



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN "MEDICINA MOLECOLARE "

CICLO XXXIII

***FIBROSI ED ESPRESSIONE DI MARCATORI DI AUTOFAGIA IN BIOPSIE DI
MIOCARDIO ATRIALE SINISTRO OTTENUTE DA PAZIENTI CON
FIBRILLAZIONE ATRIALE PERSISTENTE IN CORSO DI ABLAZIONE
CHIRURGICA E CORREZIONE DI VIZIO VALVOLARE MITRALICO***

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:

Chiar.mo Prof. Domenico Corradi

Dottorando: Dott. Rodolfo Monaco

Anni Accademici 2017/2018 – 2019/2020

INDICE

| | |
|-----------------------------|---------|
| Riassunto - Abstract | pag. 1 |
| Introduzione | pag. 8 |
| Materiali e Metodi | pag. 15 |
| Risultati | pag. 27 |
| Discussione | pag. 31 |
| Tabelle | pag. 38 |
| Figure | pag. 40 |
| Bibliografia | pag. 45 |

RIASSUNTO - ABSTRACT

La fibrillazione atriale (FA) è l'aritmia sostenuta più frequente nella pratica clinica. Vari studi hanno dimostrato che nella FA, come anche nella sua fase pre-aritmica, sono presenti modificazioni del miocardio atriale prevalentemente sinistro, nel complesso denominate "rimodellamento strutturale". Tra queste, la fibrosi è la modificazione più stabile e di conseguenza irreversibile.

L'autofagia è un processo intracellulare pato-fisiologico finalizzato al ricambio delle componenti cellulari senescenti. Di recente, vari studi hanno indagato il suo ruolo in alcune patologie cardiovascolari e non, dal momento che una sua alterata regolazione ne potrebbe rappresentare un potenziale meccanismo patogenetico.

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare se i processi autofagici correlino o meno con il grado di fibrosi miocardica in pazienti affetti da FA persistente di lunga durata.

Sono state studiate 50 biopsie atriali sinistre da altrettanti pazienti con FA persistente di lunga durata operati presso l'Ospedale San Raffaele di Milano per intervento di ablazione atriale chirurgica combinata a correzione di preesistente patologia valvolare mitralica (insufficienza). Come controlli sono stati utilizzati 10 atri autoptici da soggetti privi di patologie cardiovascolari. L'esame istologico, oltre a valutare la morfologia di base, ha consentito la quantificazione percentuale di fibrosi patologica (sia

interstiziale che perivascolare) valutata morfometricamente su preparati colorati con Picrosirius red. Negli stessi preparati, la fibrosi è anche stata valutata in termini di evoluzione architetturale della deposizione di fibre collagene (stadi evolutivi della fibrosi).

Le concentrazioni di Beclin-1 e LC3B sono state misurate, rispettivamente in ELISA ed in Western Blot, su frammenti miocardici congelati all'origine dalle medesime biopsie. Sugli stessi campioni congelati sono stati inoltre quantificati i livelli di espressione dei miRNA 30a e miRNA 204 (regolatori rispettivamente di Beclin-1 e LC3B) mediante una combinazione di Reverse Transcriptase-polymerase Chain reaction (RT-PCR) e Real Time PCR.

I risultati hanno confermato quanto riportato in letteratura per quanto riguarda gli aspetti istopatologici della fibrosi, essendo quest'ultima maggiore nei campioni di pazienti con FA rispetto ai controlli (rispettivamente $17,4\% \pm 8,7\%$ vs. $1,1\% \pm 0,4\%$; $P < 0,001$). L'espressione di Beclin-1 è risultata ridotta nei casi patologici rispetto ai controlli ($P = 0,05$). Non sono state al contrario dimostrate differenze significative tra FA e controlli per quanto riguarda LC3B ed i due miRNA investigati. Inoltre, nei casi patologici, la correlazione tra percentuale di fibrosi e i valori di Beclin-1, LC3B, miR-30a o miR-204 non è risultata significativa.

In conclusione, i dati emersi dal presente studio hanno confermato che il fenomeno fibrotico sia presente e progredisca in pazienti con FA persistente. Tuttavia, sebbene Beclin-1 sia diminuita nei casi FA – suggerendo un minore autofagia in questa condizione – non è stato possibile trovare delle solide evidenze che testimonino correlazioni fra autofagia e grado di fibrosi interstiziale sinistra. Sarebbero necessarie ulteriori indagini su modelli animali di FA per valutare se anche negli stadi più precoci della malattia un'alterazione dell'autofagia sia slegata dal controllo del meccanismo di rimodellamento strutturale (e viceversa).

“FIBROSIS AND EXPRESSION OF AUTOPHAGY MARKERS IN LEFT ATRIAL BIOPSIES OBTAINED FROM PATIENTS WITH PERSISTENT ATRIAL FIBRILLATION DURING SURGICAL ABLATION AND COMBINED MITRAL VALVE SURGERY”

Atrial fibrillation (AF) is the most frequent sustained arrhythmia in clinical practice. Various studies have shown that in AF, as well as in its pre-arrhythmic phase, there are mainly left atrial myocardial changes, collectively referred to as "structural remodeling". Among these modifications, fibrosis is the most stable and consequently irreversible change.

Autophagy is a patho-physiological intracellular process aimed at replacing the senescent cell components. Recently, various studies have investigated its role in some cardiovascular and non-cardiovascular diseases since its altered regulation could represent a potential pathogenetic mechanism.

The aim of this study was to verify whether autophagic processes correlate with the degree of myocardial fibrosis in patients with long-lasting persistent AF.

For this purpose, 50 left atrial biopsies were studied from as many patients with persistent long-lasting AF operated at the San Raffaele Hospital in Milan for surgical atrial ablation combined with correction of pre-existing mitral valve disease (regurgitation). Ten autopsy atria from subjects without cardiovascular disease were used as controls. Our histological examination,

in addition to assessing the basic morphology, allowed us a percentage quantification of the pathological fibrosis (both interstitial and perivascular) which was evaluated morphometrically on histological slides stained with Picrosirius red. In the same slides, fibrosis was also assessed in terms of its architectural evolution in terms of deposition of collagen fibers (so-called “developmental stages of fibrosis”).

The concentrations of Beclin-1 and LC3B were measured by means of ELISA and Western Blot, respectively, on frozen myocardial fragments obtained from the same original biopsies. The expression levels of miRNA 30a and miRNA 204 (regulators of Beclin-1 and LC3B, respectively) were also quantified on the same frozen samples by a combination of Reverse Transcriptase-polymerase Chain reaction (RT-PCR) and Real Time PCR.

Our results confirmed what had previously been reported in the scientific literature about the histopathological aspects of fibrosis, these latter being greater in patients with AF than in controls ($17,4\% \pm 8,7\%$ vs. $1,1\% \pm 0,4\%$; $P < 0.001$). Beclin-1 expression was reduced in pathological cases compared to controls ($P = 0.05$). On the contrary, no significant differences were demonstrated between FA patients and controls in terms of LC3B and the two investigated miRNA levels. Furthermore, in pathological cases, the correlations between the percentages of fibrosis and the levels of Beclin-1, LC3B, miR-30a, and miR-204 were not statistically significant.

In conclusion, our data confirmed that the atrial fibrotic process is real and, in patients with persistent AF, progresses through different architectural stages. However, although Beclin-1 decreased in AF cases (this fact suggesting lower levels of autophagy in this condition) it was impossible to find solid evidences of a correlation between autophagy and the degree of left interstitial fibrosis. Further investigations on animal models of AF would be recommended to assess whether in the earlier stages of the disease an alteration of autophagy might have a role in influencing the structural remodeling in this supraventricular arrhythmia.

