

Università degli Studi di Napoli Federico II



Tesi di Dottorato in Ricerca in
Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

XXIV Ciclo

***“Meccanismi molecolari associate a scompenso
ventricolare destro in cardiopatie congenite con ostruzione
all’efflusso”.***

Relatore: Prof. Antonio Rapacciuolo

Candidato: Dott. Elisa di Pietro

INDICE

Premessa	pag 3
Materiali e Metodi	pag 5
Risultati	pag 9
Discussione	pag 12
Conclusioni	pag 19
Referenze	pag 20
Figure	pag 24

Premessa

Le cardiopatie congenite sono malformazioni relativamente comuni che spesso si associano a prognosi negativa. Grazie al miglioramento delle tecniche di correzione chirurgica, il numero di pazienti con cardiopatie congenite (CHD) sono in progressivo aumento, tuttavia la mobilità e la mortalità tardiva di questi pazienti rimangono un problema aperto e ad elevato impatto sociale. Le complicanze tardive includono lo scompenso ventricolare destro e l'ipertensione polmonare secondaria ^[1] che può essa stessa a sua volta indurre scompenso destro. Inoltre anche l'ipertensione polmonare idiopatica o primaria può causare sovraccarico di pressione del ventricolo destro e disfunzione. Nonostante il notevole impatto sociale ed economico della disfunzione ventricolare destra le alterazioni molecolari che lo caratterizzano rimangono sconosciute per cui non sono attualmente disponibili interventi farmacologici mirati atti ad interferire e "correggere" tali alterazioni. L'allungamento dell'aspettativa di vita dei pazienti cardiopatici congeniti sottoposti ad intervento correttivo ha determinato un incremento di interesse circa l'importanza fisiopatologiche della disfunzione ventricolare destra. Numerosi studi hanno dimostrato che il ventricolo destro ha implicazioni prognostiche avverse sia nelle cardiopatie congenite che acquisite.^{[2] [3, 4] [5, 6] [7]}. Nelle cardiopatie congenite dove il ventricolo sistemico è il destro come la trasposizione congenitamente corretta delle grandi arterie (CCTGA), o in anomalie con ostruzione all'efflusso ventricolare destro (RVOTO) vi è un sovraccarico pressorio. L'ostruzione all'efflusso destro, in particolare, è tipica di due dei più comuni difetti cardiaci congeniti: la stenosi dell'arteria polmonare (PS) e la tetralogia di Fallot (TOF).

Il sovraccarico di pressione causa ipertrofia ventricolare, disfunzione ed eventualmente dilatazione. In letteratura sono presenti molti dati riguardanti i meccanismi molecolari che sono attivati nella ipertrofia e disfunzione del ventricolo sinistro. Numerosi dati pubblicati dimostrano come il β -adrenergic pathway,^[8-10] e le Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) come la Extracellular Kinase $\frac{1}{2}$ (ERK1/2) ^{[10] [8, 11, 12] [13]} ed anche altre proteine antiapoptotiche come P38 e pro-apoptotiche come la Caspasi 3 clivata (cysteiny-l-aspartate-specific proteasi) possono essere implicate nei meccanismi di disfunzione del ventricolo sinistro e di progressione dello scompenso cardiaco^[14, 15]. Inoltre è noto che l'ipertrofia fisiologica indotta da esercizio fisico è caratterizzata da una adeguata angiogenesi contrariamente a quanto accade per l'ipertrofia patologica caratterizzata da una inadeguata angiogenesi^[16].

Attualmente sono disponibili pochi dati in letteratura circa i meccanismi molecolari alla base dello scompenso ventricolare destro.

L'individuazione dei pathway molecolari coinvolti nello sviluppo e nella progressione della disfunzione ventricolare destra è estremamente importante in quanto potrebbe consentire l'individuazione di nuovi target terapeutici.

Lo scopo del nostro studio è proprio quello di valutare i meccanismi molecolari che possono innescare la disfunzione ventricolare destra nelle cardiopatie congenite associate a sovraccarico di pressione del ventricolo destro.

