delle abbreviazioni: β -NGF, β -nerve growth factor; BMP-9, bone morphogenic protein-9; CRP, C-reactive protein; CXCL9, C-X-C motif chemokine ligand 9; FSTL3, follistatine-like 3; ns, non significativo; pro-BNP, pro-brain natriuretic peptide; TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand.

È stata quindi effettuata una regressione logistica aggiustata per età per valutare quali variabili fossero associate alla presenza di ipertensione polmonare residua post-PEA. Tra i parametri in studio, valori più elevati di mPAP preoperatori, CRP, activina-A, activina-B, e FSTL3, considerati come variabili continue, erano associati ad un aumentato rischio di non responsività all'intervento chirurgico, quindi alla persistenza di PH post-PEA, definita, appunto, come presenza di mPAP ≥ 25 mmHg al cateterismo cardiaco di controllo effettuato ad almeno 3 mesi dall'intervento (o di mortalità peri-operatoria). La **Tabella 5** riassume i risultati appena descritti.

Variabili	OR corrette per età	95% CI	p-value
Donne, n	1,688	0,630 – 4,526	0,298
BMI, kg/mq	1,043	0,964 – 1,129	0,292
Pregressa neoplasia, n (%)	0,838	0,198 – 3,552	0,810
≥ 1 comorbidità CV*, n (%)	1,174	0,445 – 3,097	0,745
6MWD, m	0,998	0,993 – 1,002	0,282
NYHA-FC I/II, n	0,939	0,354 – 2,491	0,900
mPAP, mmHg	1,095	1,020 – 1,176	0,012
PCWP, mmHg	1,176	0,965 – 1,432	0,107
RAP, mmHg	1,113	0,951 – 1,303	0,183
PVR, WU	1,145	0,946 – 1,385	0,164
CI, L/min/m²	1,591	0,657 – 3,851	0,303
SvO₂, %	0,983	0,908 – 1,065	0,675
Terapie specifiche PAH, n	0,343	0,096 – 1,226	0,100
CRP, ng/mL	1,001	1,000 – 1,002	0,007
CRP/SD[#], ng/mL	2,113	1,231 – 3,626	0,007
pro-BNP, pg/mL	1,001	0,999 – 1,003	0,326
Activin-A, pg/mL	1,003	1,001 – 1,006	0,003
Activin-A/SD[#], pg/mL	2,983	1,465 – 6,074	0,003
Activin-B, pg/mL	1,081	1,011 – 1,156	0,022
Activin-B/SD[#], pg/mL	1,981	1,066 – 3,681	0,031
BMP-9, pg/mL	1,017	0,979 – 1,058	0,558
β-NGF, pg/mL	1,196	0,900 – 1,590	0,217
CXCL9, pg/mL	1,001	1,000 – 1,001	0,091
FSTL3, pg/mL	1,000	1,000 – 1,001	0,025
FSTL3/SD[#], pg/mL	1,952	1,126 – 3,385	0,017
TRAIL, pg/mL	1,009	0,982 – 1,038	0,500

Tabella 5. Fattori predittivi di PH-residua post-PEA (i non responder sono definiti dalla presenza di mPAP ≥ 25 mmHg al cateterismo cardiaco di controllo effettuato ad almeno 3 mesi dall'intervento chirurgico) corretti per età. I dati clinici ed emodinamici sono stati raccolti all'ultima valutazione effettuata prima dell'intervento di PEA (adattato da ¹⁸).

Activina-A e activina-B sono state corrette per un fattore 10; FSTL3 e CRP sono state corrette per un fattore 100

*comorbidità cardiovascolari: pregresso infarto del miocardio o storia di coronaropatia, diabete mellito di tipo 2, ipertensione essenziale.

Lista delle abbreviazioni: 6MWD = distanza al test del cammino in 6 minuti; CI, indice cardiaco; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; N/A, non applicabile; NYHA-FC, classe funzionale secondo la New York heart Association-; PAH, ipertensione arteriosa polmonare; PCWP, pressione di incuneamento capillare; PE, embolia polmonare; PVR, resistenza vascolari polmonari; RAP, pressione atriale destra; SvO₂, saturazione venosa mista di ossigeno; WU, unità Wood, β -NGF, β -nerve growth factor; BMP-9, bone morphogenic protein-9; CRP, C-reactive protein; CXCL9, C-X-C motif chemokine ligand 9; ET-1, endotelina-1; FSTL3, follistatin-like 3; pro-BNP, pro-brain natriuretic peptide; TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, CI, intervallo di confidenza, SD, deviazione standard.

Le variabili risultate statisticamente significative alla regressione lineare corretta per età sono state inserite modelli di regressione lineare (come mostrato in **Tabella 6**). Nel modello multivariato A, alti livelli di attivina-A sono risultati ancora statisticamente significativi nel predire il rischio di PH-resistente post-PEA, anche dopo correzione per età, mPAP preoperatoria e concentrazione plasmatica di CRP (OR 2,469; IC 95%: 1,111–5,487; $p = 0,027$). Al contrario, come mostrato in **Tabella 6**, tale significatività non si è mantenuta per l'attivina-B (modello B) e per FSTL3 (Modello C).

Variabili	OR corrette	95% CI	p-value
Modello A			
mPAP pre-PEA, mmHg	1,077	0,997 – 1,165	0,060
CRP/SD, ng/mL	1,690	0,929 – 3,077	0,086
Activina-A/SD, pg/mL	2,469	1,111 – 5,487	0,027
Modello B			
mPAP pre-PEA, mmHg	1,091	1,009 – 1,181	0,029
CRP/SD, ng/mL	1,842	1,021 – 3,322	0,042
Activina-B/SD, pg/mL	1,671	0,764 – 3,653	0,198
Modello C			
mPAP pre-PEA, mmHg	1,086	1,008 – 1,170	0,030
CRP/SD, ng/mL	1,777	0,982 – 3,215	0,057
FSTL3/SD, pg/mL	1,566	0,846 – 2,900	0,153

Tabella 6. Regressione lineare multivariata corretta per l'età (adattato da ¹⁸).

Lista delle abbreviazioni: CRP, C-reactive protein; FSTL3, follistatine-like 3; mPAP, pressione arteriosa polmonare media; PEA, endoarteriectomia polmonare; CI, intervallo di confidenza; SD, deviazione standard.

L'analisi delle curve ROC ci ha permesso di determinare la soglia ottimale di concentrazione plasmatica di attivina-A per la predizione di PH-resistente post-PEA, con una specificità dell'89% ed una sensibilità del 48% (AUC = 0,714; IC 95%: 0,5908–0,8379; $p = 0,0023$). Il 79% (15 su 19) dei pazienti con livelli di attivina-A superiori alla soglia identificata dalle curve di ROC presentavano PH-resistente post-PEA al controllo mediante cateterismo cardiaco destro effettuato ad almeno 3 mesi dall'intervento chirurgico.

4.4 Variazioni dinamiche dei biomarcatori post-PEA

In un sottogruppo di 22 pazienti è stato possibile eseguire una valutazione dinamica delle concentrazioni plasmatiche dei biomarcatori su un prelievo ematico eseguito ad almeno 5 mesi dall'intervento chirurgico e confrontare i risultati con i dati degli stessi pazienti ottenuti al prelievo eseguito pre-intervento. Tale analisi ha mostrato variazioni significative nella concentrazione plasmatica di diversi biomarcatori.