INTRODUZIONE

Nell'ambito delle patologie cardiache che interessano l'origine e la conduzione dell'impulso, la fibrillazione atriale (FA) è la più frequente aritmia sostenuta nella pratica clinica. La FA colpisce l'1-2% della popolazione generale e la sua prevalenza aumenta con l'età: da < 0,5% a 40-50 anni al 5-15% a 80 anni. In base a caratteristiche quali la presentazione e la durata dell'aritmia, la FA può essere classificata come: *FA alla prima diagnosi*, *FA parossistica*, *FA persistente*, *FA persistente di lunga durata* e *FA permanente*.¹

La FA può presentarsi sia in forma “*isolata*” in soggetti che apparentemente non presentano patologie concomitanti, sia associata a patologie cardiache strutturali come cardiopatia ischemica, cardiomiopatia ipertrofica o dilatativa, ipertensione arteriosa e valvulopatie (la FA è presente infatti nel 30% circa dei pazienti con stenosi mitralica e nel 15% di quelli con insufficienza mitralica).²⁻⁶ Altre patologie che possono rappresentare un ulteriore fattore di rischio predisponente per la FA sono l'ipertiroidismo, l'obesità e la sindrome da apnee ostruttive del sonno. Inoltre, ulteriori condizioni, spesso transitorie, legate alla FA sono un eccessivo consumo di alcolici, interventi di chirurgia cardiaca e di chirurgia toracica, l'infarto miocardico, l'embolia polmonare, le miocarditi e le pericarditi.^{1,7,8}

La FA è caratterizzata dal punto di vista fisiopatologico da multipli fronti di propagazione dell'impulso elettrico, i quali si diffondono in diverse

direzioni, determinando una disorganizzazione dell'onda di depolarizzazione a livello atriale con conseguente perdita della coordinata ed efficace contrazione di quest'ultimo.⁹

Rimodellamento strutturale

A livello atriale, gli unici cardiomiociti che costituiscono il sistema di conduzione sono localizzati a livello dei nodi senoatriale (NSA) ed atrio-ventricolare (NAV). Infatti, l'impulso cardiaco generato nel NSA viene condotto al NAV ed al rimanente miocardio atriale attraverso il miocardio atriale "di lavoro" ed in modo strettamente dipendente dall'orientamento anatomico delle fibre miocardiche.¹⁰

Gli studi che hanno indagato la FA dal punto di vista anatomo-patologico hanno dimostrato come in questa vi siano modificazioni del miocardio atriale in particolare a livello della parete miocardica atriale sinistra, prevalentemente nella zona intorno allo sbocco delle vene polmonari. Questo meccanismo denominato *rimodellamento strutturale* è stato definito come l'insieme di modificazioni istologiche/ultrastrutturali morfologicamente rilevabili, risultante dalla somma inizialmente degli effetti di patologie concomitanti e successivamente anche della stessa FA. Esso è composto da alterazioni strutturali sia di tipo interstiziale, come fibrosi e ridotta densità capillare, che cardiomiocitarie (ad esempio miocitolisi,

ipertrofia miocitaria e rimodulazione del fenotipo cardiomiocitario con riespressione di proteine strutturali miocitarie di tipo fetale e ridotta espressione di proteine di tipo adulto).

Tra le modificazioni del rimodellamento strutturale, la fibrosi è considerata il difetto più stabile e, di fatto, non reversibile. La fibrosi origina da due meccanismi differenti e non mutualmente esclusivi: come processo "riparativo" di sostituzione di cardiomiociti andati incontro a morte cellulare e/o come processo "reattivo", con iper-regolazione di vie molecolari pro-fibrotiche (anche innescate da trigger meccanici come lo stress di parete in seguito a dilatazione della camera atriale). Queste alterazioni strutturali supportano fortemente l'ipotesi che le sedi ove il rimodellamento sia più marcato siano fortemente a rischio nell'induzione e mantenimento della FA. Pertanto, l'instaurarsi della fibrosi nel miocardio atriale può compromettere la conduzione dell'impulso cardiaco a tale livello e di conseguenza contribuire all'insorgenza e/o al mantenimento della FA stessa.¹¹⁻¹⁸

Fibrillazione atriale e autofagia

Alcuni studi recenti hanno indagato l'autofagia come uno dei possibili meccanismi coinvolti nella generazione e nel mantenimento di alcuni aspetti del rimodellamento strutturale cardiomiocitario ed interstiziale nella FA.¹⁹⁻²⁵ L'autofagia è un processo cellulare multifattoriale regolato da segnali di tipo

biochimico che si svolge a livello intracellulare ed è presente a livelli basali nella maggior parte dei tessuti al fine di permettere il fisiologico ricambio di diverse componenti cellulari (es. le proteine del citoscheletro cellulare). Attraverso tale meccanismo la cellula indirizza i propri costituenti ormai senescenti alla degradazione lisosomiale, ricavandone in tal modo energia utile al mantenimento della propria omeostasi energetica. Essa può anche essere stimolata da segnali esterni in condizioni ambientali sfavorevoli, ad esempio in caso di patologie che determinino una condizione di stress ossidativo tissutale protratto nel tempo. Nonostante il ruolo protettivo che l'autofagia può esercitare in caso di malattia, è stato dimostrato come un'iperstimolazione, o ipostimolazione, della stessa possa essere alla base di un tipo di morte cellulare con caratteristiche uniche e distinte da altre modalità come necrosi ed apoptosi.^{26,27}

L'attività autofagica può essere stimata indirettamente attraverso la misurazione dei livelli di alcune proteine della cascata del segnale autofagico come Beclin-1 e LC3B. Ulteriori marcatori che ne permettono il monitoraggio indiretto a livello molecolare sono alcuni micro-RNA (miRNA), molecole di RNA non codificante che risultano essere coinvolte direttamente o indirettamente nella regolazione della maggior parte dei processi cellulari (ad esempio proliferazione e differenziazione cellulare, apoptosi ed autofagia). Sono infatti presenti in letteratura studi che hanno

mostrato come i livelli di espressione di alcuni miRNA possano essere correlati sia con l'aumento che con la diminuzione dell'autofagia, potenzialmente rappresentando marcatori molecolari indiretti per il suo monitoraggio.²⁰⁻²² È questo il caso del miRNA 30a (miR-30a), le cui *upregulation* e *downregulation* sono correlate, tra l'altro, rispettivamente a diminuzione ed aumento di Beclin-1, e del miRNA 204 (miR-204), le cui *upregulation* e *downregulation* sono correlate rispettivamente a diminuzione ed aumento di LC3B.²⁸⁻³⁰

In letteratura vi sono inoltre evidenze di come l'autofagia giochi un ruolo importante nell'insorgenza di patologie cardiache a livello del miocardio ventricolare. Ad esempio, è stato osservato che in alcune forme di cardiomiopatia ereditaria sono alterati geni che codificano per proteine coinvolte nell'autofagia, con conseguente accumulo di queste ultime.³¹⁻³³ Più di recente, uno studio ha analizzato l'espressione di geni correlati all'autofagia nel miocardio ventricolare di pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa ed è stato osservato come vi fosse una correlazione significativa tra i livelli di autofagia ed il grado di rimodellamento del ventricolo sinistro, quest'ultimo valutato in base a parametri quali la frazione di eiezione ed i diametri ventricolari telediastolico e telesistolico.³⁴ In un altro studio sono stati indagati, in un modello animale di ipertensione polmonare i livelli di Beclin-1 e di altri marcatori di autofagia in sede ventricolare destra,

evidenziando la presenza di una *upregulation* autofagica correlata al livello di ipertrofia del miocardio ventricolare destro.³⁵

Scopo dello studio

In questo studio osservazionale retrospettivo sono state analizzate le alterazioni istopatologiche morfo-strutturali riguardanti la fibrosi a livello atriale sinistro nella FA persistente di lunga durata associata a valvulopatia mitralica, allo scopo di verificare la sussistenza di un'eventuale correlazione tra livelli di attività autofagica tissutale (in termini di livelli di Beclin-1 e LC3B e loro modulatori, rispettivamente, miR-30a e miR-204) e grado di fibrosi miocardica atriale sinistra.