Materiali e metodi

Gruppi di pazienti inclusi nello studio

I pazienti inclusi nel nostro studio sono stati reclutati nel nostro ambulatorio per le cardiopatie congenite. Abbiamo diviso i pazienti arruolati nello studio in due gruppi:

Gruppo A (controlli): Pazienti che dovevano subire intervento chirurgico di correzione del difetto interventricolare sottoaortico (SA-VSD) o sottopolmonare (SP-VSD) (N=7) in assenza, quindi di ostruzione all'efflusso destro. Questi difetti congeniti sono caratterizzati da iperafflusso polmonare, quindi durante la sistole il sangue passa direttamente dal ventricolo sinistro all'arteria polmonare attraverso il VSD e pertanto non vi è un reale sovraccarico pressorio del ventricolo destro. Questi pazienti possono essere considerati come gruppo di controllo.

Gruppo B (pazienti con sovraccarico di pressione del ventricolo destro): pazienti che dovevano essere sottoposti a terapia chirurgica correttiva per la Tetralogia di Fallot (TOF) o stenosi polmonare severa (PS) (N=14). Sia la TOF che la PS sono difetti congeniti caratterizzati da ostruzione all'efflusso destro dalla nascita.

Ecocardiografia

L'ecocardiografia è stata eseguita in assenza di sedazione, in posizione supina per valutare le proiezioni sottocostali, parasternale ed apicale. Se necessario la proiezione apicale è stata ottenuta in decubito laterale sinistro. Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato il Sequoia C256 system con sonda 7V3c (3-7 MHZ) e 3V2c (2-3 MHZ). La funzione del ventricolo destro è stata valutata in tutti i pazienti

prima e 1, 3, 6 mesi dopo l'intervento chirurgico mediante la valutazione ecocardiografica del "tricuspid anular plane systolic excursion" (TAPSE). Il TAPSE si misura dalla proiezione apicale quattro camere puntando il marker M-mode perpendicolarmente al piano dell'anello tricuspide e misurando la distanza fra la base e l'apice della curva M-mode così ottenuta.

Biopsie

In tutti i pazienti sottoposti a terapia chirurgica sono state effettuate biopsie nella regione infundibolare del ventricolo destro usando un ago 18 G. I campionamenti sono stati effettuati al tratto di efflusso del ventricolo destro 2 cm al di sotto del piano valvolare. Le biopsie sono state poi immediatamente congelate in azoto liquido.

Immunoblotting

I campioni sono stati centrifugati (massima velocità per 20 min) in un buffer di lisi (RIPA con inibitori di proteasi). I campioni così ottenuti sono stati processati e processati mediante tecnica western blotting (come descritto brevemente di seguito) per valutare: la risposta ipertrofica e di sopravvivenza cellulare mediante la valutazione delle mitogen activated protein kinases (p-ERK, P38 α , P38 β , p-P38) e delle serine/threonine protein kinase p-AKT; la risposta angiogenica mediante valutazione del vascular endothelial growth factor (VEGF) e del suo recettore VEGF receptor (VEGFR); l'apoptosi (cleaved Caspase3) e la risposta adrenergica valutando l'espressione della β adrenergic receptor kinase1 (β ARK1).

-Western blotting. Le proteine sono state separate per elettroforesi su un gel di poliacrilammide (SDS PAGE) e trasferite su di una membrana di nitrocellulosa. Dopo il trasferimento queste membrane sono state bloccate nella soluzione al 5% di latte in Tris Buffer Saline-Tween (TBS-T) 1x per 1h e poi è stato eseguito il blot per i seguenti anticorpi primari : β ARK1 (S. Cruz; diluizione 1:500 in bovine serum albumin (BSA) 5%-TBS-T 0,1%, over-night a +4°C), p- AKT (S. Cruz; diluizione 1:500 in BSA 5%- TBS-T 0,1%, over-night a +4°C), p-ERK (S. Cruz; diluizione 1:500 in latte 5%-TBS-T 0,1%, over-night +4°C), p-P38 (S. Cruz diluizione 1:500 in BSA 5%-TBS-T 0,1% over-night +4°C), P38 α (Cell Signaling diluizione 1:1000 in BSA 5%-TBS-t 0,1%, over night a + 4°C), P38 β (Cell Signaling dilution 1:1000 in a BSA 5%-TBS-t 0,1%, over night a + 4°C), VEGF (S. Cruz dilution 1:500 in BSA 5%-TBS-T 0,1%, over night a +4°C), VEGFR2 (Cell Signaling dilution 1:500 in BSA 5%-TBS-T 0,1%, over-night +4°C), e ERK2 (S. Cruz dilution 1: 500 in BSA 5%-TBS-T 0,1%, 1h a temperatura ambiente). In fine le membrane sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato con horseradish peroxidase (HRP) per catalizzare la reazione di chemiluminescenza attivata dal reagente ECL-GE *healthcare*. Il segnale chemiluminescente è stato poi rilevato con il Chemidoc Biorad System.

