RIMeL / IJLaM 2005; 1

Aspetti cellulari, molecolari e genetici delle malattie cardiovascolari

Giorgio Vescovo

Medicina 1, Ospedale S Bortolo, Vicenza

Gli aspetti cellulari, molecolari, metabolici e genetici nelle malattie cardiache sono intimamente interconnessi ed aprono nuove prospettive fisiopatologiche, diagnostiche e terapeutiche. Questi aspetti riguardano non solo il cuore, ma anche il sistema vascolare, in particolare la parete arteriosa e l'endotelio, ma anche gli organi periferici, quali il rene ed il muscolo scheletrico.

Inoltre questi aspetti rappresentano un firmamento di nuove applicazioni che aprono nuove frontiere per il futuro.

I campi di studio sono estremamente vasti e nell'ambito di ogni organo e di ogni patologia i meccanismi fisiopatologici, cellulari e molecolari sono complessi e spesso diversi. Esempi a livello cardiaco sono: la morte cellulare, come la necrosi sia diversa dall'apoptosi; i meccanismi di sopravvivenza della cellula, l'ibernazione diversa dal precondizionamento e dallo *stunning*; la rigenerazione cardiaca, le cellule staminali endogene verso il trapianto cellulare, le capacità differenziative delle cellule staminali in termini di miociti, di cellule vascolari o interstiziali. Ancora a livello cardiaco: i meccanismi che portano alle alterazioni dell'apparato contrattile, quali l'ipertrofia compensatoria, le cardiomiopatie ipertrofiche e dilatative, il rimodellamento del ventricolo e quindi anche della matrice extracellulare, compresi i meccanismi di sintesi del collagene (fibrosi sostituiva *vs* endo-perimisiale).

Lo studio delle aritmie e dei disturbi di conduzione ha portato a nuove conoscenze sia a livello dei canali ionici responsabili della depolarizzazione e ripolarizzazione e delle condizioni a loro associate (QT lungo, sindrome di Brugada, Wolf Parkinson White (WPW), aritmie sopraventricolari).

A livello vascolare abbiamo grandissimi capitoli che è quasi impossibile riassumere. Ricordiamo il processo di formazione della placca aterosclerotica, dalla semplice disfunzione endoteliale, alla lesione intimale, ai processi emocoagulativi ed all'aggregazione piastrinica, all'adesione delle molecole alla parete, alla fisiopatologia dei macrofagi, delle cellule T, alla proliferazione mio-intimale, ai fattori di crescita ad essa legati, alla deposizione dei lipidi, nonché alle alterazioni del metabolismo lipidico stesso, nonché alle complicanze della placca che portano agli eventi vascolari acuti: il rimodellamento, la rottura, la trombosi, l'emorragia di placca.

Non è da dimenticare l'importanza della conoscenza di tutti i processi metabolici in condizioni normali e di malattia che caratterizzano il miocardio ed i vasi.

Vi sono poi aspetti di fisiopatologia cellulare e molecolare che coinvolgono altri organi extracardiaci che però giocano un ruolo fondamentale nella genesi dei sintomi delle malattie cardiovascolari e nella loro prognosi. Un esempio tipico è il muscolo scheletrico che in presenza di insufficienza cardiaca sviluppa una miopatia specifica.

Sicuramente un nuovo approccio allo studio delle malattie cardiovascolari è costituito quindi oltre che dall'approccio cellulare e molecolare, dall'analisi anche dei profili di espressione genica.

Per dare un esempio della complessità e della vastità dell'argomento illustrerò due aspetti estremamente diversi della fisiopatologia cellulare e molecolare delle malattie cardiovascolari. Questi sono:

a) le recenti acquisizioni sugli aspetti genetici e molecolari delle malattie cardiovascolari

b) i meccanismi molecolari che portano alla regolazione del tipo e del trofismo delle fibre muscolari nello scompenso di cuore.

1. Recenti acquisizioni di genetica molecolare nelle malattie cardiovascolari

Il sequenziamento del genoma umano ha sicuramente costituito una pietra miliare nell'ambito cardiologico. Oltre alle implicazioni che questo ha ed avrà per quanto concerne l'identificazione dei geni responsabili delle cardiopatie familiari, vi saranno anche ricadute su quelle malattie acquisite che simulano fenotipi particolari. Un tipico esempio è l'ipercolesterolemia familiare in cui c'è un deficit recettoriale per *l'uptake* del colesterolo. La scoperta di questo deficit ci ha permesso di comprendere il ruolo del colesterolo nella malattia coronarica e di rivelare i meccanismi di sintesi, trasporto e degradazione del colesterolo stesso.