MATERIALI E METODI

Selezione della casistica

In questo studio sono stati individuati due gruppi di soggetti: *Gruppo 1*: pazienti affetti da FA persistente sottoposti a procedura di ablazione atriale sinistra mediante radiofrequenza, sia isolata che combinata ad intervento cardiocirurgico per una preesistente patologia valvolare mitralica; *Gruppo 2*: casi autoptici di controllo da individui senza patologie cardiovascolari.

La popolazione del *Gruppo 1*, composta da 50 pazienti, è stata selezionata in base alla disponibilità dei dati in cartella clinica per la revisione nonché di materiale bioptico sufficiente e qualitativamente adeguato alle varie analisi da effettuare. I campioni sono stati prelevati dalla parete posteriore dell'atrio sinistro durante gli interventi cardiocirurgici, tutti eseguiti presso l'Unità di Chirurgia Cardiotoracica dell'Ospedale San Raffaele di Milano.³⁶

Come controlli sono stati utilizzati 10 campioni dalla stessa sede di atrio sinistro ottenuti durante riscontri autoptici. Tutte le autopsie sono state effettuate tra le 24 e le 36 ore dal decesso, nell'ambito del normale campionamento in sede di riscontro diagnostico. Sono stati esclusi dai controlli soggetti con aritmie, disfunzioni valvolari, arteriosclerosi delle arterie coronarie, pregressi infarti miocardici, focolai di fibrosi miocardica maggiori di 2 mm, presenza di cellule infiammatorie nell'interstizio,

sarcoidosi, amiloidosi, malattie infiammatorie croniche polmonari e connettiviti.³⁷

Il presente studio è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale San Raffaele di Milano. Tutti i pazienti avevano acconsentito allo studio firmando un consenso informato.

Trattamento dei campioni

Al momento del prelievo, ciascun campione dai due gruppi allo studio è stato suddiviso in due parti: una, destinata allo studio istologico e morfometrico, è stata immediatamente fissata in una soluzione al 10% di formalina tamponata e successivamente inclusa in paraffina; l'altra, destinata alle indagini molecolari; è stata immediatamente congelata in isopentano in precedenza raffreddato mediante immersione in azoto liquido.

Metodi d'indagine istopatologica

Campioni di miocardio atriale e valutazione della fibrosi

Tutte le biopsie sono state valutate con l'obiettivo di misurare morfometricamente entrambi i tipi di fibrosi miocardica noti (interstiziale e perivascolare) e descrivere una probabile e peculiare architettura con la quale la fibrosi si distribuisce a livello del tessuto della parete atriale.

Sono state allestite sezioni istologiche di 3-4 μm di spessore, colorate con ematossilina-eosina (Bio Optica, Milano, Italia) per la valutazione della morfologia di base e Picosirius Red (colorante: Direct red 80, Fluka, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) per la valutazione della fibrosi miocardica.³⁸

Per “fibrosi interstiziale” è stato inteso ogni anomalo allargamento degli spazi inter-cardiomiocitari causato da una deposizione di fibre di collagene di tipo I in eccesso rispetto al sottile strato di tessuto connettivo miocardico normale.³⁹ La “fibrosi perivascolare” è stata definita come un aumento centrifugo della quota di tessuto connettivo che fisiologicamente costituisce lo strato avventiziale dei vasi sanguigni intra-miocardici.¹⁵ Quindi sono state misurate mediante morfometria le percentuali di fibrosi ($F\%$) sia interstiziale (FI) che perivascolare (FP), ciascuna separatamente rispetto all’area totale della parete atriale occupata da fibre muscolari.⁴⁰ All’osservazione in microscopia ottica in campo chiaro, il Picosirius Red permette il riconoscimento delle strutture composte da fibre collagene (di colore rosso vivo). Ciascun preparato colorato con Picosirius Red è stato osservato e fotografato nella sua interezza con un obiettivo a 10x mediante un microscopio ottica a luce trasmessa (Eclipse 80i, Nikon Corporation, Tokyo, Giappone). Le frazioni percentuali di tessuto occupate da fibrosi sono state determinate applicando, con software Adobe Photoshop[®] 7.0.1, una griglia morfometrica costituita da 374 punti sulle microfotografie ottenute e

sommando la totalità dei punti corrispondenti alle strutture istologiche di interesse (fasci di collagene denso colorati in rosso). Dal rapporto con il totale dei punti sulla griglia è stata quindi misurata la frazione percentuale della deposizione patologica di fibre collagene (Fig. 1).^{11,41}

Contestualmente è stata eseguita un'analisi descrittiva riguardante la modificazione architetturale complessiva a livello tissutale, distinguendo alcuni pattern specifici di distribuzione spaziale e quantitativa dei singoli tipi di focolai di fibrosi (interstiziale e perivascolare) all'interno del tessuto (stadi di evoluzione della fibrosi, Fst).⁴²

Metodi d'indagine molecolari: casistica

Per le analisi molecolari, si è proceduto all'estrazione di proteine e acidi nucleici dalle frazioni dei campioni tissutali criopreservate con isopentano in precedenza raffreddato mediante immersione in azoto liquido e conservate ad una temperatura di -80 °C. Sono stati selezionati 24 pazienti del *Gruppo 1* e 7 casi di controllo del *Gruppo 2* per i quali fosse a disposizione una quantità di materiale congelato sufficiente per le analisi molecolari da effettuare.

Metodiche per la quantificazione delle proteine Beclin-1 e LC3B

Preparazione dei campioni

I campioni di tessuto cardiaco sono stati omogeneizzati in tampone fosfato salino (PBS) contenente un cocktail di inibitori di proteasi, sonicati e centrifugati per separare i frammenti dalla frazione solubile. Per la valutazione della concentrazione proteica del lisato tissutale è stato impiegato un metodo colorimetrico con acido bicinoninico (BCA) e solfato di rame (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Sono state successivamente utilizzate concentrazioni di Siero Albumina Bovina (BSA) comprese fra 200 e 0,5 µg/ml per costruire la curva di calibrazione.

Dosaggio di Beclin-1

La concentrazione di Beclin-1 negli estratti tissutali è stata valutata con un saggio “sandwich” E.L.I.S.A. disponibile in commercio (LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA); assay range: 10-0,157 ng/ml. I valori sono stati espressi in rapporto alla concentrazione proteica dei lisati (ng/mg di proteine).

Valutazione di LC3B con metodica Dot Blot/Western Blot

LC3B è stata dosata mediante l'accoppiamento sequenziale delle metodiche *Dot Blot* e *Western Blot*. È stata dapprima impiegata la tecnica Dot

Blot come screening e successivamente, nei campioni che risultavano avere concentrazioni adeguate di LC3B, è stata condotta l'analisi mediante Western Blot. Sono stati applicati su di una griglia disegnata sulla membrana di cellulosa 2 μ l di estratto tissutale e di controllo positivo, quest'ultimo costituito da un lisato di cellule HeLa trattate per 24 ore con cloroquina 50 μ M. Dopo asciugatura, sono state condotte incubazioni sequenziali intervallate da lavaggio in PBS. La prima ha previsto un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente con PBS contenente BSA 0,5%, poi 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario di coniglio anti-LC3B (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) diluito in PBS BSA 0,1%. Dopo il lavaggio è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-Ig di coniglio coniugato con biotina diluito in PBS BSA 0,1% per un tempo di incubazione analogo al primario. È stata poi aggiunta streptavidina coniugata con perossidasi diluita in PBS BSA 0,1% per 30 minuti a temperatura ambiente. Come substrato della perossidasi è stata impiegata 3,3' Diaminobenzidina (DAB) Reagent Set (KPL, Gaithersburg, MA, USA). Gli "spot" corrispondenti alle proteine sono poi stati valutati utilizzando il Fluor-S™ MultiImager (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) ed il segnale dei campioni è stato confrontato con quello del controllo positivo utilizzando il software Quantity One (BioRad Laboratories).