Tra questi il 59% (13 pazienti) presentavano una PH persistente post-chirurgica, definita come mPAP $\geq$ 25 mmHg al cateterismo cardiaco destro effettuato ad almeno 3 mesi dopo l'intervento.

Dopo la chirurgia è stata riscontrata una riduzione significativa dei livelli plasmatici di attivina-B, β -NGF, CXCL9, come mostrato in **Tabella 7**. Al contrario, la concentrazione plasmatica di TRAIL è risultata significativamente aumentata rispetto a quella riscontrata al tempo basale. Infine, i livelli di attivina-A, BMP-9 e FSTL3 non sono variati con l'intervento chirurgico, come mostrato in **Tabella 7**.

Variabili	pre-PEA (n=22)	Post-PEA (n=22)	p-value
CRP, ng/mL	1648 [871 - 2350]	1574 [905 - 2622]	0,592
pro-BNP, pg/mL	238 [149 - 340]	192 [175 - 280]	0,299
Attivina-A, pg/mL	486 [354 - 751]	404 [327 - 493]	0,067
Attivina-B, pg/mL	147 [112 - 224]	84 [72 - 116]	<0,001
BMP-9, pg/mL	237 $\pm$ 106	230 $\pm$ 91	0,767
β -NGF, pg/mL	3,6 [3,0 - 4,3]	1,7 [1,2 - 2,9]	<0,001
CXCL9, pg/mL	1006 [752 - 1117]	663 [467 - 928]	0,039
Endotelina-1, pg/mL	2,8 [1,6 - 4,0]	1,8 [1,3 - 2,5]	0,008
FSTL3, pg/mL	6524 [5121 - 8229]	6314 [5191 - 7990]	0,445
TRAIL, pg/mL	50 $\pm$ 17	59 $\pm$ 18	<0,001

Tabella 7. Variazioni dinamiche dei livelli dei principali biomarcatori in esame alla valutazione fatta prima dell'intervento di PEA e ad almeno 5 mesi dall'intervento chirurgico (adattato da ¹⁸).

Lista delle abbreviazioni: β -NGF, β -nerve growth factor; BMP-9, bone morphogenic protein-9; CRP, C-reactive protein; CXCL9, C-X-C motif chemokine ligand 9; ET-1, endotelina-1; FSTL3, follistatine-like 3; pro-BNP, pro-brain natriuretic peptide; TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, PEA, endoarteriectomia polmonare

4.5 Espressione vascolare polmonare della via dell'attivina

Considerato il ruolo predittivo che l'attivina-A ha dimostrato avere nel discriminare la non-responsività alla PEA in pazienti affetti da CTEPH operabile, abbiamo deciso quindi di meglio caratterizzare e valutare il pathway dell'attivina/p-Smad2 in questi pazienti. Per fare ciò abbiamo utilizzato campioni operatori di polmone provenienti da 6 pazienti CTEPH sottoposti a trapianto polmonare (in epoca pre-BPA) e 6-7 controlli (di pazienti sottoposti a pneumectomia o lobectomia per presenza di lesione neoplastiche polmonari). Tali studi atti a valutare il coinvolgimento di questa via di segnalazione nella patogenesi della microvasculopatia dei pazienti con CTEPH sono stati condotti mediante l'uso di microscopia confocale ed analisi di immunofluorescenza.

Il legame dell'attivina con i suoi recettori è tra i meccanismi responsabili della fosforilazione di Smad 2/3, attivando così una cascata di segnalazione intracellulare che porta, in ultima istanza, alla proliferazione cellulare stimolando il rimodellamento vascolare. La

presenza di p-Smad2, indica quindi una iperattivazione della cascata di segnalazione intracellulare. Come mostrato in **Figura 7A**, i livelli di p-Smad2 nei vasi distali di pazienti trapiantati affetti da CTEPH avanzata risultano essere significativamente aumentati sia nelle cellule endoteliali vascolari polmonari (ECs) che cellule muscolari lisce delle arterie polmonari (PA-SMCs), rispetto ai controlli ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ rispettivamente).

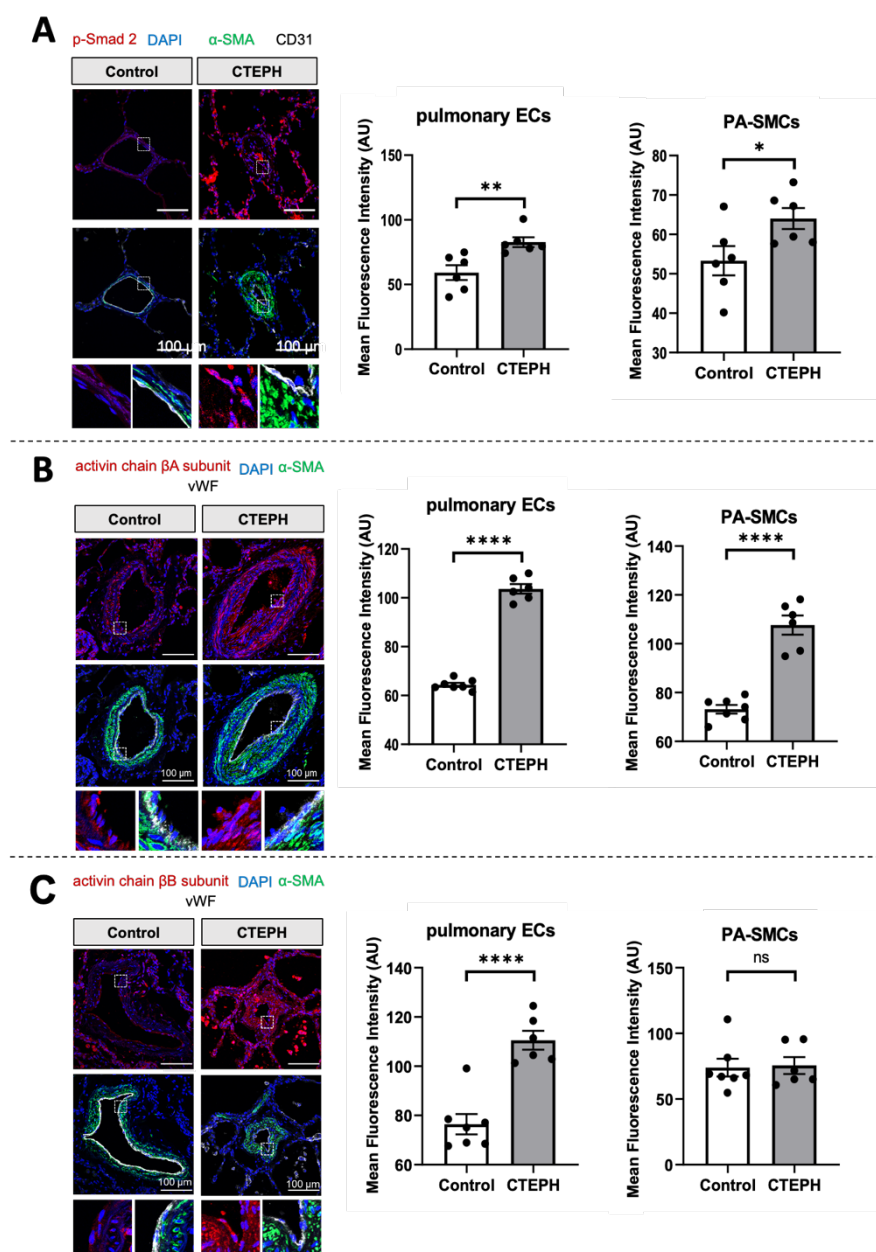


Figura 7. Espressione tissutale di p-Smad2 e delle due subunità componenti le catene dell'attivina, subunità-βA e -βB, in campioni di tessuto polmonare di pazienti di controllo e pazienti affetti da CTEPH: immagini rappresentative di arteriole distali in pazienti di controllo e pazienti CTEPH che mostrano iperespressione di p-Smad2 (in rosso; pannello A), delle subunità βA- e βB (in rosso, pannelli B e C rispettivamente) (adattato da ¹⁸).

DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, in blu) è stato utilizzato per colorare i nuclei. Anticorpi anti- α-actina delle cellule muscolari lisce (α-SMA) (in verde) e anticorpi anti-von Willebrand factor (vWF) (in bianco) sono stati utilizzati per marcare le cellule muscolari lisce delle arterie polmonari (PA-SMCs) e le cellule endoteliali vascolari polmonari (ECs), rispettivamente. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. **** $p < 0.0001$. CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; ns, non significativo; pulmonary ECs, cellule endoteliali vascolari polmonari; PA-SMCs, cellule muscolari lisce delle arterie polmonari.

Tali risultati sono stati ulteriormente confermati dall'analisi Western blot, che ha mostrato un incremento totale dell'espressione di p-Smad2/3 nel tessuto polmonare dei pazienti affetti da CTEPH, come mostrato in **Figura 8**.

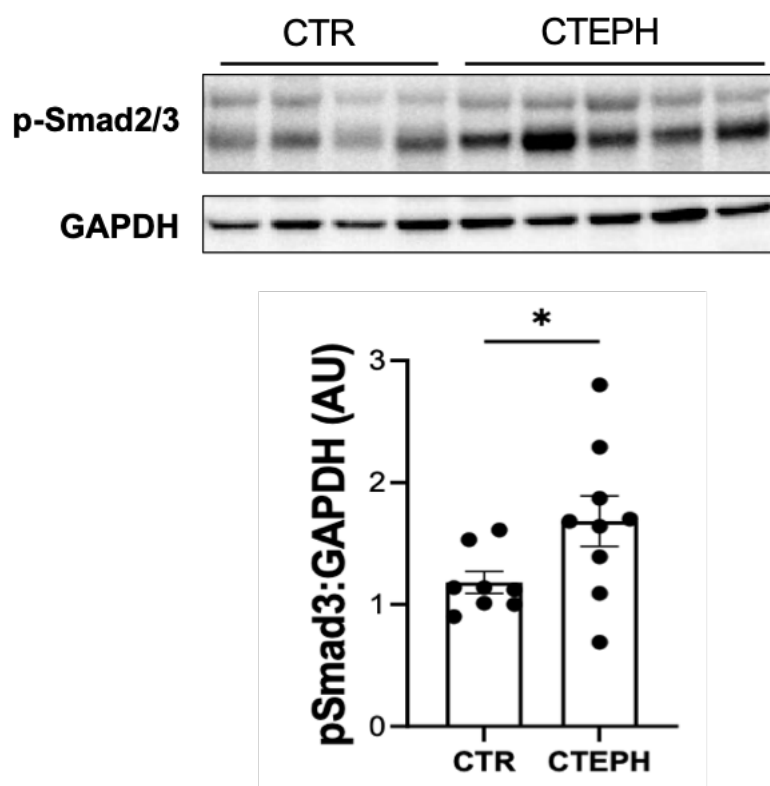


Figura 8. Espressione di p-Smad 2/3 a livello polmonare determinata mediante western blot. (adattato da ¹⁸).

* $p < 0,05$

Lista delle abbreviazioni: CTR, controlli; CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica;

Per confermare che l'iperattivazione di p-Smad2 a livello delle arteriole polmonari distali muscolarizzate dei pazienti CTEPH fosse legata ad un'iperattivazione della via di segnalazione mediata dall'attivina sono state quindi dosati i livelli tissutali di espressione delle due catene che compongono i dimeri di attivina, l'inibina β A e l'inibina- β B.

Abbiamo quindi potuto dimostrare che le ECs dei pazienti affetti da CTEPH presentano sovraespressione significativa di entrambe le subunità che compongono l'attivina, come mostrato in **Figura 2B** e **Figura 2C**, rispetto ai controlli ($p < 0,0001$). Infine, l'inibina- β A risultava iperespressa anche nelle PA-SMCs (**Figura 2B**), mentre lo stesso non si può dire per la subunità- β B (**Figura 2C**).

Ulteriore conferma dell'iperattivazione della via dell'attivina/p-Smad2 ad opera dell'attivina-A nei pazienti affetti da CTEPH è data dalla sovraespressione del recettore dell'attivina ACTRIIB, tra i principali recettori dell'attivina, sia nelle ECs ($p < 0,0001$) che

nelle PA-SMCs ($p < 0,001$) dei pazienti con CTEPH rispetto ai controlli, come mostrato in **Figura 9A**¹⁸.