Esperimenti in modelli animali

Gruppi di animali

Per indagare il pathway β adrenergic abbiamo valutato due gruppi di animali:

Gruppo Iso: Topi C57BL/6 wild type trattati con isoproterenolo che è un β -agonista (3mg/Kg/die).

Gruppo di controllo: Topi C57BL/6 wild type trattati con solo mezzo (ascorbic acid 0,002%) senza isoproterenolo usato come gruppo di controllo.

Dopo sette giorni di trattamento tutti gli animali di entrambe i gruppi sono stati pesati ed i cuori sono stati espianati. Tutti i cuori sono stati a loro volta pesati ed è stato così valutato il rapporto peso del cuore / peso corporeo (HW/BW).

I campioni sono stati poi centrifugati in un buffer di lisi, le proteine sono state estratte e processate con metodica western blotting come precedentemente descritto per valutare l'espressione di β ARK1.

Analisi statistica dei dati.

I dati sono stati espresso come media \pm SEM per le valutazioni biochimiche. I confronti tra i due gruppi sono stati eseguiti con un test T-Student a due code e un T-test per dati appaiati per i confronti multipli usando il programma SPSS per il TAPSE alla base e 1,3,6, mesi dopo l'intervento per entrambe i gruppi. Per tutte le analisi è stato considerato significativo un valore di $p < 0.05$.

Risultati

Analisi Morfologica

Funzione del ventricolo destro (TAPSE): la funzione ventricolare destra è depressa nei pazienti con RVOTO già di base e presenta un più lento recupero funzionale dopo l'intervento di correzione chirurgica.

La valutazione della funzione ventricolare destra è stata effettuata con ecocardiografia trans-toracica M-mode misurando il TAPSE. L'analisi del TAPSE ha mostrato una depressione della funzione ventricolare statisticamente significativa nel gruppo B (11.7mm) rispetto al gruppo A (13.8mm) prima dell'intervento chirurgico e ($p \leq 0.05$) e un più lento recupero funzionale 1,3,6 mesi dopo l'intervento nel gruppo B (8.4mm-9.25mm-9.50mm) rispetto al gruppo A (10.2mm-11.2mm-13.4mm) ($p \leq 0.01$) (Fig-1)

Analisi Biochimica:

Pathway β -Adrenergico: nel ventricolo destro con ostruzione all'efflusso destro β ARK1 non è attivato.

E' noto che alterazioni del pathway β -adrenergico, ed in particolare l'iperpressione di β ARK1 si associano ad ipertrofia e/o disfunzione del ventricolo sinistro indotti da sovraccarico pressorio^[17]. Abbiamo effettuato un western blotting per valutare l'espressione di β ARK1 in tutti i campioni di RV in esame di entrambe i gruppi. Il risultato è che non vi è differenza significativa nel gruppo A versus il gruppo B (fig.2). Sulla base di questo dato abbiamo ipotizzato che il pathway β -adrenergico non sia

coinvolto nella progressione dall'ipertrofia verso la disfunzione del ventricolo destro contrariamente a quanto accade per il ventricolo sinistro.

Al fine di supportare la nostra ipotesi abbiamo eseguito ulteriori esperimenti in un modello animale. Precedenti esperimenti hanno mostrato che un modello animale di stimolazione β -adrenergica con isoproterenolo induce iperespressione di β ARK1 nel ventricolo sinistro^[18]. Abbiamo eseguito quindi lo stesso esperimento nel medesimo modello animale con le stesse modalità. Dopo sette giorni di stimolazione abbiamo valutato il rapporto HW/BW e l'espressione di β ARK1 nel ventricolo destro in entrambe i gruppi Iso (stimolati con isoproterenolo) e di controllo (non stimolati). Abbiamo trovato un aumento del rapporto HW/BW nel gruppo Iso paragonato al gruppo di controllo che dimostra la presenza di ipertrofia cardiaca indotta da isoproterenolo. Abbiamo anche trovato che l'espressione di β ARK1 non aumenta contrariamente a quanto già dimostrato per il ventricolo sinistro, anzi mostra una riduzione seppur lieve e non significativa in termini statistici (gruppo Iso vs controllo, fold induction 1 vs 0.62). Questo dato conferma la nostra ipotesi che il pathway β -adrenergico è almeno in parte diversamente coinvolto nella ipertrofia/disfunzione del ventricolo destro rispetto al sinistro.