Valutazione di LC3B con metodica Western Blot

Gli estratti tissutali sono stati diluiti nel tampone di caricamento (loading buffer); dopo una fase di riscaldamento a 95° per 10 minuti, 40 µg di ciascun campione ed i marcatori di peso molecolare sono stati sottoposti a separazione mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide 12% in condizioni riducenti (SDS PAGE). Le proteine sono state poi trasferite su membrane di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Germania) mediante semi-dry Trans-blot SD (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Dopo incubazione con PBS contenente BSA al 0,5%, la membrana è stata lavata con PBS ed incubata per una notte a 4 °C con l'anticorpo policlonale di coniglio specifico per LC3B, diluito in PBS BSA 0,1%. Le membrane sono state poi lavate con PBS, incubate dapprima con anticorpi anti-IgG di coniglio coniugati con biotina per 2 ore a temperatura ambiente e successivamente con streptavidina coniugata con perossidasi per 30 minuti a temperatura ambiente. Come substrato chemiluminescente della perossidasi è stato impiegato ECL (Cyanagen, Bologna, Italia). Successivamente le bande corrispondenti alla proteina LC3B sono state analizzate utilizzando il Fluor-S™ MultiImager e le intensità sono state espresse come unità di densità ottica (ODu/mm²) utilizzando il software Quantity One. Una volta rilevate le bande di LC3B, la membrana è stata riutilizzata per l'analisi della β-actina, previa rimozione degli anticorpi legati con un tampone di stripping e lavaggi

in PBS. È stata quindi ripetuta la suddetta serie di incubazioni sequenziali intervallate da lavaggio. Prima fase di incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente con PBS - BSA 0,5%, poi incubazione di 2 ore a temperatura ambiente con anticorpo monoclonale di topo anti- β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluito in PBS BSA 0,1%. Successivo lavaggio ed aggiunta di anticorpo secondario anti-Ig di topo biotina-coniugato, diluito in PBS BSA 0,1% per 1 ora a temperatura ambiente. Aggiunta di streptavidina coniugata con perossidasi diluita in PBS BSA 0,1% ed ECL per 30 minuti a temperatura ambiente. Le bande sono state infine visualizzate con Fluor-S™ MultiImager.

Metodiche per la quantificazione di miR-30a e miR-204 con Real-Time PCR e RT-PCR

Sono stati misurati rispettivamente due miRNA che in letteratura sono risultano correlati alla regolazione dei processi autofagici; rispettivamente il *miR-30a*, il cui aumento è correlato ad una *downregulation* di Beclin-1 ed il *miR-204*, la cui diminuzione è correlata ad un aumento delle concentrazioni di LC3B.^{21,29}

Per quantificare i livelli di espressione di specifici miRNA la real-time PCR è stata accoppiata con metodica *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) con utilizzo di sonda fluorescente TaqMan®.⁴³

Estrazione degli RNA con metodica TRIzol™ Invitrogen

Dopo disgregazione mediante omogeneizzazione è stato aggiunto al materiale 1 ml di TRIzol™ Reagent, con incubazione a temperatura ambiente (22-25 °C) per 5 minuti. In successione sono stati aggiunti 200 µl di triclorometano per ogni ml di TRIzol™ Reagent impiegato; incubazione a temperatura ambiente per 2-3 minuti, quindi centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4 °C. Dopo aver prelevato la fase acquosa contenente gli acidi nucleici ed averla trasferita in una nuova provetta alla quale sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo (propan-2-olo) per ogni ml di TRIzol™ Reagent, i campioni sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente e nuovamente centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4 °C per permettere la formazione di un pellet contenente gli RNA. È stato rimosso il surnatante, lavato il pellet con 1 ml di etanolo 75% per ogni ml di TRIzol™ Reagent impiegato, vortexato e centrifugato a 7500 g per 5 minuti a 4 °C. È stato eliminato il surnatante e il pellet è stato dissolto in 50-100 µl di acqua *nucleasi-free*; infine, ultimo passaggio di incubazione per circa 10 minuti ad una temperatura di 55-60 °C e congelamento a -80 °C.

Retrotrascrizione dei miRNA

Dopo aver estratto ed isolato gli RNA, è stato effettuato il processo di retrotrascrizione dei miRNA mediante RT-PCR. Il programma di

retrotrascrizione ha previsto un ciclo di 30 minuti a 16 °C, un ciclo di 30 minuti a 42 °C ed un ciclo di 5 minuti a 85 °C. Il DNA complementare (cDNA) così ottenuto è stato poi diluito per la successiva reazione di quantificazione in Real Time PCR.

Quantificazione di miR-30a e miR-204

La reazione di Real Time PCR quantitativa è stata eseguita sul termociclatore iCycler iQ Real-Time Detection System (BioRad, USA) con l'utilizzo del kit TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, CA, USA).

Il protocollo di amplificazione ha previsto un ciclo di denaturazione di 10 minuti a 95 °C seguito da 40 cicli, ciascuno dei quali costituito da 2 step di 20 secondi a 94 °C e di 1 minuto a 60 °C. Per ogni reazione di amplificazione i campioni sono stati valutati in doppio e la validità della reazione è stata valutata attraverso il controllo negativo, dove al posto del cDNA è stata aggiunta H₂O. Per la normalizzazione dell'espressione dei miRNA in esame è stato utilizzato come housekeeping lo *small-nucleolar RNA* (snoRNA) RNU6B.

Analisi statistica

Le variabili categoriche sono espresse come frequenze assolute e percentuali. La distribuzione normale dei valori continui è stata verificata

mediante un test di Kolmogorov-Smirnov. I dati sono espressi come valori della media \pm deviazione standard. Le differenze tra i gruppi nei parametri morfometrici della fibrosi sono state valutate utilizzando un test di Mann-Whitney (test di Kruskal-Wallis seguito da un test post hoc di Dunn) o un test a campioni indipendenti (ANOVA seguito da un test post hoc di Tukey).

Nei due gruppi in esame sono state testate separatamente in pazienti e controlli le distribuzioni percentuali dei valori dei seguenti marcatori: Beclin-1, LC3B, miR-30a e miR-204. È stato eseguito un test di confronto a campioni indipendenti, confrontando casi controllo e patologici per le stesse variabili. In seguito, mediante test di Pearson, è stata testata separatamente in controlli e patologici la sussistenza di una correlazione tra le suddette variabili in modo indipendente in ciascun gruppo, incrociandole tra loro.

Tutte le analisi sopra menzionate sono state eseguite utilizzando il software SPSS versione 25.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL). I valori di $P < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Casistica e caratteristiche clinico-patologiche

Sulla base dei criteri di inclusione/esclusione dallo studio, sono stati reclutati nel *Gruppo 1* 50 pazienti (42 maschi e 8 femmine; rispettivamente 84% e 16%) affetti da FA persistente di lunga durata e sottoposti ad intervento cardiocirurgico di ablazione dell'aritmia mediante radiofrequenza e correzione di vizio valvolare mitralico (insufficienza mitralica). Nel *Gruppo 2*, erano inclusi 10 soggetti controllo sottoposti ad autopsia e deceduti per traumatismi. L'età era compresa di 56 ± 11 anni per i pazienti con FA e 48 ± 8 anni per i controlli autoptici. Le caratteristiche generali dei pazienti sono riassunte nella Tab. 1.