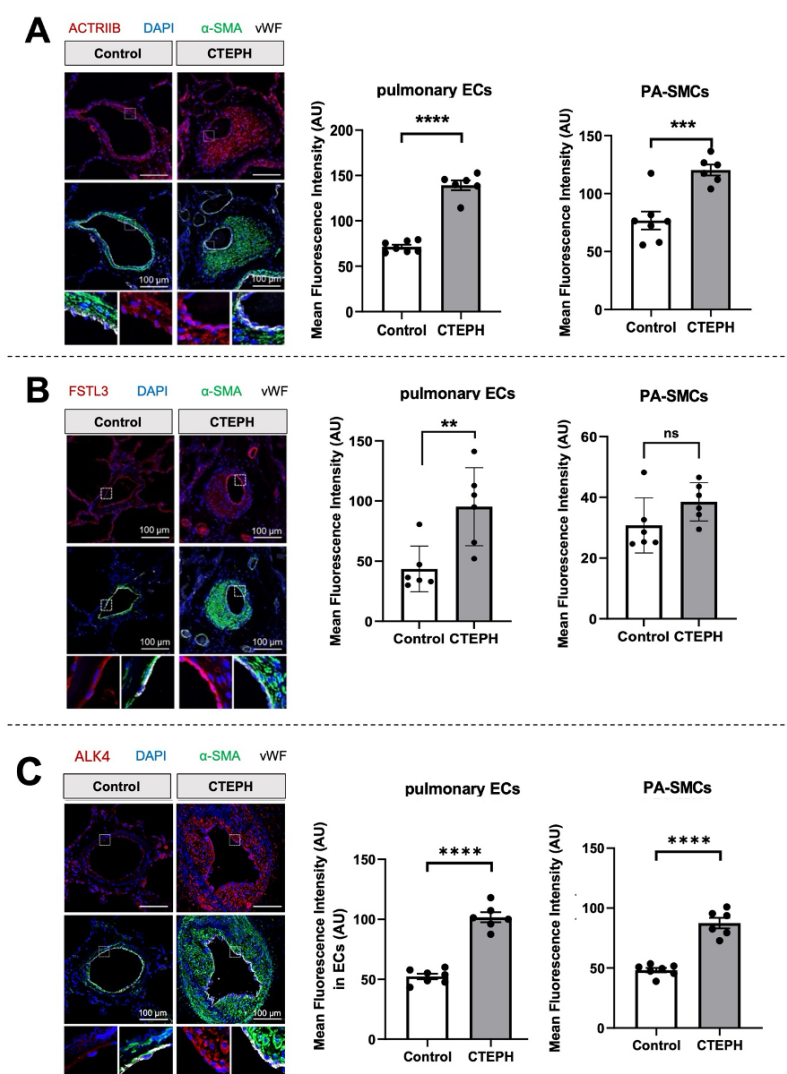


Figura 9. Espressione tissutale del recettore ACTRIIB di FSTL3 e ALK4 (pannello C) in controlli e pazienti affetti da CTEPH sottoposti a trapianto polmonare (adattato da ¹⁸).

Fotomicrografici raffiguranti arteriole distali in pazienti affetti da CTEPH e in controlli che mostra iperespressione del recettore ACTRIIB (in rosso; pannello A), di FSTL3 (in rosso; pannello B) e ALK4 (in rosso; pannello C).

DAPI (4',6-diamino-2-fenilindole, in blu) è stato utilizzato per colorare i nuclei. Anticorpi anti- α -actina delle cellule muscolari lisce (α -SMA) (in verde) e anticorpi anti-von Willebrand factor (vWF) (in bianco) sono stati utilizzati per marcare le cellule muscolari lisce delle arterie polmonari (PA-SMCs) e le cellule endoteliali vascolari polmonari (ECs), rispettivamente. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$. **Lista delle abbreviazioni:** CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolica; ns, non significativo; pulmonary ECs, cellule endoteliali vascolari polmonari; PA-SMCs, cellule muscolari lisce delle arterie polmonari; ACTRIIB, recettore dell'attivina di tipo II B; ALK4, recettore dell'attivina di tipo 1B; FSTL3, follistatine-like 3.

Nei pazienti affetti da CTEPH si è inoltre dimostrato esserci un aumento significativo dell'espressione di FSTL3 solo nelle ECs, rispetto ai controlli ($p < 0,01$), ma non nelle PA-SMCs, come mostrato in **Figura 9B**. Infine, l'espressione di ALK4, altro recettore dell'attivina, risultava essere significativamente aumentato nei pazienti affetti da CTEPH rispetto ai controlli sia nelle ECs che nelle PA-SMCs ($p < 0,001$ in entrambi i casi), come mostrato in **Figura 9C**.

Infine, anche l'espressione tissutale di endotelina-1 e dei suoi principali recettori è stata valutata a livello del tessuto polmonare di pazienti affetti da CTEPH e paragonata a quella di soggetti di controllo. Come evidente dalla **Figura 10A**, pazienti affetti da CTEPH presentano aumento dell'espressione tissutale di endotelina-1, accompagnata da incremento dell'espressione del recettore A dell'endotelina¹⁹.

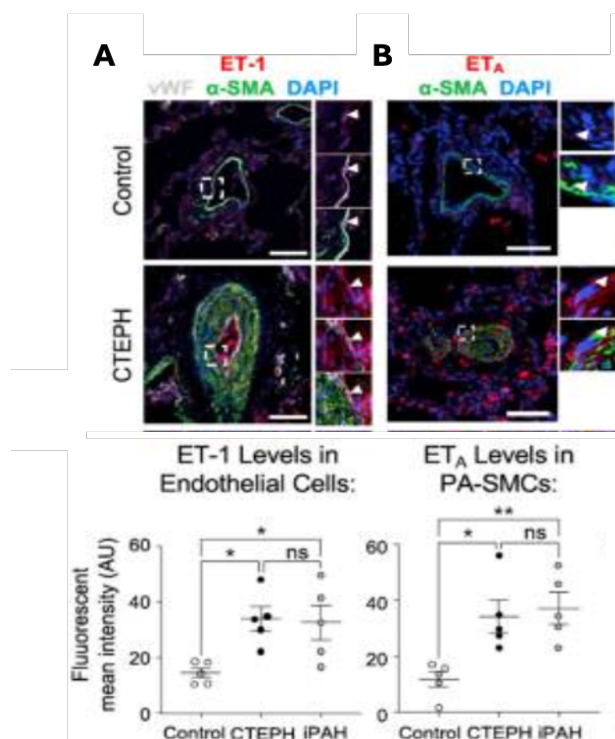


Figura 10. Espressione tissutale di endotelina-1 in sofferiti affetti da CTEPH e controlli non-CTEPH (adattata da¹⁹). **A)** immunofluorescenza per endotelina 1 (in rosso) e quantificazione dei livelli di Endotelina-1 a livello delle cellule endoteliali in pazienti affetti da CTEPH, controlli e soggetti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica. **B)** espressione dei livelli di recettore A dell'endotelina (in rosso) in pazienti affetti da CTEPH, controlli e soggetti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica. DAPI (4',6-diamino-2-fenilindole, in blu) è stato utilizzato per colorare i nuclei. Anticorpi anti- α -actina delle cellule muscolari lisce (α -SMA) (in verde) e anticorpi anti-von Willebrand factor (vWF) (in bianco) sono stati utilizzati per marcare le cellule muscolari lisce delle arterie polmonari (PA-SMCs) e le cellule endoteliali vascolari polmonari (ECs), rispettivamente.

Lista delle abbreviazioni: CTEPH, ipertensione polmonare cronica tromboembolia; ET-1, endotelina-1; iPAH; ipertensione polmonare arteriosa idiopatica; PA-SMCs, cellula muscolari lisce delle arterie polmonari.

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE

Identificare nuovi biomarcatori in grado di individuare la presenza e l'estensione della microvasculopatia in pazienti affetti da CTPEH rappresenta un passaggio fondamentale per migliorare la gestione diagnostico-terapeutica di questi pazienti, soprattutto considerando la possibilità di valutare e prevedere il rischio di sviluppo di ipertensione polmonare persistente nonostante l'impiego di tecniche di disostruzione meccanica.

In questo studio, per la prima volta, è stata effettuata un'analisi sistematica del profilo proteico plasmatico della via di segnalazione dell'attivina in pazienti affetti da forme di CTEPH operabile, analisi integrata anche con lo studio immunofluorescente dei tessuti polmonare di pazienti affetti da forme di CTEPH avanzata e sottoposti a trapianto polmonare.