Ipertrofia, sopravvivenza cellulare ed apoptosi: nel ventricolo destro con ostruzione all'efflusso l'espressione dei pathways protettivi antiapoptotici è ridotta ed in accordo con questo dato l'espressione di pathways di danno cellulare pro-apoptotici risulta attivata.

L'equilibrio tra pathway protettivi e nocivi ha un ruolo fondamentale nello sviluppo di ipertrofia/disfunzione nel ventricolo sinistro in risposta al sovraccarico di pressione come precedentemente discusso, pertanto abbiamo valutato l'espressione dei segnali di sopravvivenza (p-ERK, P38 and P38 α) e morte cellulare programmata (Caspase-3) anche nel ventricolo destro. Abbiamo trovato una riduzione significativa di p-ERK, P38 and P38 α (fig-3) nel gruppo B rispetto al gruppo A ($p \leq 0.00001$; $p = 0.01$; $p \leq 0.001$). In accordo con la riduzione del segnale protettivo anti-apoptotico i nostri esperimenti dimostrano nel gruppo B un aumento statisticamente significativo dell'attività di Caspasi-3 (segnale pro-apoptotico) (fig-4). p-AKT risulta invariato nei due gruppi in esame (fig-5).

Angiogenesi: Nel ventricolo destro con ostruzione all'efflusso c'è una inadeguata angiogenesi VEGF dipendente. Precedenti studi hanno dimostrato che l'ipertrofia patologica è caratterizzata da una inadeguata vascolarizzazione associate a disfunzione ventricolare sinistra, come accade in un modello murino di sovraccarico pressorio indotto mediante legatura dell'aorta trasversa ^[16]. Abbiamo quindi deciso di indagare il potenziale coinvolgimento dell'angiogenesi VEGF-dipendente nella disfunzione ventricolare destra indotta da sovraccarico di pressione. I nostri dati mostrano una ridotta espressione del VEGF nel gruppo B versus il gruppo A ($p = 0.01$) mentre il recettore VEGFR resta immutato in entrambe i gruppi (Fig-6). Alla luce di tale dato è ragionevole pensare che vi sia una inadeguata angiogenesi VEGF-dipendente associata alla disfunzione ventricolare destra in risposta al sovraccarico pressorio.

Discussione

Lo scopo del nostro studio è stato quello di indagare i meccanismi molecolari che sono alla base della disfunzione ventricolare destra in risposta ad uno stimolo patologico. Al fine di valutare la funzione ventricolare destra abbiamo eseguito un esame ecocardiografico trans-toracico con valutazione del TAPSE in tutti i pazienti studiati. L'ecocardiografia trans toracica è un esame non invasivo, ed il TAPSE è un parametro relativamente semplice da valutare, riproducibile gravato da un basso errore intra ed interoperatore ed indipendente dalla frequenza cardiaca. Il TAPSE rappresenta un indice di funzione ventricolare destra molto attendibile ed affidabile coincidendo con buona approssimazione con altri parametri di funzione del ventricolo destro altrimenti misurati con ecocardiografia trans toracica^[19] o con la risonanza magnetica cardiaca^[20]. Abbiamo rilevato una riduzione del TAPSE nel gruppo B rispetto al gruppo A prima dell'intervento chirurgico ($p \leq 0.05$) ed un più lento ed incompleto recupero funzionale a 1,3,6 mesi dopo l'intervento ($p \leq 0.01$) (fig-1). Il mancato recupero funzionale nel gruppo B nonostante l'eliminazione, grazie all'intervento chirurgico, dell'insulto patologico determinato dal sovraccarico di pressione suggerisce che la disfunzione miocardica può essere potenzialmente attribuita ad una alterazione di pathways molecolari.