L'identificazione dei geni responsabili della malattia potrà garantire lo sviluppo di terapie specifiche per trattare la forma acquisita della malattia. Deve essere comunque ricordato che tutte le malattie genetiche sono il risultato di una interazione tra il gene (genotipo) e l'ambiente (fenotipo). Un esempio tipico dell'importanza che svolge l'ambiente nel determinare

Corrispondenza a: Dott. Giorgio Vescovo, Medicina 1, Ospedale S Bortolo, ULSS 6, Via Rodolfi 37, 36100, Vicenza;
email: gvescovo@yahoo.it.

la malattia lo si ha nella cardiomiopatia ipertrofica. Questa è una malattia dovuta ad un unico gene che viene trasmesso in maniera autosomica dominante e che dà origine ad un assetto fenotipico di ipertrofia ventricolare sinistra. Lo stesso gene è presente nel ventricolo destro, ma molto raramente il ventricolo destro è colpito dalla malattia. Questo fa pensare che i regimi pressori vigenti nella camera sinistra siano uno stimolo importante per la patogenesi del fenotipo ipertrofia.
Le malattie genetiche si dividono in 3 categorie:
- anormalità cromosomiche
- malattie da gene singolo
- malattie poligeniche

Le malattie da anormalità cromosomiche sono solitamente diagnosticate in età pediatrica. Un raro esempio di anormalità cromosomica diagnosticata in età adulta è la sindrome di Turner.
Attualmente molto importanti sono le malattie dovute ad un singolo gene, mentre purtroppo abbiamo ancora poche informazioni su quelle poligeniche, che però costituiscono la promessa futura della comprensione di molte alterazioni del sistema cardiovascolare (ad esempio l'ipertensione arteriosa).

1.1 Malattie da mutazione di un singolo gene

Le malattie ereditarie dovute a mutazione di un singolo gene sono trasmesse in maniera prevedibile, ovvero in maniera mendeliana. Ogni individuo ha due coppie di geni, ognuno proveniente da un genitore, trasmessi come alleli.
I geni sono porzioni di eredità che ci vengono trasmessi e poi passati alle generazioni successive in maniera indipendente. I due geni, separati su differenti cromosomi, si scambiano indipendentemente, attraverso il processo di *cross-over* tra cromosomi.
Maggiore è la distanza tra i due loci e più grande è la chance che vengano separati durante la trasmissione genetica.
La stessa malattia può essere dovuta a mutazioni multiple dello stesso gene (eterogeneità di allele), oppure ad una mutazione singola o multipla in due o più geni (eterogeneità di locus).
Mutazioni che coinvolgono un singolo nucleotide sono dette puntiformi e sono responsabili del 70% circa di tutte le malattie da alterazioni di un gene singolo. Una mutazione puntiforme può essere dovuta alla sostituzione di un nucleotide per un altro (*missense mutation*), oppure può cambiare l'aminoacido in maniera che funge da segnale di stop e la proteina viene troncata (*truncated mutant*), oppure può essere eliminato un segnale di stop cosicché la proteina viene allungata (*elongated mutant*). Possono esserci nucleotidi cancellati o aggiunti, cosicché può determinarsi una differente lettura da sinistra a destra ed il gene viene letto in maniera completamente diversa con produzione di una proteina non funzionante (*nonsense mutation*).