I nostri dati evidenziano che, non solo i pazienti affetti da CTEPH presentano alterazioni a carico della via dell'endotelina-1¹⁹, ma soprattutto che la via dell'attivina in questi pazienti risulta essere particolarmente iper-attivata. In particolare, le arteriole rimodellate presenti nei campioni polmonare di pazienti affetti da CTEPH sono caratterizzati dalla presenza di accumulo nucleare di p-Smad2/3, che rappresenta la forma attiva di Smad2/3, sovraespressione di entrambe le subunità β dell'attivina, aumento dell'espressione dei recettori per l'attivina ACTRIIB e del modulatore dell'attività dell'attivina FSTL3¹⁸. Tali dati suggeriscono fortemente che la via dell'attivina sia overespressa nelle arteriole distali dei pazienti affetti da CTEPH in fase avanzata e che tale via di segnalazione possa giocare un ruolo fondamentale nel processo di rimodellamento vascolare distale tipico dei soggetti che presentano microvasculopatia¹⁸. Altro dato importante per sottolineare il ruolo che il pathway dell'attivina giochi nella fisiopatogenesi della microvasculopatia dei soggetti CTEPH è dato dagli elevati livelli plasmatici di attivina-A, attivina-B e FSTL3 che questi soggetti presentano, associato alla capacità dell'elevata concentrazione di attivina-A di predire il rischio di sviluppare ipertensione polmonare resistente post-disostruzione chirurgica.

Come suggerito dalle più attuali linee guida, l'approccio moderno al trattamento dei pazienti CTEPH si basa su una gestione multimodale che combina interventi invasivi di disostruzione meccanica volti a rimuovere l'ostruzione presente a livello dei vasi arteriosi polmonari, quali endoarteriectomia polmonare ed angioplastica polmonare, e interventi medici con farmaci vasodilatatori polmonari specifici, mirati al trattamento della microvasculopatia periferica^{1,3,20}.

Grazie ai progressi avvenuti negli ultimi decenni per quanto riguarda l'accuratezza delle tecniche di imaging, siamo oggi in grado di discriminare le lesioni vascolari polmonari trattabili chirurgicamente mediante PEA da quelle più periferiche che interessano i vasi distali segmentari e sub-segmentari aggredibili mediante angioplastica polmonare. Nonostante ciò, tutt'oggi la valutazione della microvasculopatia e del rimodellamento vascolare polmonare distale resta una sfida irrisolta, lasciando la quantificazione dell'interessamento delle piccole arterie polmonari distali ad indici indiretti quali il grado di ostruzione, i valori di pressione arteriosa polmonare media, e soprattutto, i valori di resistenza vascolari polmonari valutati mediante cateterismo cardiaco destro. Ovviamente tali misure risultano essere poco accurate e, per quanto possibilmente correlata al grado di interessamento vascolare distale, risultano essere stime indirette, influenzate anche da altri cofattori.

I risultati di questo studio supportano largamente l'uso dell'attivina-A plasmatica come biomarcatore della microvasculopatia, dato supportato ulteriormente dall'evidenza che i suoi livelli circolanti non variano in modo significativo dopo l'intervento di PEA. Ciò suggerisce che la rimozione meccanica del trombo nelle sezioni più prossimali del circolo vascolare polmonare, che non ha alcun impatto sull'interessamento delle piccole arteriole periferiche, non altera in alcun modo, come previsto, l'alterazione tissutale in termini di iper-attivazione del pathway dell'attivina-A a livello dei piccoli vasi periferici polmonari, ulteriormente avvalorando l'ipotesi che la via di segnalazione dell'attivina-A sia coinvolta nella fisiopatogenesi della microvasculopatia. Da queste evidenze possiamo quindi dedurre che le alte concentrazioni di attivina-A riscontrate nella nostra popolazione siano correlate alla presenza di rimodellamento vascolare polmonare periferico, piuttosto che alla semplice presenza di un'ostruzione trombotica a carico dei vasi più prossimali.

Altro dato importante è che l'elevata concentrazione plasmatica di attivina-A preoperatoria risulta essere un biomarcatore indipendente del rischio di sviluppare ipertensione polmonare resistente dopo l'intervento chirurgico di disostruzione meccanica, anche dopo correzione per età, pressione arteriosa polmonare media e livelli plasmatici di proteina C reattiva.

Questo biomarcatore potrebbe quindi essere impiegato nella pratica clinica per migliorare la stratificazione del rischio nei pazienti affetti da CTEPH e per creare una strategia-terapeutica personalizzata per ogni singolo paziente.

Studi recenti corroborano l'ipotesi che la via di segnalazione dell'attivina/p-Smad 2-3 sia ampiamente implicata nella fisiopatogenesi del rimodellamento vascolare polmonare distale in diverse forme di ipertensione polmonare.

È noto infatti che, dal punto di vista istologico, forme di ipertensione arteriosa polmonare appartenenti al Gruppo 1 e pazienti affetti da CTEPH presentano caratteristiche in comune^{21,22}.

Studi recenti, inoltre, hanno esplorato il ruolo del TGF- β nella fisiopatogenesi del materiale trombotico apposto alle pareti dei vasi arteriosi polmonari dei pazienti affetti da CTEPH, dimostrando che la via di segnalazione endoteliale del TGF- β è coinvolta nella non-risoluzione del trombo e nell'istaurarsi del processo di fibrosi che porta alla cronicizzazione dell'ostruzione. In questo processo sembra siano coinvolti i recettori di tipo 1 della via di segnalazione del TGF- β e il pathway dell'endotelina²³. Inoltre, è stato dimostrato che i pazienti affetti da CTEPH presentano alti livelli di TGF- β 1, che potrebbero ulteriormente portare alla sovra-attivazione di Smad 2²⁴. Tali risultati sono ancora più interessanti considerando che le vie del TGF- β e dell'attivina sono strettamente interconnesse, con un'ampia interazione finzionale tra le diverse molecole della via di segnalazione²⁵.

Il nostro studio, quindi, dimostra chiaramente che la via dell'attivina/p-Smad2-3 è direttamente coinvolta nella microvasculopatia in pazienti affetti da CTEPH, evidenziando come esista una disregolazione coordinata di diversi attori di questa via di segnalazione intracellulare, quali ligandi, inibitori e recettori. Tale disregolazione è dimostrabile sia a livello plasmatico che a livello tissutale.

Altro aspetto fondamentale del nostro studio è aver dimostrato che la concentrazione plasmatica di attivina-A in pazienti affetti da CTEPH non è semplicemente il riflesso dell'attivazione di una risposta infiammatoria sistemica o di un danno tissutale acuto, ma piuttosto l'espressione di un processo cronico di rimodellamento dei piccoli vasi arteriosi capillari. Ciò è ancora più evidente se consideriamo che ad almeno 5 mesi dall'intervento di PEA, quando cioè il carico emodinamico a livello del circolo polmonari si è ridotto, i livelli plasmatici di attivina-A continuano ad essere elevati, a differenza di altri biomarcatori, come la proteina C reattiva, che si riducono e che sono considerati biomarcatori di successo dell'intervento chirurgico.

Per tali motivi, l'associazione indipendente che abbiamo dimostrato esserci tra concentrazioni plasmatiche di attivina-A e presenza di ipertensione polmonare residua

suggerisce che tale molecola possa essere utilizzata come biomarcatore prognostico utile nella pratica clinica per il follow-up dei pazienti affetti da CTEPH e per migliorarne la gestione terapeutica.

L'attivina-A potrebbe, quindi, essere un biomarcatore plasmatico impiegato sia per individuare precocemente pazienti a rischio di sviluppare ipertensione polmonare post-PEA, quando valutato pre-intervento, ma anche per monitorare l'entità e la persistenza di microvasculopatia nel follow-up post-operatorio.