Risultati dell'analisi istologica e morfometrica

Riconoscimento e quantificazione e analisi morfometrica della fibrosi miocardica atriale

Nei casi patologici, la fibrosi miocardica è risultata essere qualitativamente caratterizzata dalla deposizione di fibre collagene negli spazi tra i cardiomiociti. Le aree tissutali occupate dalla deposizione interstiziale di collagene mostravano uno spettro di modificazioni così composto: 1) sottili bande di fibre collagene che non alteravano l'architettura tissutale; 2) bande più spesse che circondavano piccoli gruppi o singoli cardiomiociti; 3) aree in cui il tessuto miocardico era sostituito da spesse

bande collagene. La media delle percentuali di fibrosi interstiziale e perivascolare negli atri patologici ed in quelli di controllo è riportata in Tab. 2. Gli atri con FA avevano un danno interstiziale (FI%) marcatamente maggiore rispetto ai controlli (*Gruppo 1* vs. *Gruppo 2*; $P < 0,001$) (Fig. 2). Non vi erano invece differenze significative per quanto riguarda la fibrosi perivascolare (FP%).

Sulla base delle osservazioni microscopiche riguardanti la distribuzione spaziale dei focolai di fibrosi interstiziale e perivascolare, abbiamo individuato nella nostra casistica quattro differenti pattern istologici di Fst: *stadio I*, con presenza di singoli e sparsi foci di miocardiosclerosi provenienti dal subendocardio e/o dai tessuti periavventiziali; *stadio II*, con formazione di molteplici foci di miocardiosclerosi provenienti dal subendocardio e/o dai tessuti periavventiziali; *stadio III*, caratterizzato dalla generazione di foci di miocardiosclerosi confluenti tra loro; *stadio IV*, con fibrosi diffusa (Fig. 3). La frequenza di Fst nel gruppo di casi patologici è riportata in Tab. 2.

Risultati delle analisi molecolari

Quantificazione delle proteine Beclin-1 e LC3B

I risultati della quantificazione di Beclin-1 e LC3B nei campioni sono riassunti in Tab. 2. La concentrazione di Beclin-1 è risultata

significativamente minore nei casi patologici confrontati con i controlli ($P=0,05$) (Fig. 4). Non è stata invece dimostrata una differenza significativa di espressione di LC3B tra i due gruppi.

Quantificazione di miR-30a e miR-204

I risultati del confronto tra i profili di espressione rispettivamente di miR-30a e miR-204 in casi patologici e controlli sono riassunti in Tab. 2. Per entrambi, il test di confronto a campioni indipendenti non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi in esame.

Correlazione tra le variabili esaminate

Nell'analisi delle correlazioni tra le variabili in esame, nei casi patologici abbiamo evidenziato una correlazione altamente significativa tra F^{st} e $F^{\%}$ ($P<0,001$). Per quanto riguarda le analisi molecolari, le correlazioni tra i valori di Beclin-1/LC3B e miR-30a/miR-204 hanno raggiunto la significatività statistica nei casi patologici (Figg. 5 e 6). Nei casi di controllo una correlazione ha raggiunto la significatività statistica: miR-30a/miR-204 (Fig. 7).

DISCUSSIONE

Nel presente studio è stato confermato come la $F^{\%}$ – quindi la quantità relativa di collagene patologico presente a livello atriale – sia notevolmente maggiore nei casi patologici rispetto ai controlli e, come in caso di FA, sia attivato un meccanismo di rimodellamento strutturale del miocardio atriale. Questi dati, riferiti in particolare alla distribuzione interstiziale della fibrosi, nella nostra analisi sono infatti in linea con quanto riportato in letteratura.¹⁰

Nella serie di casi presi in esame abbiamo inoltre confermato come la deposizione patologica di collagene – fenomeno progressivo nel tempo – si instauri attraverso una caratteristica distribuzione spaziale, riassunta nel susseguirsi di quattro stadi architetturali della fibrosi (F^{st}). A conferma di ciò, abbiamo infatti riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra $F^{\%}$ e F^{st} , ovvero due modalità differenti di rappresentare la sclerosi miocardica. In questo scenario, il perdurare dell'aritmia favorisce uno sviluppo ulteriore della fibrosi, modificando la normale struttura del miocardio attraverso la deposizione di fibre collagene che costituiscono un tessuto inerte dal punto di vista funzionale cardiaco: la conduzione dell'impulso cardiaco viene così alterata e nel tempo il progressivo incremento della fibrosi crea un substrato più favorevole allo sviluppo ed al mantenimento dell'aritmia attraverso l'isolamento elettrico dei fasci di cardiomiociti. Questo dato, come visto in precedenza, è confermato nel nostro

studio, in quanto nella FA in pazienti chirurgici sono più rappresentati stadi della fibrosi di maggiore gravità (stadi III e IV).^{42,44}

Quanto allo studio di marcatori di autofagia, abbiamo osservato che nei casi di FA vi sia una diminuzione relativa rispetto ai controlli dei livelli di Beclin-1 ($P=0,05$) (Fig. 4). Al contrario, il confronto tra le concentrazioni rilevate di LC3B tra casi patologici e controlli, sebbene in linea con quanto osservato per Beclin-1, non ha mostrato significatività statistica. L'analisi statistica condotta per indicare eventuali correlazioni tra le variabili esaminate all'interno casi patologici e dei controlli ha rivelato l'esistenza di alcune correlazioni significative, sebbene non particolarmente utili nel dirimere il quesito di questo lavoro; nei casi patologici, infatti, la correlazione tra Beclin-1 e LC3B è risultata significativa ($P<0,05$), suggerendo che le due proteine potrebbero agire in sinergia nella regolazione della cascata del segnale autofagico; nei controlli tale relazione non è stata confermata e ciò con tutta probabilità a causa del minor numero di campioni.

Per quanto concerne l'analisi dei valori di espressione dei miRNA correlati al controllo delle proteine implicate nell'autofagia, i dati in nostro possesso hanno mostrato un andamento differente rispetto alle attese; abbiamo infatti riscontrato una diminuzione invece che un aumento dei livelli di espressione di entrambe le molecole nei casi patologici rispetto ai controlli (Tab. 2). Tali risultati sono infatti contrastanti rispetto a quanto talora

segnalato in letteratura riguardo alle attività regolatorie che questi due miRNA svolgono a livello della cascata autofagica.²⁸⁻³⁰ I nostri risultati potrebbero essere interpretati tenendo conto che tali molecole svolgono una miriade di azioni regolatorie sulle vie di segnale cellulare a livello post-trascrizionale e, di conseguenza, i loro livelli di espressione potrebbero essere influenzati anche dall'azione di altri meccanismi non ancora ad oggi completamente caratterizzati e compresi, quindi poco conosciuti. Inoltre, esiste anche la possibilità che il nostro dato possa essere stato influenzato da una più rapida degradazione dei miRNA rispetto alle proteine che abbiamo analizzato, con conseguente mancato rilevamento dei corretti valori di espressione. D'altro canto, nell'analisi tra i livelli di espressione dei due miRNA abbiamo osservato una correlazione significativa tra i valori di espressione sia nei casi patologici che nei controlli (Figg. 6 e 7).