Le basi molecolari della risposta miocardica al sovraccarico di pressione sono meglio conosciute per il ventricolo sinistro che per il destro. E' noto che l'iperattivazione adrenergica è un meccanismo di compensazione precoce, che a lungo termine può avere effetti negativi (fase di scompenso). Lo stimolo adrenergico cronico, infatti,

risulta nella fosforilazione del recettore β -adrenergico (β AR) mediato prevalentemente dalla beta adrenergic kinase 1 (β ARK1) che causa desensibilizzazione e/o down-regulation^[8]. Una alterazione del segnale β -adrenergico è stata probabilmente il primo meccanismo molecolare associato ad insufficienza ventricolare sinistra identificato nell'uomo^[8] e la sua rilevanza è sottolineata dal uso diffuso di β -bloccanti nel trattamento dello scompenso cardiaco. Nel cuore umano scompensato vi sono molteplici alterazioni a vari livelli del pathway β -adrenergico. Dati presenti in letteratura dimostrano che in un modello animale geneticamente modificato di scompenso cardiaco l'iperespressione di un inibitore di β ARK1 evita la progressione della patologia^[8]. β ARK1 inoltre ha un ruolo importante nell'ipertrofia cardiaca associate al sovraccarico di pressione. L'iperespressione dell'inibitore di β ARK1 non cambia la risposta ipertrofica ma preserva la riserva inotropica in topi esposti per breve tempo al sovraccarico pressorio, ciò dimostra che una alterazione del segnale β -adrenergico può verificarsi già nella fase precoce della risposta ipertrofica.

Abbiamo valutato l'espressione di β ARK1 in un campione di ventricolo destro e abbiamo trovato che, contrariamente a quanto accade per il ventricolo sinistro, β ARK1 non risulta attivato (fig-2). Questo dato suggerisce che lo scompenso ventricolare destro non è associato a down-regulation dei β ARs mediata da β ARK1. Ovviamente sarebbe stato ottimale ai fini sperimentali dosare l'espressione di β AR a conferma del dato ma i campioni di tessuto erano troppo piccoli e quindi non sono stati sufficienti. Per sostenere la nostra ipotesi, abbiamo effettuato alcuni esperimenti aggiuntivi in un modello animale. Dati sperimentali precedenti dimostrano che in un

modello animale la stimolazione β -adrenergica con isoproterenolo determina ipertrofia ventricolare sinistra associata ad iperespressione di β ARK1^[18]. Abbiamo quindi effettuato lo stesso esperimento ma per indagare l'espressione di β ARK1 nella risposta ipertrofica del ventricolo destro. Dopo sette giorni di stimolazione è stato valutato il rapporto HW/BW e l'espressione di β ARK1 in campioni di miocardio ventricolare destro sia nel gruppo stimolato (Iso) che nel gruppo di controllo. Nel gruppo Iso rispetto al gruppo di controllo il rapporto HW/BW è risultato aumentato dimostrando che vi è stata risposta ipertrofica alla stimolazione. L'espressione di β ARK1 invece, contrariamente a quanto accade per il ventricolo sinistro non risulta aumentata anzi vi è una lieve e non significativa riduzione nel gruppo Iso rispetto al controllo (fold induction 1 vs 0.62). In sintesi nelle stesse condizioni sperimentali, la stimolazione adrenergica determina una differente regolazione di β ARK1 nel ventricolo destro rispetto al sinistro. Questi dati confermano la nostra ipotesi che il pathway β -adrenergico è almeno in parte differentemente coinvolto nella ipertrofia/disfunzione da sovraccarico pressorio nel ventricolo destro rispetto al sinistro.

Complessivamente i nostri risultati suggeriscono quindi che il pathway β -adrenergico ha un ruolo diverso nello scompenso ventricolare destro rispetto al sinistro. Per le nostre conoscenze questa è la prima dimostrazione in letteratura del ruolo del pathway β -adrenergico nello scompenso cardiaco.

La transizione dall'ipertrofia verso lo scompenso cardiaco è un processo complesso e solo parzialmente conosciuto. L'equilibrio tra pathways protettivi e nocivi attivati dal