1.2 Modalità di trasmissione di una malattia da mutazione di un singolo gene

Le malattie autosomiche dominanti sono chiamate in questa maniera perché la malattia insorge nonostante sia interessato un solo allele. Maschi e femmine sono affetti in egual misura, con una percentuale attesa di malati del 50%.
Ogni persona malata ha almeno un genitore affetto, 50% della discendenza avrà il gene mutato, figli sani di un individuo affetto hanno discendenza normale, maschi e femmine sono interessati nella stessa misura, entrambi i sessi hanno la stessa possibilità di trasmettere l'allele anomalo a discendenti maschi o femmine e si può avere trasmissione da maschio a maschio. Si può avere trasmissione verticale attraverso generazioni successive. È tipico per le malattie autosomiche dominanti avere una età di insorgenza ritardata ed una espressione clinica variabile.
La forma più frequente di trasmissione delle malattie cardiovascolari è quella autosomica dominante, esempi sono la cardiomiopatia ipertrofica e la sindrome da QT lungo. A differenza la forma autosomica recessiva necessita di avere due alleli entrambi alterati, quindi entrambi i genitori devono essere portatori dell'allele mutato. Esempi di malattie autosomiche recessive sono il Jervell and Lang-Nielson a la malattia di Pompe.
Malattie ereditarie legate al cromomosoma X.
Siccome le femmine hanno due cromosomi X, esse possono essere portatrici di uno o due alleli mutanti. Siccome i maschi hanno un solo cromosoma X, la presenza anche di un solo allele mutante può portare all'espressione fenotipica della sindrome clinica quando ereditano dalla madre l'allele mutato. Il termine quindi di alterazione legata al cromosoma X dominante o recessiva può solo essere applicata alle femmine. Esempi sono la sindrome di Barth, la distrofia muscolare e la cardiomiopatia legata al cromosoma X.
Esistono poi le anormalità mitocondriali, che per lo più colpiscono la fosforilazione ossidativa. I fenotipi dovuti ad alterazione del DNA mitocondriale sono trasmesse solo dalle femmine in quanto solo l'ovulo contiene mitocondri.

1.3 Eredità poligenica nelle malattie cardiovascolari

Molte malattie cardiovascolari sono dovute alla mutazione di più geni, piuttosto che di un gene singolo. Esempi tipici sono l'ipertensione e la coronaropatia. Ci sono ampie dimostrazioni provenienti dallo studio dei gemelli mono e di-zigoti che dicono che queste malattie hanno una predisposizione genetica, mediata da molti geni. Ognuno di questi geni può comunque contribuire a meno del 5% della suscettibilità del fenotipo. È probabile che almeno 20 o 30 geni contribuiscano alla suscettibilità verso la coronaropatia o l'ipertensione. Studi sono attualmente in corso, parallelamente alla sequenziazione del genoma umano sul polimorfismo dei singoli nucleotidi. Esempi sono il genotipo DD dell' angiotensin-converting enzyme (ACE) che predisporrebbe all'ipertrofia cardiaca ed alla morte improvvisa e l'allele del fibrinogeno che predisporrebbe alla trombosi.

1.4 Storia familiare e malattie cardiovascolari ereditarie

Malattie che vengono segregate in una particolare famiglia vengono scoperte semplicemente dalla storia familiare. L'anamnesi di coronaropatia o di ipertensione deve venire prima dell'esame fisico.
Alcuni gruppi etnici possono aver mutazioni come per l'emoglobina (mediterranei, afro-americani).

1.5 Malattie cardiovascolari da mutazione di gene singolo

Lo spettro va dai difetti settali atriali (Noonan, Di Gorge, Holt-Oram) a difetti funzionali come il QT lungo e la sindrome di Brugada. Per la maggioranza di queste alterazioni il

locus è stato mappato, ma il gene non è stato identificato. In alcuni casi, come le cardiomiopatie, specie la ipertrofica, sono stati condotti numerosi studi che hanno portato a delucidazioni fisiopatologiche.

1.5.1 Sindrome del QT lungo

Sono state identificate parecchie mutazioni del canale del sodio o del potassio responsabili della sindrome del QT lungo. Una mutazione del canale del sodio SCN5A è associata ad aumentato influsso di sodio e depolarizzazione prolungata. Sono state descritte mutazioni del canale del potassio che determinano riduzione del flusso di potassio. Un'altra alterazione dei canali ionici è la fibrillazione ventricolare idiomatica (Sindrome di Brugada). È stato identificato un locus per la fibrillazione atriale (FA) familiare (10q32) e per la sindrome di WPW. Quest'ultima mutazione è spesso associata a cardiomiopatia ipertrofica, disturbi di conduzione e FA. Probabilmente tutti questi disturbi sono legati ad anomalie del metabolismo del glicogeno.