Dal presente studio si osserva unicamente una possibile correlazione tra FA ed il marcatore di autofagia Beclin-1 in termini di diminuzione di quest'ultimo rispetto ai controlli; tale dato trova conferma in alcuni studi, condotti sia in modelli animali con FA indotta sperimentalmente che in pazienti fibrillanti, che hanno indagato come i livelli di attività autofagica possano modificarsi in tale patologia, mostrandosi generalmente diminuiti.^{24,25} In un recente studio condotto in vitro su colture cellulari di fibroblasti di campioni atriali provenienti da pazienti con FA è stato infatti

dimostrato come l'autofagia venga soppressa in favore dell'attivazione di vie di segnale profibrotiche e di conseguenza, potrebbe essere coinvolta nell'iniziazione oppure nella progressione dei processi di rimodellamento strutturale atriale. Nel medesimo studio sono stati dosati alcuni marcatori di autofagia, tra cui Beclin-1 e LC3B, su colture di fibroblasti atriali umani (ottenuti dal tessuto dell'auricola atriale sinistra di pazienti con FA) dopo stimolazione con osteopontina, osservando un aumento di procollagene I, considerato marker indiretto di fibrosi tissutale.⁴⁵ I dati di questo studio sono in accordo con quanto abbiamo potuto documentare in vivo a livello di diminuzione dei livelli di Beclin-1 nel tessuto atriale di pazienti con FA.

In base ai dati in nostro possesso, non abbiamo potuto dimostrare alcuna correlazione significativa tra la percentuale di fibrosi presente (F% e Fst) e i marcatori di autofagia da noi analizzati. Considerando come l'autofagia sia un processo multifattoriale al quale prendono parte numerose vie di segnalazione cellulare, le proteine da noi prese in esame con i loro rispettivi miRNA regolatori non sono le uniche coinvolte nei vari meccanismi autofagici descritti in letteratura: esistono infatti delle vie di segnale autofagico – definite come “autofagia non canonica” – indipendenti da Beclin-1 che potrebbero essere implicate nel processo di fibrogenesi attraverso vie di segnale alternative a quella da noi investigata.^{46,47}

Un limite del nostro studio è legato alla selezione dei pazienti in esame: la nostra casistica era composta da pazienti con FA di lunga durata, superiore ai 12 mesi, e sottoposti ad ablazione chirurgica dell'aritmia; di conseguenza abbiamo analizzato una fase tardiva della malattia, in cui il fenomeno del rimodellamento è rappresentato in massima parte dalla fibrosi (maggioranza di alti stadi di fibrosi, *stadi III e IV*) e nel quale il ruolo dell'autofagia potrebbe essere minore rispetto a fasi più iniziali di malattia. Inoltre, soltanto una quota minoritaria di pazienti ha mostrato bassi stadi di fibrosi (*stadi I e II*) e quindi il nostro dato potrebbe essere stato limitato dal basso numero di campioni con tali caratteristiche, ovvero in uno stadio di malattia iniziale.

Nel processo di rimodellamento atriale una modificazione cellulare che potrebbe essere correlata all'autofagia, osservabile istologicamente e presente già nelle fasi precoci della FA, è la miocitolisi. Uno studio pubblicato nel 2011 da Chen et al. ha dimostrato che la formazione di autofagosomi è aumentata nei cardiomiociti atriali (ottenuti da prelievi di auricola destra e sinistra) di pazienti con insufficienza mitralica e tricuspide severa, con o senza fibrillazione atriale. In particolare, è stata valutata l'espressione immunohistochimica di LC3B nei cardiomiociti, correlando positivamente l'incremento di cardiomiociti LC3B-positivi al grado di miocitolisi osservata.⁴⁸ Questo studio suggerisce che la miocitolisi possa rappresentare

un'alterazione cellulare di rimodellamento cardiomiocitario maggiormente influenzata da processi di autofagia rispetto alla fibrosi.

In ultimo, in letteratura sono riportati gli effetti sull'autofagia di alcuni farmaci antiaritmici come l'amiodarone e di molecole come l'angiotensina II a livello cardiaco e vascolare.^{49,50} In considerazione di ciò non possiamo escludere che i vari trattamenti farmacologici ai quali sono stati sottoposti i pazienti esaminati abbiano influito sui livelli dei marcatori di autofagia osservati; alcuni farmaci come ACE inibitori e antagonisti del recettore dell'angiotensina II potrebbero di fatto alterare l'espressione delle proteine markers di autofagia a livello tissutale.

In conclusione, i dati emersi dal presente studio hanno confermato che il fenomeno fibrotico sia presente e progredisca in pazienti con FA persistente. Tuttavia, sebbene Beclin-1 sia diminuita nei casi FA – suggerendo un minore autofagia in questa condizione – non è stato possibile trovare delle solide evidenze che testimonino correlazioni fra autofagia e grado di fibrosi interstiziale sinistra. Sarebbero necessarie ulteriori indagini (es. su modelli animali di FA) per valutare se anche negli stadi più precoci della malattia un'alterazione dell'autofagia sia slegata dal controllo del meccanismo di rimodellamento strutturale (e viceversa).

TABELLE

Tabella 1. Caratteristiche generali della popolazione in studio.

| | FA (n=50) | Controlli (n=10) |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| Età, anni | 56 ± 11 (31 - 78) | 48 ± 8 (42 - 62) |
| Sesso, M-F | 42 - 8 | 7 - 3 |
| Peso, kg | 85 ± 16 (69 - 109) | 81 ± 10 (70 - 90) |
| Altezza, cm | 172 ± 12 (160 - 189) | 174 ± 6 (165 - 180) |
| Durata della FA, mesi | 95 ± 67 (24 - 246) | |
| Peso cardiaco totale, g | | 362 ± 70 (280 - 410) |

Dati indicati come media ± deviazione standard e relativo intervallo tra parentesi. **Abbreviazioni.** FA: fibrillazione atriale; M: maschi; F: femmine.

Tabella 2. Distribuzione delle variabili misurate in FA e controlli.

| | FA | Controlli | FA (n) | Controlli (n) |
|--|--|--|--------|---------------|
| FI, % | 17,4±8,7 (4,8-37,6) | 1,1±0,4 (0,5-1,7) | 50 | 10 |
| FP, % | 0,4±0,2 (0,1-1,0) | 0,1±0,3 (0-0,5) | 50 | 10 |
| Fst I/II/III/IV, n (%) | 2(4) / 10(20) / 20(40) / 18(36) | / | 50 | 10 |
| Beclin-1, ng/mg prot | 2,89±1,34 | 5,45±2,77 | 24 | 7 |
| miR-30a* | 244,1 [^] (2,79) ^ç | 249,7 [^] (2,14) ^ç | 24 | 7 |
| LC3B, U/mg prot§ | 2,08 [^] (1,86) ^ç | 2,31 [^] (1,28) ^ç | 24 | 7 |
| miR-204* | 11,24 [^] (3,17) ^ç | 16,73 [^] (3,10) ^ç | 24 | 7 |

Dati espressi come frequenza con la relativa percentuale tra parentesi o come media ± deviazione standard e relativo intervallo tra parentesi.

Abbreviazioni. n: numero di pazienti; [^]: media geometrica; ^ç: deviazione standard geometrica. FA: fibrillazione atriale; FI: fibrosi interstiziale; FP: fibrosi perivascolare; Fst: stadi fibrosi. * = espressione relativa rispetto al *gene housekeeping RNU6B*; § = ODu/mm²/mg proteine.