sovraccarico di pressione può essere di estrema importanza. A tal proposito, è stato dimostrato che per il ventricolo sinistro la fosforilazione dei β ARs può attivare altri pathways intracellulari, ad esempio la fosforilazione di β 2AR da parte di kinase A (PKA) può indurre l'attivazione di MAPKs come ERK1/2. ERK svolge un ruolo central nell'omeostasi cellulare inducendo proliferazione cellulare, differenziazione e sviluppo^[21]. E' stato dimostrato che la forma attivata di ERK (p-ERK 1/2 or p-44/42) si associa ad ipertrofia indotta da sovraccarico di pressione^[22] e rimane attivata nella fase tardiva di scompenso ventricolare sinistro. D'altro canto vi sono evidenze che dimostrano che ERK1/2 non induce il riarrangiamento sarcomerico tipico della crescita ipertrofica^[23]. Il ruolo di ERK è complesso ma sembra essere un fattore protettivo che preserva la sopravvivenza cellulare nello scompenso cardiaco progressivo. I nostri dati dimostrano che nel ventricolo destro con ostruzione all'efflusso i pathways protettivi antiapoptotici sono ridotti. I nostri dati mostrano una riduzione estremamente significativa dei livelli di p-ERK nel gruppo B rispetto al gruppo A ($p \leq 0.00001$) ed inoltre la riduzione dei livelli di espressione di P38 e di P38 α nel gruppo B rispetto al gruppo A ($p = 0.01$; $p \leq 0.001$) (fig-3). Anche P38 come ERK è coinvolto nella regolazione dell'omeostasi cellulare, ma il ruolo specifico non è chiaro. Esistono quattro isoforme di p38 (α ; β ; γ ; δ), ciascuna delle quali regola differenti pathways. Le isoforme α e β sono tipicamente espresse nei miociti. P38 α in particolare sembra essere coinvolta prevalentemente nei meccanismi di sopravvivenza cellulare.^[24] Zechener et al. hanno dimostrato che p38 MAPK può avere un ruolo importante anche nei meccanismi di crescita delle cellule miocardiche^[23]

In accordo con la riduzione dei segnali di protezione , i nostri esperimenti mostrano un incremento dell'attività pro-apoptotica di Caspase-3. L'apoptosi è mediata da due pathways maggiori: estrinseco (mediato dai "death receptor") ed intrinseco (dipendente dai mitocondri) che è attivato da stimoli extracellulari o danno del DNA^[25]. Entrambe i pathways convergono sull'attivazione delle caspasi e richiedono attivazione mediante clivaggio della Caspasi-3 ^{[26] [27]}. Per la sua posizione centrale la caspasi-3 attivata è il target di scelta per lo studio della morte cellulare programmata. I mitocondri svolgono un ruolo critico nell'apoptosi ^[28]. Il ruolo specifico di Caspasi-3 nella morte cellulare mediate dai mitocondri non è ancora ben conosciuta. Vi sono evidenze che suggeriscono un ruolo di caspasi-3 a monte dei mitocondri^[29]. In risposta allo stress ossidativo vengono reclutati pathways molecolari protettivi al fine di prevenire la morte cellulare. Nei meccanismi di protezione dell'integrità mitocondriale svolge un importante ruolo Akt ^{[30] [31, 32,33]}. Akt è una serina/treonina kinasi con varie funzioni cellulari incluse la sintesi proteica, il metabolismo energetico e la sopravvivenza cellulare ^[34,35,36]. Akt esercita un forte effetto cardioprotettivo ed è attivato a valle della cascata del phosphatidylinositol 3-kinasi (PI3K) in risposta a vari stimoli recettoriali (tyrosine kinases receptor, glycoprotein 130, e G-protein coupled receptor)^[30]. Pertanto abbiamo valutato p-AKT, ma non abbiamo trovato differenze significative nei due gruppi(fig-5). La mancata attivazione di AKT suggerisce che questa proteina non sia coinvolta, ma questi dati non sono sufficienti ad escludere completamente il suo coinvolgimento essendo parte di una più complessa rete molecolare. In conclusione, la disfunzione ventricolare destra da sovraccarico di

pressione sembra essere associata ad un aumento dei segnali pro-apoptotici e ad una riduzione dei segnali pro-apoptotici ed ipertrofici. Vi è quindi uno squilibrio tra pathways protettivi e dannosi tale che i miociti sono più predisposti alla morte cellulare. A questo punto è l'attivazione di tali pathways e non lo stress di parete in sé indotto dal sovraccarico di pressione a danneggiare il ventricolo inducendo la morte cellulare. L' Apoptosi quindi continua ad essere attivata e a progredire anche dopo normalizzazione dello stress parietale indotto dal sovraccarico di pressione.

