



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA

Sezione di Cardiocirurgia

(Direttore Prof. Alessandro Mazzucco)

SCUOLA DI DOTTORATO DI SCIENZE DELLA VITA E DELLA  
SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI

CICLO XXV/ANNO 2010

Tesi di Dottorato

**Studio delle vie di segnale coinvolte nello sviluppo di  
ipertensione polmonare da sovraccarico cronico di  
volume del ventricolo destro e valutazione degli effetti di  
un nuovo donatore di ossido nitrico.**

S.S.D. MED/23

Coordinatore:

Prof. ALESSANDRO MAZZUCCO

Tutor:

Prof. GIUSEPPE FAGGIAN

Dr. ALESSIO RUNGATSCHER

Dottoranda:

ALICE GIACOMAZZI

# Indice

<b>ABSTRACT (Ita)</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT (Eng)</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1. IPERTENSIONE POLMONARE</b> .....	<b>9</b>
1.1.1. Definizioni emodinamiche di ipertensione polmonare.....	<b>9</b>
1.1.2 Classificazione clinica di ipertensione polmonare .....	<b>12</b>
1.1.3 Classificazione ed epidemiologia dell'ipertensione arteriosa polmonare (gruppo 1) .....	<b>14</b>
1.1.3.1 sottogruppo 1.1. Ipertensione arteriosa polmonare idiopatica.....	<b>14</b>
1.1.3.2 sottogruppo 1.2. Ipertensione arteriosa polmonare ereditabile.....	<b>14</b>
1.1.3.3 sottogruppo 1.3. Ipertensione arteriosa polmonare indotta da Farmaci o sostanze tossiche.....	<b>15</b>
1.1.3.4 sottogruppo 1.4. Forme associate di ipertensione arteriosa polmonare: ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite (sottogruppo 1.4.4). .....	<b>16</b>
1.1.3.5 Sindrome di Eisenmenger.....	<b>17</b>
1.1.3.5.1 Classificazione clinica degli <i>shunts</i> sistemico- polmonari congeniti associati allo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare .....	<b>18</b>
1.1.3.6 sottogruppo 1.5. Ipertensione arteriosa polmonare pediatrica. ....	<b>20</b>
1.1.4 Manifestazione clinica, aspetti istopatologici e patobiologici dell'ipertensione arteriosa polmonare .....	<b>21</b>
1.1.4.1 Sintomi, segni clinici e principali strategie diagnostiche .....	<b>21</b>
1.1.4.2 Caratteristiche istopatologiche .....	<b>24</b>
1.1.4.3 Aspetti patobiologici .....	<b>32</b>
1.1.4.4 Epigenetica, mutazioni somatiche e <i>triggers</i> ambientali nell'ipertensione arteriosa polmonare. ....	<b>33</b>
<b>1.2. IL VENTRICOLO DESTRO NELL' IPERTENSIONE ARTERIOSA         POLMONARE</b> .....	<b>35</b>
1.2.1 Aumento del postcarico, <i>remodelling</i> e scompenso ventricolare destro .....	<b>35</b>
1.2.2 Aspetti patobiologici del <i>remodelling</i> strutturale e scompenso ventricolare destro nell'ipertensione arteriosa polmonare (aumento del postcarico, sovraccarico di pressione). ....	<b>38</b>
<b>1.3. ASPETTI MOLECOLARI DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA         POLMONARE</b> .....	<b>40</b>
1.3.1 <i>Remodelling</i> vascolare polmonare e cardiaco da sovraccarico emodinamico .....	<b>40</b>
1.3.2 MAPKs e ruolo del <i>signaling</i> ERK1/2 ( <i>Ras-Raf-MEK-ERK signal             transduction cascade</i> ) nel <i>remodelling</i> vascolare polmonare e cardiaco da sovraccarico emodinamico .....	<b>41</b>
1.3.3 Ruolo del <i>signaling</i> Akt nel <i>remodelling</i> vascolare polmonare e cardiaco da sovraccarico emodinamico.....	<b>48</b>
1.3.4 Ruolo dell'ossido nitrico (NO) nell'ipertensione arteriosa polmonare e nella fisiopatologia cardiaca .....	<b>55</b>