Infine, l'analisi di immunofluorescenza evidenzia che la via di segnalazione dell'attivina, mediata da p-Smad2, sia iper-attivata nel microcircolo polmonare distale dei pazienti affetti da CTEPH in fase avanzata, suggerendo che ci possa essere un coinvolgimento diretto di questa via nel processo di rimodellamento vascolare periferico caratteristico dei pazienti con CTEPH. L'iper-espressione nucleare di p-Smad2 è suggestivo della presenza di un'attivazione trascrizionale costitutivamente attiva, reperto compatibile anche con l'aumento dell'espressione dei fattori regolatori della via dell'attivina che abbiamo riscontrato nei tessuti polmonari dei nostri pazienti, quali FSTL3. Infatti, l'espressione di FSTL3, che agisce come regolatore negativo della via di segnalazione dell'attivina, può essere indotta da un'ipertattivazione della via stessa, proprio come fattore di controllo, motivo per il quale può essere utilizzato come marker di feedback di questo pathway.

È di notevole interesse il fatto che abbiamo riscontrato un aumento anche della concentrazione plasmatica di attivina-B, che condivide con l'attivina-A parte dei recettori e delle vie di segnalazione, sebbene tale aumento non si accompagnasse ad un valore prognostico indipendente nei modelli multivariati esplorati. Tale differenza di comportamento tra attivina-A ed attivina-B potrebbe essere attribuita ad un ruolo più marginale o compensatorio dell'attivina-B nella patogenesi della microvasculopatia nei pazienti CTEPH, o forse ad una diversa regolazione tessuto-specifica.

Senza ombra di dubbio, comunque, la nostra analisi conferma che la via di segnalazione dell'attivina, mediata dall'attivazione tramite fosforilazione di Smad2, gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi della microvasculopatia tipica della CTEPH. Tale scoperta apre interessanti porte terapeutiche ancora inesplorate per questi pazienti. Infatti, recenti studi hanno dimostrato che il pathway dell'attivina è fortemente disregolato nei pazienti affetti da PAH di

Gruppo 1 e questo ha portato alla sperimentazione di nuove molecole, che agiscono su questa via di segnalazione, nel trattamento dei pazienti affetti da PAH, con entusiasmanti risultati.

Tra questi spicca il sotatercept che, come altre molecole che fungono da “*ligand trap*” per i membri della famiglia dei recettori del TGF- β , ha dimostrato di avere importanti effetti positivi in termini di emodinamica e clinica nei pazienti affetti da PAH di Gruppo 1. In particolare, sembra che le molecole che agiscono sulla via di segnalazione dell’attivina abbiano la capacità di ridurre il rimodellamento vascolare periferico a carico delle piccole arterie muscolarizzate nei pazienti affetti da PAH, con effetto finale di miglioramento dei parametri emodinamici valutati mediante cateterismo cardiaco destro, ed apparentemente miglioramento del rimodellamento maladattativo del ventricolo destro^{12,15,26}.

Alla luce degli effetti positivi sul rimodellamento vascolare polmonare distale osservato nei pazienti con PAH di Gruppo 1 e visto il ruolo che l’attivazione del pathway dell’attivina/p-Smad2 sembra avere anche nella microvasculopatia dei pazienti affetti da CTEPH, sembra logico pensare che le molecole che agiscono su questa via di segnalazione possano trovare un impiego anche nei pazienti affetti da CTEPH, soprattutto in quelli con forme più severe, forme non candidabili a chirurgia o forme di PH persistente post-intervento invasivo, dove è lecito pensare che ci sia un interessamento microvascolare più diffuso.

Tuttavia, il potenziale terapeutico del sotatercept, e di altre molecole simili, dovrebbe comunque essere valutato con cautela, dato che tali farmaci sono stati associati ad un aumento del rischio emorragico in pazienti con PAH. Considerando che i pazienti affetti da CTEPH risultano solitamente più anziani e spesso presentano più comorbidità rispetto a quelli appartenenti al Gruppo 1, oltre al fatto che assumono terapia anticoagulante a vita, l’uso degli antagonisti dell’attivina potrebbe risultare più problematico nei pazienti affetti da CTEPH rispetto a quelli con PAH.

Nonostante ciò, studi recenti hanno dimostrato che il sotatercept è in grado di determinare una riduzione significativa delle resistenze vascolari polmonari, legata principalmente ad un effetto diretto sulla pressione arteriosa polmonare media, senza influenzare in maniera sostanziale la gittata cardiaca²⁷. Tale effetto evidenziato a livello emodinamico sembra essere completamente diverso da quello caratteristico dei classici vasodilatatori polmonari che agiscono sulla via del monossido di azoto, dell’endotelina-1 e della prostaciclina, risultando

altresì simile a quello osservato nei pazienti affetti da CTEPH e trattati mediante disostruzione meccanica tramite endoarteriectomia e/o angioplastica polmonare.

In questo studio abbiamo anche analizzato le concentrazioni plasmatiche e la dinamica di altri biomarcatori, in particolare quelli correlati con l'infiammazione, che hanno precedentemente dimostrato di avere un valore predittivo significativo in termini di prognosi, in altre forme di ipertensione polmonare appartenenti al Gruppo 1²⁸.

Nella nostra coorte, i pazienti affetti da CTEPH presentavano concentrazione peroperatoria di proteina C reattiva (CRP) più elevati rispetto ai controlli e l'aumento dei valori di CRP si è dimostrato associato ad un aumentato rischio di sviluppare ipertensione polmonare residua post-intervento. Studi recenti hanno mostrato che CRP potrebbe essere coinvolta nel processo di rimodellamento vascolare polmonare nei pazienti affetti da CTEPH⁶. In particolare, un aumento della concentrazione di CRP valutata pre-intervento sembra essere associata ad una riduzione della sopravvivenza libera da trapianto di polmone ed ad un incremento del rischio di sviluppare ipertensione polmonare persistente o residua post-chirurgica^{7,29-31}.

È noto che l'attivina sia coinvolta in diversi processi fisiologici^{26,32}, tra cui l'infiammazione e la fibrosi, e quindi saranno necessari ulteriori studi per chiarire ulteriormente quali siano le connessioni fisiopatologiche tra l'infiammazione, la fibrosi e lo sviluppo di CTEPH, per meglio chiarirne la fisiopatogenesi ed eventuali implicazioni terapeutiche.

5.1 Limiti dello studio

Nonostante sia il primo studio in cui si è esplorato in modo sistematico il ruolo del pathway dell'attivina in pazienti affetti da CTEPH, questo lavoro presenta alcuni limiti.

Primo fra tutti, la dimensione del campione è relativamente contenuta, sebbene rappresenti una delle corti prospettiche più ampie di pazienti affetti da CTEPH operabile con follow-up completo pre- e post-chirurgia.

In secondo luogo, nonostante gli studi di immunofluorescenza per la valutazione del rimodellamento vascolare periferico siano stati condotti su di un numero esiguo di campioni, bisogna sottolineare la complessità nel reperimento di tali tessuti umani, nel contesto di una patologia rara che non presenta indicazione al trapianto polmonare. Va infatti sottolineato che la maggior parte degli studi di immunofluorescenza nel contesto della CTEPH vengono effettuati su campioni operatori di materiale fibrotrombotico estratto dai polmoni dei soggetti

operati, non da campioni di tessuto polmonare espantato. Ovviamente questi due tipi diversi di materiale presentano caratteristiche istologiche ed espressione proteica completamente diversa, appartenendo anche a livelli diversi del circolo vascolare polmonare. Ricordiamo infatti che i frammenti di trombo estratti tramite PEA interessano al massimo arteriole sub-segmentarie, mentre i campioni di tessuto analizzati in questo lavoro contenevano vasi distali periferici e capillari arteriosi polmonari.