Come precedentemente descritto, l'ipertrofia è un importante meccanismo compensatorio sebbene l'aumento della massa miocardica incrementi la domanda metabolica, di qui l'importanza di una adeguata vascolarizzazione che soddisfi tale richiesta. L'angiogenesi è un processo chiave nella rigenerazione vascolare, nella cicatrizzazione delle ferite e nello sviluppo embriologico. Dati precedenti dimostrano che l'ipertrofia fisiologica del ventricolo sinistro è caratterizzata da una adeguata vascolarizzazione senza disfunzione, come accade in topi sottoposti ad esercizio fisico. Al contrario, l'ipertrofia patologica del ventricolo sinistro si associa ad inadeguata vascolarizzazione e disfunzione, come accade in un modello murino di sovraccarico pressorio indotto mediante legatura dell'aorta trasversa^[16].

L' angiogenesi può essere regolata da molteplici fattori incluso il VEGF. La famiglia di proteine VEGF nell'uomo consiste di cinque diverse proteine (VEGF-A o VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, e placental growth factor o PlGF). Tutte e cinque le forme di VEGFs sono soggette a "splicing" alternativo in modo da formare diverse isoforme con varie proprietà. Tutti e tre i recettori del VEGF possono essere usati

dalle varie isoforme per aumentare la permeabilità vascolare, l'angiogenesi e numerosi altri effetti dei VEGFs.^[37] Vi sono dati in letteratura che dimostrano una riduzione dei livelli di espressione di VEGF nel ventricolo sinistro con ipertrofia, disfunzione ed inadeguata angiogenesi in risposta al sovraccarico di pressione^[16]. Quindi la riduzione dei livelli di VEGF indotta da sovraccarico pressorio può indurre inadeguata angiogenesi con conseguente disfunzione ventricolare sinistra. I nostri dati evidenziano una riduzione dei livelli di espressione di nel gruppo B rispetto al gruppo A ($p=0.01$) mentre il VEGFR risulta invariato in entrambe. (Fig-6). Quindi, la ridotta espressione di VEGF e la conseguente inadeguata angiogenesi possono essere coinvolte nello sviluppo della disfunzione ventricolare destra. L'angiogenesi è regolata da una complessa rete molecolare e la sola quantificazione di VEGF/VEGFR non è sufficiente a capire il suo ruolo nella progressione verso lo scompenso del ventricolo destro. Ancora una volta l'insufficiente quantità di campione disponibile è stata un limite per il nostro studio ed ulteriori indagini sono necessarie al fine di chiarire tali meccanismi. In questo contesto la nostra ipotesi è che l'inadeguata angiogenesi VEGF mediate non è capace di sostenere l'aumentata richiesta metabolica del miocardio ipertrofico

Conclusioni

Una complessa rete di alterazioni molecolari è alla base della disfunzione ventricolare destra nei pazienti con TOF e PS. Queste alterazioni differiscono almeno in parte da quelle già individuate per il ventricolo sinistro. Nel ventricolo destro di pazienti con TOF e PS non abbiamo infatti trovato attivazione di β ARK1 come accade nel ventricolo sinistro con ostruzione dell'efflusso; la risposta angiogenetica VEGF-mediata è notevolmente ridotta e la riduzione dell'attività di pathways protettivi (p-ERK, p-P38, P38 α) si associa ad incremento dei segnali di morte cellulare (activated Caspase 3). L'alterazione della risposta angiogenetica e dell'omeostasi cellulare sembrano essere, quindi, coinvolte nello sviluppo della disfunzione ventricolare destra in pazienti con cardiopatie congenite associate ad ostruzione dell'efflusso destro. Il nostro studio mostra inoltre che la disfunzione ventricolare rilevata dal TAPSE correla con tali alterazioni metaboliche. L'interferenza farmacologica con questi meccanismi potrebbe offrire nuove opzioni terapeutiche mirate come approccio complementare alla tradizionale chirurgia.