1.5.2 Cardiomiopatia ipertrofica familiare

Solitamente autosomica dominante, la malattia è istologicamente caratterizzata dalla presenza di ipertrofia dei miociti, *disarray* e fibrosi endoperimisiale. In questa malattia due terzi dei casi sono familiari, un terzo è sporadico. Questi ultimi sono generati da mutazioni de novo, che poi vengono trasmesse alla discendenza. La cardiomiopatia ipertrofica è dovuta alla mutazione di almeno 10 proteine sarcomeriche. Sono state identificate più di 100 mutazioni in 10 diversi geni. Sono state descritte mutazione della *β-myosin heavy chain* (che portano a malattia più precoce con alto rischio di morte improvvisa), mutazioni della MyBP-C, cTnT (con ipertrofia lieve, elevato grado di *disarray* e alto rischio di morte cardiaca improvvisa (SCD)), mutazioni della *myosin light chain* (MLC) ed ostruzione della cavità ventricolare, mutazioni della titina e della ±-actina. Le alterazioni fisiopatologiche indotte dalle proteine sarcomeriche mutanti vanno dall'alterata interazione actomiosinica, alla ridotta attività ATPasica, alla diagenesi sarcomerica, alla sensitività al calcio, stechiometria alerata delle proteine contrattili. Queste alterazioni porterebbero ad una alterata contrattilità, aumento dello stress dei miociti, attivazione delle chinasi intracellulari (ERK1 e 2) e dei fattori di crescita, attività trascrizionale con conseguente ipertrofia, sintesi di collagene e *disarray*.

1.5.3 Cardiomiopatia dilatativa

La cardiomiopatia dilatativa (CMD) familiare (definita da: Frazione di Eiezione (FE) <45%, dimensione del ventricolo e diastolica (LVEDD) >2.7 cm/m^2, storia familiare, assenza di coronaropatia), sembra essere dovuta sia ad alterazioni autosomiche dominanti, sia ad autosomiche recessive legate al cromosoma X, sia ad alterazioni del DNA mitocondriale. Sono state trovate alterazioni a carico delle proteine del citoscheletro, dell'α-actina, ma anche della β-MHC, della TnT, della metavinculina e della distrofina. Mutazione degli α- sarcoglicani sono state descritte in associazione alla distrofia *limb-girdle*.Un altro caso di CMD familiare è la mutazione del gene della lamin A/C. In questo caso sono associate anche FA, alterazioni del sistema di conduzione e SCD. Ci sono anche forme con alterazioni a carico del filamento intermedio e mutazioni del gene per la desmina ed ±/B cristallina.

1.5.4 Displasia aritmogena del ventricolo destro

La displasia aritmogena del ventricolo destro (ARVD) è caratterizzata da perdita di miociti, sostituzione fibro-adiposa prevalentemente a carico del ventricolo destro. Clinicamente si manifesta con aritmie ventricolari originatesi dal ventricolo destro. È spesso causa di SCD. Sono stati identificati numerosi loci responsabili della ARVD (14q23 q24 (ARVD1) 1q42 q43 (ARVD2) 14q12 q22 (ARVD3) 2q32 q32.3 (ARVD4) 3p23 (ARVD5) e 10p14 p12 (ARVD6). Il gene responsabile della ARVD2 è quello che codifica il recettore della rianodina. Nella malattia di Naxos, una variante della ARVD con cheratodermia è stata identificata una mutazione del gene della placoglobina.

1.5.5 Genetica dell'ipertensione

L'ipertensione è una delle malattie più diffuse ed ha caratteristiche ereditarie di tipo poligenico. Ci sono più geni coinvolti nell'aumentare la suscettibilità a sviluppare ipertensione. Questi geni interferiscono con l'ambiente. Sono state descritte mutazioni del recettore dei mineralcorticoidi. La mutazione puntiforme consiste nella sostituzione della serina con leucina a livello del codone 810. Il recettore mutato si autoattiva, anche in assenza di stimolazione da parte del gruppo 21-idrossilico. In questo caso lo spironolattone funziona da agonista anziché antagonista del recettore. In individui con questa mutazione il progesterone attiva il recettore ed in gravidanza si sviluppa eclampsia.