Bisogna quindi sottolineare come la coerenza riscontrata tra risultati delle analisi effettuate sui campioni plasmatici e quelli di immunofluorescenza effettuati sui reperti tissutali rafforzi profondamente la validità delle nostre conclusioni.

Ancora, nonostante l'uso di modelli multivariati, non è possibile escludere completamente la presenza di fattori confondenti non valutati, come per esempio la presenza di comorbidità infiammatorie croniche e la variabilità interindividuale nella clearance dei biomarcatori, considerando anche che la popolazione in esame è una popolazione relativamente anziana.

Questo lavoro è stato condotto esclusivamente su pazienti affetti da CTEPH operabile. Per quanto sia immaginabile che tali alterazioni persistano anche in pazienti affetti da forme trattabili esclusivamente con BPA e terapia medica, saranno necessari ulteriori studi su popolazioni più ampio ed eterogenee di pazienti CTEPH per confermare il ruolo del pathway dell'activina nel danno microvascolare di questi pazienti.

Infine, il follow-up post-operatorio nella nostra coorte si è limitato a pochi mesi post-intervento. Saranno necessari studi clinici longitudinali, prospettici con follow-up più lungo per validare ulteriormente la capacità dell'activina-A di predire gli esiti a lungo termine, inclusa un eventuale valore predittivo sulla sopravvivenza.

CAPITOLO 6: CONCLUSIONI

Il lavoro qui presentato dimostra che nei pazienti con CTEPH esiste un'iper-attivazione della via di segnalazione dell'attivina/p-Smad2-3 a livello delle arteriole polmonari muscolarizzate rimodellate. Inoltre, la concentrazione plasmatica di attivina-A valutata prima dell'intervento di endoarteriectomia polmonare risulta aumentata rispetto ai controlli e presenta valore predittivo indipendente di rischio di sviluppare ipertensione polmonare persistente dopo l'intervento chirurgico di PEA.

Tali evidenze suggeriscono che l'attivina-A possa essere utilizzata come biomarcatore predittivo indipendente per identificare pazienti a rischio di risposta sub-ottimale all'intervento chirurgico di disostruzione arteriosa polmonare, suggerendo che possano presentare rimodellamento microvascolare persistente. Inoltre, tale pathway potrebbe essere identificato come nuovo target terapeutico in questo sottogruppo di pazienti a maggiore rischio.

Una caratterizzazione più approfondita della via di segnalazione dell'attivina/p-Smad-2/3 potrebbe favorire lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, come avvenuto per l'ipertensione arteriosa polmonare, dove l'uso di molecole che agiscono come antagonisti dell'attivina ha dimostrato risultati promettenti. Grazie a questo approccio si potrebbe ottenere un miglioramento ulteriore nella gestione dei pazienti affetti da CTEPH, soprattutto nei casi non operabili o con malattia residua post-interventi di disostruzione meccanica, assicurando così a questi pazienti un miglioramento della qualità della vita e della prognosi.

—

BIBLIOGRAFIA

1. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, Carlsen J, Coats AJS, Escribano-Subias P, Ferrari P, Ferreira DS, Ghofrani HA, Giannakoulas G, Kiely DG, Mayer E, Meszaros G, Nagavci B, Olsson KM, Pepke-Zaba J, Quint JK, Rådegran G, Simonneau G, Sitbon O, Tonia T, Toshner M, Vachiery JL, Vonk Noordegraaf A, Delcroix M, Rosenkranz S, Schwerzmann M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2022;**43**:3618–3731.
2. Leber L, Beaudet A, Muller A. Epidemiology of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: identification of the most accurate estimates from a systematic literature review. *Pulm Circ* 2021;**11**:1–12.
3. Kim NH, D’Armini AM, Delcroix M, Jaïs X, Jevnikar M, Madani MM, Matsubara H, Palazzini M, Wiedenroth CB, Simonneau G, Jenkins DP. Chronic thromboembolic pulmonary disease. *Eur Respir J* 2024;**64**:2401294.
4. Konstantinides S V, Meyer G, Becattini C, Bueno H, Geersing G-J, Harjola V-P, Huisman M V, Humbert M, Jennings CS, Jiménez D, Kucher N, Lang IM, Lankeit M, Lorusso R, Mazzolai L, Meneveau N, Ní Áinle F, Prandoni P, Pruszczyk P, Righini M, Torbicki A, Belle E Van, Zamorano JL, Galié N, Gibbs JSR, Aboyans V, Ageno W, Agewall S, Almeida AG, Andreotti F, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS). *Eur Heart J* 2020;**41**:543–603.
5. Kim NH, Delcroix M, Jais X, Madani MM, Matsubara H, Mayer E, Ogo T, Tapson VF. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. 2019;
6. Wynants M, Quarek R, Ronisz A, Alfaro-Moreno E, Raemdonck D Van, Meyns B, Delcroix M. Effects of C-reactive protein on human pulmonary vascular cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2012;**40**:886–894.
7. Arthur Ataam J, Amsallem M, Guihaire J, Haddad F, Lamrani L, Stephan F, Jaïs X, Humbert M, Mercier O, Fadel E. Preoperative C-reactive protein predicts early postoperative outcomes after pulmonary endarterectomy in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2021;**161**:1532-1542.e5.
8. Jaïs X, Brenot P, Bouvaist H, Jevnikar M, Canuet M, Chabanne C, Chaouat A, Cottin V, Groote P De, Favrolt N, Horeau-Langlard D, Magro P, Savale L, Prévot G, Renard S, Sitbon O, Parent F, Trésorier R, Tromeur C, Piedvache C, Grimaldi L, Fadel E, Montani D, Humbert M, Simonneau G. Balloon pulmonary angioplasty versus riociguat for the treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension (RACE): a multicentre, phase 3, open-label, randomised controlled trial and ancillary follow-up study. *Lancet Respir Med* 2022;**10**:961–971.
9. Ghofrani H-A, D’Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Simonneau G, Wilkins MR, Fritsch A, Neuser D, Weimann G, Wang C. Riociguat for the Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 2013;**369**:319–329.
10. Jaïs X, D’Armini AM, Jansa P, Torbicki A, Delcroix M, Ghofrani HA, Hoeper MM, Lang IM, Mayer E, Pepke-Zaba J, Perchenet L, Morganti A, Simonneau G, Rubin LJ. Bosentan for Treatment of Inoperable Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2008;**52**:2127–2134.
11. Ghofrani H-A, Simonneau G, D’Armini AM, Fedullo P, Howard LS, Jaïs X, Jenkins DP, Jing Z-C, Madani MM, Martin N, Mayer E, Papadakis K, Richard D, Kim NH, Lang I, Kähler C, Delcroix M, Bshouty Z, Sepulveda Varela P, Jing Z-C, Yang Y, Liu