References

1. Diller, G.P. and M.A. Gatzoulis, Pulmonary vascular disease in adults with congenital heart disease. *Circulation*, 2007. 115(8): p. 1039-50.
2. D'Alonzo, G.E., et al., Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*, 1991. 115(5): p. 343-9.
3. Sandoval, J., et al., Survival in primary pulmonary hypertension. Validation of a prognostic equation. *Circulation*, 1994. 89(4): p. 1733-44.
4. Ikeda, U., et al., Long-term survival in aged patients with corrected transposition of the great arteries. *Chest*, 1992. 101(5): p. 1382-5.
5. Lundstrom, U., et al., The natural and "unnatural" history of congenitally corrected transposition. *Am J Cardiol*, 1990. 65(18): p. 1222-9.
6. Graham, T.P., Jr., et al., Long-term outcome in congenitally corrected transposition of the great arteries: a multi-institutional study. *J Am Coll Cardiol*, 2000. 36(1): p. 255-61.
7. Bogers, A.J., et al., Long term follow up after surgery in congenitally corrected transposition of the great arteries with a right ventricle in the systemic circulation. *J Cardiothorac Surg*, 2010. 5: p. 74.
8. Rockman, H.A., et al., Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(12): p. 7000-5.
9. Esposito, G., et al., Cardiac hypertrophy: role of G protein-coupled receptors. *J Card Fail*, 2002. 8(6 Suppl): p. S409-14.
10. Rapacciuolo, A., et al., Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*, 2001. 38(3): p. 876-82.
11. Bristow, M.R., et al., Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*, 1982. 307(4): p. 205-11.
12. Brodde, O.E., et al., Regional distribution of beta-adrenoceptors in the human heart: coexistence of functional beta 1- and beta 2-adrenoceptors in both atria and ventricles in severe congestive cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1986. 8(6): p. 1235-42.

13. Choi, D.J., et al., Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem*, 1997. 272(27): p. 17223-9.
14. Choi, Y.H., et al., Myocyte apoptosis occurs early during the development of pressure-overload hypertrophy in infant myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. 137(6): p. 1356-62, 1362 e1-3.
15. Condorelli, G., et al., Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(17): p. 9977-82.
16. Perrino, C., et al., Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest*, 2006. 116 (6): p. 1547-60.
17. Rockman, H.A., et al., Myocardial beta-adrenergic receptor signaling in vivo: insights from transgenic mice. *J Mol Med (Berl)*, 1996. 74(9): p. 489-95.
18. Iaccarino, G., et al., Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation*, 1998. 98(17): p. 1783-9.
19. Ghio, S., et al., Prognostic usefulness of the tricuspid annular plane systolic excursion in patients with congestive heart failure secondary to idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 2000. 85(7): p. 837-42.
20. Kjaergaard, J., et al., Evaluation of right ventricular volume and function by 2D and 3D echocardiography compared to MRI. *Eur J Echocardiogr*, 2006. 7(6): p. 430-8.
21. MAPK signal pathway and cellular proliferation- Zhang and Liu cellular research 2002 – Review
22. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. Esposito G, Prasad SV, Rapacciuolo A, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. *Circulation*. 2001 Mar 13;103(10):1453-8
23. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. Zechner D,

Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC. *J Cell Biol.* 1997 Oct 6;139(1):115-27

24. p38_ Mitogen-Activated Protein Kinase Plays a Critical Role in Cardiomyocyte Survival but Not in Cardiac Hypertrophic Growth in Response to Pressure Overload - Kazuhiko Nishida et al 2004
25. N. N. Danial and S. J. Korsmeyer, "Cell death: critical control points," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 205–219, 2004.
26. H. R. Stennicke and G. S. Salvesen, "Properties of the caspases," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1387, no. 1-2, pp. 17–31, 1998.
27. K. C. Zimmermann, C. Bonzon, and D. R. Green, "The machinery of programmed cell death," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 92, no. 1, pp. 57–70, 2001
28. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305:626-9
29. Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 2003; 160:65-75
30. Miyamoto et al. AKT mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. Review. *J Bioenerg Biomembr.* 2009 April ; 41(2): 169–180. doi:10.1007/s10863-009-9205-y
31. Insulin-like growth factor-1 prevents loss of electrochemical gradient in cardiac muscle mitochondria via activation of PI 3 kinase/Akt pathway. Lai HC, Liu TJ, Ting CT, Sharma PM, Wang PH. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Jul 31;205(1-2):99-106
32. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. *Cell Death Differ.* 2008 Mar;15(3):521-9.
33. Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. Plas DR, Talapatra S, Edinger AL, Rathmell JC, Thompson CB. *J Biol Chem.* 2001 Apr 13;276(15):12041-8.
34. Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis.

Ceci M, Gallo P, Santonastasi M, Grimaldi S, Latronico MV, Pitisci A, Missol-Kolka E, Scimia MC, Catalucci D, Hilfiker-Kleiner D, Condorelli G. Cell Death Differ. 2007 May;14(5):1060-2.

35. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Circulation. 2001 Jul 17;104(3):330-5
36. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Circulation. 2000 Feb 15;101(6):660-7
37. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. David O. Bates Cardiovascular Research (2010) 87, 262–271

TAPSE