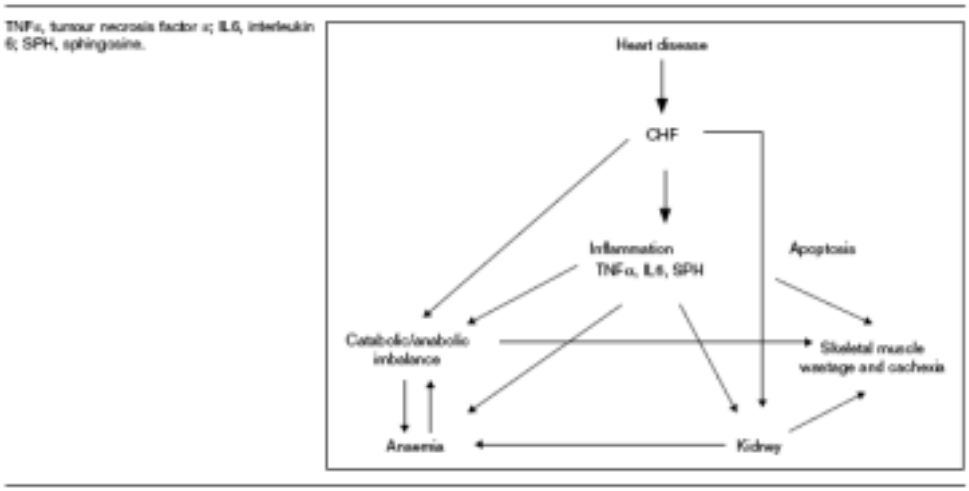


Figura 1. Ruolo centrale dell'infiammazione nello Scompenso Cardiaco e nel danno multiorgano

1.5.6 Malattia Coronarica

L'aterosclerosi è una malattia poligenica e certi geni che portano a suscettibilità al suo sviluppo sono stati identificati da studi di associazione in popolazioni ad altra prevalenza di malattia.

La lista di geni candidati è molto ampia: ACE, ATI, eNOS, fibrinogeno, PAI1, Fattore V, fattore VII, GpIIb/IIIa, LPL, LDLr, CEPT, LCAT, Apo-E, Apo-B,Apo-A.

2. Meccanismi molecolari che portano ai cambiamenti del tipo e del trofismo delle fibre muscolari nello scompenso cronico di cuore

I meccanismi coinvolti nella miopatia scheletrica che si sviluppa nello scompenso cronico di cuore sono molteplici. La miopatia scheletrica è caratterizzata da cambiamenti del tipo di fibre con diminuita sintesi delle fibre di tipo lento che sono aerobiche e resistenti alla fatica ed aumento delle fibre rapide che sono anaerobie e più affaticabili. Inoltre nella miopatia c'è una progressiva perdita della massa muscolare con atrofia delle fibre fino allo sviluppo di quello stato estremo che si configura con la cachessia cardiaca. I principali meccanismi che giocano un ruolo nella fisiopatologia della miopatia scheletrica e che sono tra loro interconnessi, sono: l'infiammazione, *l'imbalance* catabolico-anabolica, e l'apoptosi. Abbiamo recentemente cercato di dare una visione olistica a questo processo legando i tre diversi aspetti e questo viene riassunto in Figura 1. L'infiammazione è il *primum movens* ed è denominatore comune dello scompenso di cuore. In altre parole la malattia di cuore determina insufficienza cardiaca, la quale è causa di infiammazione. L'origine della flogosi può essere ricercata nel miocardio stesso che può produrre TNF± e sfingosina (due potenti citochine proinfiammatorie), nei tessuti periferici (che sono soggetti a vasocostrizione ed ischemia), nell'edema con alterata permeabilità intestinale e nell'attivazione del sistema neuroendocrino, specie quello adrenergico. Il TNFα e le citochine pro-infiammatori sono in grado di causare apoptosi, perdita di massa magra quali l'ipercatabolismo o l'attivazione del sistema ubiquitina-proteasoma.

L'imbalance catabolico-anabolica, espressa come rapporto DHEA/Cortisolo è un'altra causa della perdita di massa muscolare e quindi di cachessia cardiaca. Quando tale rapporto diminuisce c'è una spiccata tendenza al catabolismo muscolare.

Recenti esperimenti hanno dimostrato che l'apoptosi gioca un ruolo fondamentale nel determinare la perdita di massa muscolare scheletrica e quindi l'atrofia nello scompenso cronico di cuore. L'apoptosi è innescata direttamente dal TNFα circolante e del suo secondo messaggero la sfingosina (Figura 2).

È stato inoltre dimostrato che l'asse GH-IGF1 regola la sintesi delle proteine contrattili (specie la transizione dalle forme rapide alle lente), l'apoptosi e attraverso la calcineurina, l'FK506-FKBP, MAP-kinase e l'NFκB. Il TNFα interviene anche nella complicata cascata che porta alla attivazione dell'NFαB (Figura 3).

La calcineurina a sua volta agisce attraverso l'attivazione del PGC1α? (un potente co-attivatore trascrizionale dei recettori nucleari PPARs).