FIGURE

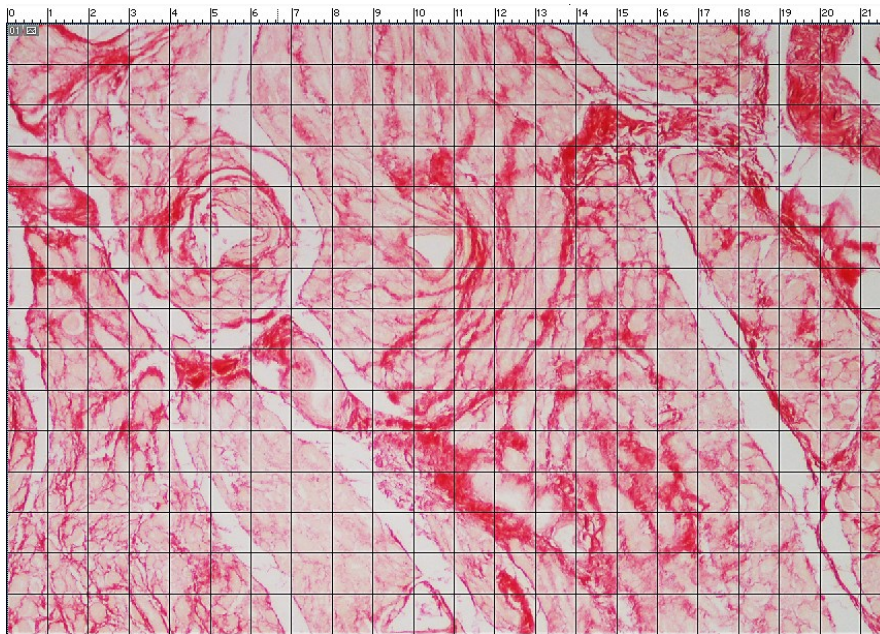


Figura 1. Analisi morfometrica fotografica.

Esempio di caso patologico; griglia morfometrica a 374 punti. **Colorazione:** Picrosirius red; **Ingrandimento originale:** con obiettivo a 10x.

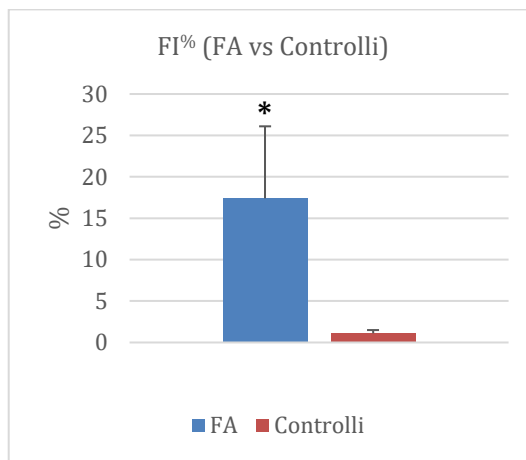


Figura 2. Analisi statistica fibrosi interstiziale (FI%).
 Confronto tra valori di FI% in FA vs controlli ($P < 0,0001$).

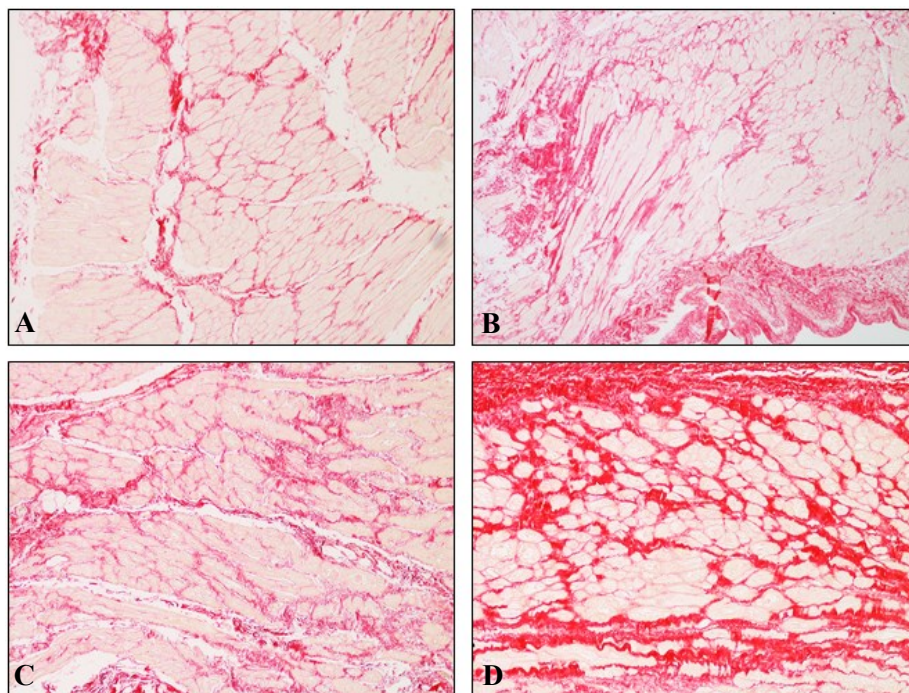


Figura 3. Stadi della fibrosi. A) *Stadio I*: singoli foci fibrotici sparsi; B) *Stadio II*: multipli foci fibrotici; C) *Stadio III*: multipli foci fibrotici confluenti; D) *Stadio IV*: fibrosi diffusa; **colorazione:** Picrosirius red; **ingrandimento originale:** con obiettivo a 10x.

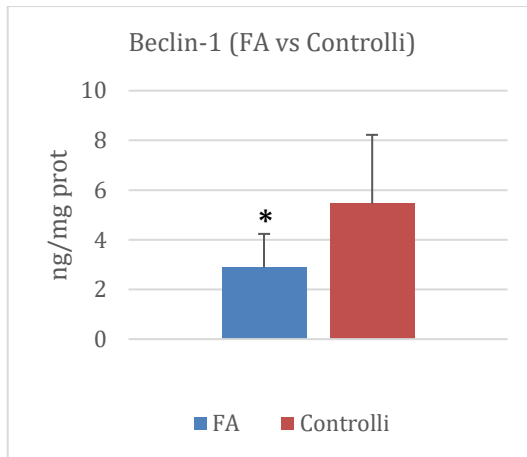


Figura 4. Analisi statistica Beclin-1.
 Confronto tra valori di Beclin-1 in FA vs controlli ($P=0,05$).

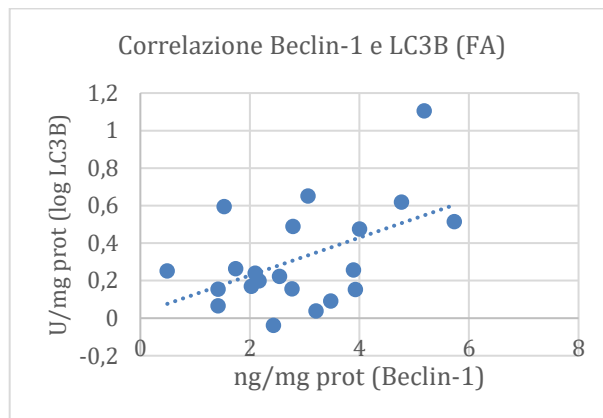


Figura 5. Analisi statistica della correlazione tra Beclin-1 e LC3B in FA.
 Grafico di correlazione tra i valori di Beclin-1 e LC3B nei casi patologici.
 ($P<0,05$).

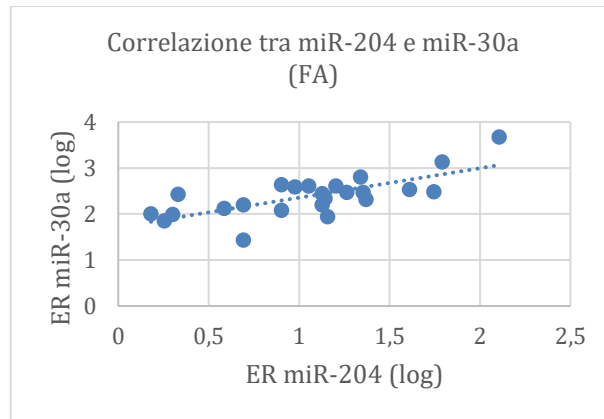


Figura 6. Analisi statistica della correlazione tra miR-204 e 30a in FA. Grafico di correlazione tra i valori di espressione relativa (ER) misurati di miR-204 e miR-30a nei casi patologici ($P < 0,01$).