- J, Zhang G, Zhang N, Mi Y, Zhu X, Jansa P, Jaïs X, Prévot G, Bouvaist H, et al. Macitentan for the treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension (MERIT-1): results from the multicentre, phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Respir Med* 2024;**12**:e21–e30.
12. Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, Gomberg-maitland M, Hoeper MM, Preston IR, Souza R, Waxman AB, Ghofrani H, Subias PE, Feldman J, Meyer G. Sotatercept for the treatment of pulmonary arterial hypertension : PULSAR open-label extension. 2023;
 13. Maitland MG, Hoeper MM, Preston IR, Subias PE, Ph D, Feldman J, Meyer G, Montani D, Ph D, Olsson KM, Manimaran S, Ph D, Barnes J, Ph D, Linde PG, Pena JDO, Ph D. Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. 2021;
 14. Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, Gomberg-Maitland M, Hoeper MM, Preston IR, Souza R, Waxman A, Escribano Subias P, Feldman J, Meyer G, Montani D, Olsson KM, Manimaran S, Barnes J, Linde PG, Oliveira Pena J de, Badesch DB. Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2021;**384**:1204–1215.
 15. Hoeper MM, Badesch DB, Ghofrani HA, Gibbs JSR, Gomberg-Maitland M, McLaughlin V V., Preston IR, Souza R, Waxman AB, Grünig E, Kopeć G, Meyer G, Olsson KM, Rosenkranz S, Xu Y, Miller B, Fowler M, Butler J, Koglin J, Oliveira Pena J de, Humbert M. Phase 3 Trial of Sotatercept for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2023;**388**:1478–1490.
 16. Guignabert C, Savale L, Boucly A, Thuillet R, Tu L, Ottaviani M, Rhodes CJ, Groote P De, Prévot G, Bergot E, Bourdin A, Howard LS, Fadel E, Beurnier A, Roche A, Jevnikar M, Jaïs X, Montani D, Wilkins MR, Sitbon O, Humbert M. Serum and Pulmonary Expression Profiles of the Activin Signaling System in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2023;**147**:1809–1822.
 17. Galiè N, Humbert M, Vachieri J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endo. *Eur Heart J* 2016;**37**:67–119.
 18. Cuomo A, Normand C, Thuillet R, Jaffrezic T, Tu L, Jaïs X, Jevnikar M, Montani D, Boucly A, Sitbon O, Mercurio V, Fadel E, Mercier O, Guignabert C, Humbert M, Savale L. The Activin Pathway in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Potential Biomarker for Residual Pulmonary Hypertension After Endarterectomy. *ERJ Open Res* 2025;01302–02024.
 19. Benchenouf F, Cuomo A, Gorth DJ, Normand C, Thuillet R, Ottaviani M, Akamkam A, Menager J-B, Fadel G, Grynblat J, Ghigna M-R, Fadel E, Savale L, Mercier O, Tu L, Humbert M, Guignabert C. Exploring the Endothelin-1 pathway in chronic thromboembolic pulmonary hypertension microvasculopathy. *Sci Rep* 2024;**14**:28308.
 20. Delcroix M, Perrot M de, Jaïs X, Jenkins DP, Lang IM, Matsubara H, Meijboom LJ, Quarck R, Simonneau G, Wiedenroth CB, Kim NH. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: realising the potential of multimodal management. *Lancet Respir Med* 2023;**11**:836–850.
 21. Simonneau G, Torbicki A, Dorfmueller P, Kim N. The pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* 2017;**26**:160112.
 22. Dorfmueller P, Günther S, Ghigna M-R, Thomas de Montpréville V, Boulate D, Paul J-F, Jaïs X, Decante B, Simonneau G, Darteville P, Humbert M, Fadel E, Mercier O.

- Microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a role for pulmonary veins and systemic vasculature. *Eur Respir J* 2014;**44**:1275–1288.
23. Bochenek ML, Leidinger C, Rosinus NS, Gogiraju R, Guth S, Hobohm L, Jurk K, Mayer E, Münzel T, Lankeit M, Bosmann M, Konstantinides S, Schäfer K. Activated Endothelial TGF β 1 Signaling Promotes Venous Thrombus Nonresolution in Mice Via Endothelin-1. *Circ Res* 2020;**126**:162–181.
 24. Bochenek ML, Saar K, Nazari-Jahantigh M, Gogiraju R, Wiedenroth CB, Münzel T, Mayer E, Fink L, Schober A, Hübner N, Guth S, Konstantinides S, Schäfer K. Endothelial Overexpression of TGF- β -Induced Protein Impairs Venous Thrombus Resolution. *JACC Basic to Transl Sci* 2024;**9**:100–116.
 25. Candia AF, Watabe T, Hawley SHB, Onichtchouk D, Zhang Y, Derynck R, Niehrs C, Cho K WY. Cellular interpretation of multiple TGF- β signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development* 1997;**124**:4467–4480.
 26. Ryanto GRT, Ikeda K, Miyagawa K, Tu L, Guignabert C, Humbert M, Fujiyama T, Yanagisawa M, Hirata K, Emoto N. An endothelial activin A-bone morphogenetic protein receptor type 2 link is overdriven in pulmonary hypertension. *Nat Commun* 2021;**12**:1720.
 27. Souza R, Badesch DB, Ghofrani HA, Gibbs JSR, Gombert-Maitland M, McLaughlin V V., Preston IR, Waxman AB, Grünig E, Kopeć G, Meyer G, Olsson KM, Rosenkranz S, Lin J, Johnson-Levonas AO, Oliveira Pena J de, Humbert M, Hoeper MM. Effects of sotatercept on haemodynamics and right heart function: analysis of the STELLAR trial. *Eur Respir J* 2023;**62**:2301107.
 28. Boucly A, Tu L, Guignabert C, Rhodes C, Groote P De, Bergot E, Bourdin A, Beurnier A, Roche A, Jevnikar M, Jaïs X, Montani D, Wilkins MR, Humbert M, Sitbon O, Savale L. Cytokines as Prognostic Biomarkers in Pulmonary Arterial Hypertension. 2022;
 29. Quarck R, Nawrot T, Meyns B, Delcroix M. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* United States; 2009;**53**:1211–1218.
 30. Quarck R, Wynants M, Verbeken E, Meyns B, Delcroix M. Contribution of inflammation and impaired angiogenesis to the pathobiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2015;**46**:431–443.
 31. Skoro-Sajer N, Gerges C, Gerges M, Panzenböck A, Jakowitsch J, Kurz A, Taghavi S, Sadushi-Kolici R, Campean I, Klepetko W, Celermajer DS, Lang IM. Usefulness of thrombosis and inflammation biomarkers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension—sampling plasma and surgical specimens. *J Hear Lung Transplant* 2018;**37**:1067–1074.
 32. Joshi SR, Liu J, Bloom T, Atabay EK, Kuo TH, Lee M, Belcheva E, Spaits M, Grenha R, Maguire MC, Frost JL, Wang K, Briscoe SD, Alexander MJ, Herrin BR, Castonguay R, Pearsall RS, Andre P, Yu PB, Kumar R. Sotatercept analog suppresses inflammation to reverse experimental pulmonary arterial hypertension. *Sci Rep* Nature Publishing Group UK; 2022;1–18.