Abbiamo visto che nello scompenso di cuore calcineurina e PGC1α sono diminuite e contemporaneamente c'è uno *shift* delle MHCs verso le isoforme rapide. La somministrazione di GH che induce aumento della IGF1, determina aumento della calcineurina, aumento del PGC1α e sintesi di fibre lente (Figure 4 e 5).

In accordo con questi nuovi concetti fisiopatologici sono state sviluppate alcune strategie farmacologiche che mirano a prevenire o far regredire la miopatia scheletrica, bloccando l'infiammazione, il TNFα e l'apoptosi. Gli antagonisti dell'angiotensina II, la carnitina ed il GH a dosi elevate hanno mostrato una notevole utilità nel prevenire la miopatia scheletrica in modelli sperimentali animali di scompenso, specie per quanto riguarda l'aspetto atrofia cardiaca. Future strategie prevedono l'impianto di cellule staminali, la terapia genetica e trascrizionale, miranti ad esempio alla *overexpression* dell'IGF1.

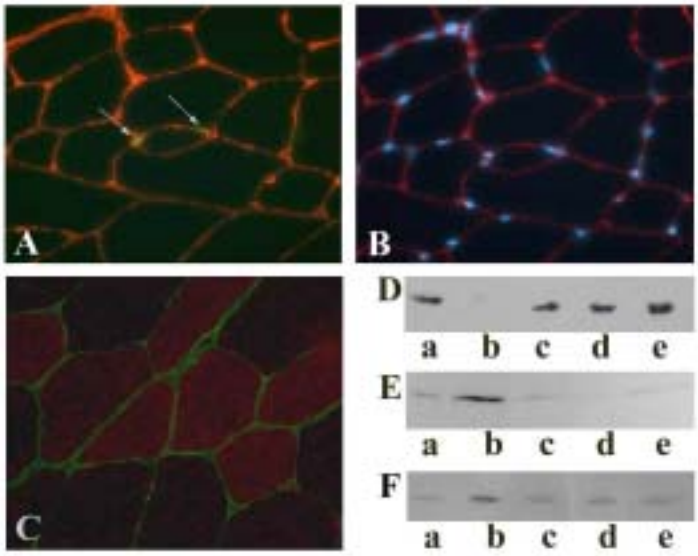


Figura 2. Apoptosi del muscolo scheletrico

- A Sezione traversa di muscolo con doppia colorazione laminina (rosso) e TUNEL (verde che mostra nuclei in apoptosi)
- B Colorazione Hoechst (nuclei totali)
- C Caspasi 3 attivata (rosso) e Distrofina (verde) all'interno di una cellula muscolare
- D Immunoblotting per Bcl-2 (a controllo, b CHF, cde CHF + GH)
- E Immunoblotting per Caspasi 9 (a controllo, b CHF, cde CHF + GH)
- F Immunoblotting per Bax (a controllo, b CHF, cde CHF + GH)

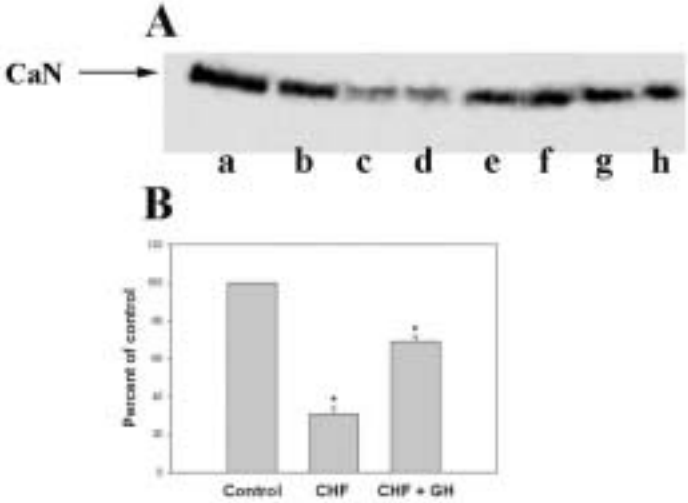
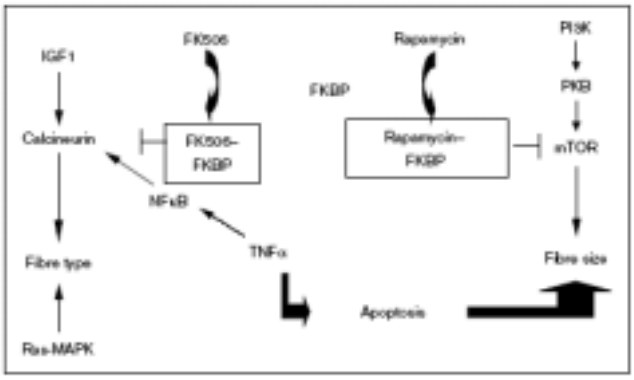