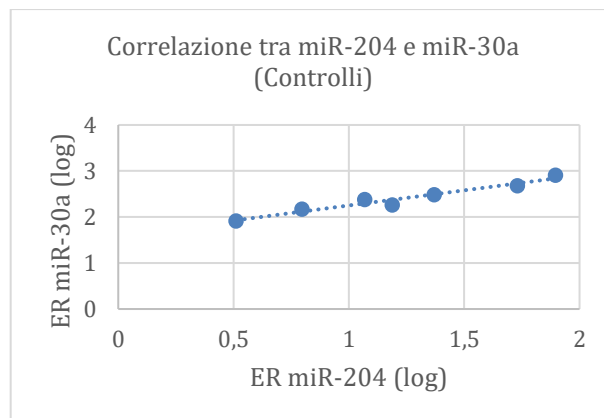


Figura 7. Analisi statistica della correlazione tra miR-204 e 30a in controlli.

Grafico di correlazione tra i valori di espressione relativa (ER) misurati di miR-204 e miR-30a ($P < 0,01$).

BIBLIOGRAFIA

1. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace* 2012; **12**(10): 1360-420.
2. Falk RH. Atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2001; **344**(14): 1067-78.
3. Diker E, Aydogdu S, Ozdemir M, et al. Prevalence and predictors of atrial fibrillation in rheumatic valvular heart disease. *Am J Cardiol* 1996; **77**(1): 96-8.
4. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *Jama* 1994; **271**(11): 840-4.
5. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; **415**(6868): 219-26.
6. Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, et al. The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades. *N Engl J Med* 1987; **317**(11): 669-74.
7. Wang TJ, Parise H, Levy D, et al. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 2004; **292**(20): 2471-7.
8. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, et al. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2006; **114**(7): e257-354.
9. Waldo AL. Mechanisms of atrial fibrillation, atrial flutter, and ectopic atrial tachycardia--a brief review. *Circulation* 1987; **75**(4 Pt 2): III37-40.
10. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, et al. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **103**(5): 769-77.
11. Corradi D, Callegari S, Benussi S, et al. Regional left atrial interstitial remodeling in patients with chronic atrial fibrillation undergoing mitral-valve surgery. *Virchows Arch* 2004; **445**(5): 498-505.
12. Corradi D, Callegari S, Benussi S, et al. Myocyte changes and their left atrial distribution in patients with chronic atrial fibrillation related to mitral valve disease. *Hum Pathol* 2005; **36**(10): 1080-9.
13. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997; **96**(4): 1180-4.
14. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997; **96**(9): 3157-63.

15. Corradi D. Atrial fibrillation from the pathologist's perspective. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2014; **23**(2): 71-84.
16. Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2004; **63**(2): 236-44.
17. Corradi D, Callegari S, Maestri R, Benussi S, Alfieri O. Structural remodeling in atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; **5**(12): 782-96.
18. Nattel S. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol* 2017; **3**(5): 425-35.
19. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; **12**(1): 1-222.
20. Sermersheim MA, Park KH, Gumper K, et al. MicroRNA regulation of autophagy in cardiovascular disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2017; **22**: 48-65.
21. Xiao J, Zhu X, He B, et al. MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II. *J Biomed Sci* 2011; **18**: 35.
22. Delbridge LMD, Mellor KM, Taylor DJ, Gottlieb RA. Myocardial stress and autophagy: mechanisms and potential therapies. *Nat Rev Cardiol* 2017; **14**(7): 412-25.
23. Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. *Circ Res* 2008; **103**(12): 1363-9.
24. Garcia L, Verdejo HE, Kuzmicic J, et al. Impaired cardiac autophagy in patients developing postoperative atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012; **143**(2): 451-9.
25. Yuan Y, Zhao J, Yan S, et al. Autophagy: a potential novel mechanistic contributor to atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2014; **172**(2): 492-4.
26. Clarke PG, Puyal J. Autophagic cell death exists. *Autophagy* 2012; **8**(6): 867-9.
27. Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM, Jr., et al. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(51): 20364-71.
28. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* 2015; **6**(11): 8474-90.
29. Yin X, Peng C, Ning W, et al. miR-30a downregulation aggravates pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 2013; **379**(1-2): 1-6.

30. Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, et al. VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. *Cancer Cell* 2012; **21**(4): 532-46.
31. Nishino I, Fu J, Tanji K, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000; **406**(6798): 906-10.
32. Marin TM, Keith K, Davies B, et al. Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *J Clin Invest* 2011; **121**(3): 1026-43.
33. Cullup T, Dionisi-Vici C, Kho AL, et al. Clinical utility gene card for: Vici Syndrome. *Eur J Hum Genet* 2014; **22**(3).
34. Gil-Cayuela C, Lopez A, Martinez-Dolz L, et al. The altered expression of autophagy-related genes participates in heart failure: NRBP2 and CALCOCO2 are associated with left ventricular dysfunction parameters in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2019; **14**(4): e0215818.
35. Deng Y, Wu W, Guo S, et al. Altered mTOR and Beclin-1 mediated autophagic activation during right ventricular remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 2017; **18**(1): 53.
36. Benussi S, Pappone C, Nascimbene S, et al. A simple way to treat chronic atrial fibrillation during mitral valve surgery: the epicardial radiofrequency approach. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000; **17**(5): 524-9.
37. Corradi D, Callegari S, Maestri R, et al. Heme oxygenase-1 expression in the left atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation related to mitral valve disease: its regional relationship with structural remodeling. *Hum Pathol* 2008; **39**(8): 1162-71.
38. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; **62**(10): 751-8.
39. Goette A, Kalman JM, Aguinaga L, et al. EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: definition, characterization, and clinical implication. *Europace* 2016; **18**(10): 1455-90.
40. Corradi D, Callegari S, Manotti L, et al. Persistent lone atrial fibrillation: clinicopathologic study of 19 cases. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2014; **11**(7): 1250-8.
41. Loud AV, Anversa P. Morphometric analysis of biologic processes. *Lab Invest* 1984; **50**(3): 250-61.
42. Callegari S, Macchi E, Monaco R, et al. Clinicopathological Bird's-Eye View of Left Atrial Myocardial Fibrosis in 121 Patients With Persistent Atrial Fibrillation: Developing Architecture and Main Cellular Players. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2020; **13**(7): e007588.

43. O'Connor L, Glynn B. Recent advances in the development of nucleic acid diagnostics. *Expert Rev Med Devices* 2010; **7**(4): 529-39.
44. Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN. Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: the road to repair is paved with perils. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **70**: 83-91.
45. Lin R, Wu S, Zhu D, Qin M, Liu X. Osteopontin induces atrial fibrosis by activating Akt/GSK-3beta/beta-catenin pathway and suppressing autophagy. *Life Sci* 2020; **245**: 117328.
46. Li J, Zhang D, Wiersma M, Brundel B. Role of Autophagy in Proteostasis: Friend and Foe in Cardiac Diseases. *Cells* 2018; **7**(12).
47. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Ghidoni R, Codogno P. Non-canonical autophagy: an exception or an underestimated form of autophagy? *Autophagy* 2008; **4**(8): 1083-5.
48. Chen MC, Chang JP, Wang YH, Liu WH, Ho WC, Chang HW. Autophagy as a mechanism for myolysis of cardiomyocytes in mitral regurgitation. *Eur J Clin Invest* 2011; **41**(3): 299-307.
49. van Bavel JJA, Vos MA, van der Heyden MAG. Cardiac Arrhythmias and Antiarrhythmic Drugs: An Autophagic Perspective. *Front Physiol* 2018; **9**: 127.
50. Zhou L, Ma B, Han X. The role of autophagy in angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Endocrinol* 2016; **57**(4): R143-R52.