Figura 4. Espressione della Calcineurina nel muscolo scheletrico di ratti con scompenso di cuore. a, b: Animali di Controllo, c,d CHF, e,f,g,h, CHF + GH



TNFα, tumour necrosis factor α; IGF1, insulin-like growth factor 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKB, protein kinase B; mTOR, mammalian target of rapamycin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NFκB, nuclear factor κB; FKBP, FK506-binding protein. Adapted from [23].

Figura 3. Meccanismi regolatori del tipo e del trofismo delle fibre muscolari scheletriche

Il tipo di fibre è determinato dall'asse GH/IGF1-calcineurina ed è mediato dal recettore dell'FK506
La grandezza delle fibre è mediata dal recettore della Rapamicina (FKBP) e dall'mTOR.
Da notarsi l'importanza del TNFá e dell'NFkB su entrambi i meccanismi di questo processo per l'interazione sia con la calcineurina, che per la azione pro-apoptotica

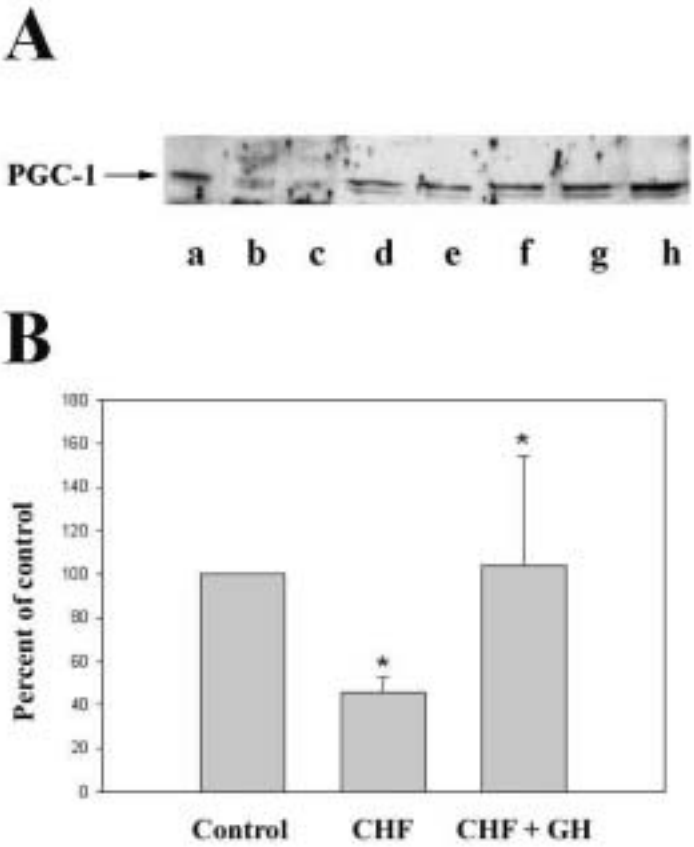


Figura 5. Espressione del PGC1á nel muscolo scheletrico di ratti con scompenso di cuore. a: Animale di Controllo, b,c CHF, d, e, f, g, h, CHF + GH

Bibliografia

– Marian AJ, Roberts R. Molecular genetics of Cardiovascular disorders. In: Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen E, Gersh B, eds. Evidence-based cardiology. London: BMJ; 2003. p 287-99.
– Dalla Libera L, Vescovo G. Muscle wastage in chronic heart failure, between apoptosis, catabolism and altered anabolism: a chimaeric view of inflammation? Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2004; 7:435-41.
– *Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O,* et al. *Transcriptional co-activator PGC-1a drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature 2002; 418:797-801.*
– Musarò A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-Atc1. Nature 1999; 400:581-5.
– Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalhoude JM, Schiaffino S. A protein kinase B-dependent and rapamycin sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. Proc Nat Acad Sci USA 2002; 99:9213-8.
– Dalla Libera L, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Della Barbera M, Angelini A, *et al.* Beneficial effects of GH/IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. Am J Physiol Cell Physiol 2004; 286:C138-44.