1.3.4.1 Sintesi dell'ossido nitrico e ossido nitrico sintasi (NOS) .....	57
1.3.4.2 Disfunzione endoteliale, eNOS <i>uncoupling</i> e stress ossidativo ..	61
1.3.5 Ruolo della troponina I cardiaca nella regolazione della funzione cardiaca contrattile .....	64
1.4 MODELLI ANIMALI DI IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE .....	67
1.4.1 Modelli animali "classici": ipossia cronica.....	67
1.4.2 Modelli animali "classici": danno da monocrotalina (MCT).....	68
1.4.3 Modelli animali "classici": legatura del dotto arterioso.....	70
1.4.4 Modelli genetici: ratti con ipertensione polmonare spontanea .....	71
1.4.5 Modelli genetici: animali geneticamente modificati.....	71
1.5. LO <i>SHUNT</i> AORTO-CAVALE COME MODELLO DI SOVRACCARICO DI VOLUME DEL VENTRICOLO DESTRO E IPERTENSIONE POLMONARE.....	72
1.5.1 Fase preliminare dello studio: validazione del modello di ipertensione polmonare da sovraccarico di volume cronico del ventricolo destro in seguito allo <i>shunt</i> aorto-cavale .....	75
1.5.1.1 Emogasanalisi e calcolo Qp/Qs.....	75
1.5.1.2 Valutazione ecocardiografica.....	76
1.5.1.3 Valutazione emodinamica.....	79
1.6. TERAPIA FARMACOLOGICA SPECIFICA PER IL TRATTAMENTO DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE .....	89
1.6.1 Bloccanti dei canali del calcio .....	89
1.6.2 Prostanoidi .....	90
1.6.3 Antagonisti del recettore dell'endotelina .....	91
1.6.4 Inibitori della fosfodiesterasi di tipo 5 .....	92
1.6.5 Composti chimici sperimentali e strategie mediche alternative.....	92
1.6.6 Donatori di ossido nitrico ( <i>NO-donors</i> ) e albumina nitrosilata .....	93
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>96</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>98</b>
3.1 Animali e disegno sperimentale.....	98
3.2 Creazione della fistola aorto-cavale.....	100
3.3 Allestimento dei preparati istologici.....	103
3.4 Processamento e conservazione dei campioni bioptici tissutali .....	104
3.5 Preparazione degli estratti proteici tissutali .....	104
3.6 Analisi Western blot .....	105
3.7 Determinazione del glutatione ossidato e ridotto .....	107
3.8 Determinazione dello stato energetico tissutale: fosfati ad alta energia .....	108
3.9 Analisi statistica.....	109
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>110</b>
4.1 Valutazione istologica del modello sperimentale .....	110
4.2 Analisi Western blot nel ventricolo destro: SHAM vs SHUNT (prima fase).....	112
4.3 Analisi Western blot nel ventricolo destro: SHUNT+HSA vs SHUNT+S-NO-HSA (seconda fase) .....	115

4.4 Analisi Western blot nel tessuto polmonare: SHAM vs SHUNT (prima fase).....	118
4.5 Analisi Western blot nel tessuto polmonare: SHUNT+HSA vs SHUNT+S-NO-HSA (seconda fase) .....	121
4.6 Analisi dello stato del glutatione nel ventricolo destro .....	124
4.7 Analisi dello stato del glutatione nel tessuto polmonare.....	125
4.8 Determinazione dello stato energetico tissutale: fosfati ad alta energia nel ventricolo destro.....	126
4.9 Determinazione dello stato energetico tissutale: fosfati ad alta energia nel tessuto polmonare .....	128
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>130</b>
5.1 Prima fase: valutazione istologica, biochimica e molecolare del modello sperimentale di ipertensione polmonare da sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro.....	131
5.2 Seconda fase: effetti biochimici e molecolari dell'albumina nitrosilata sull'ipertensione polmonare da sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro.....	143
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>149</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>150</b>

## **ABSTRACT**

**Background.** Il sovraccarico di volume cronico del ventricolo destro determina a lungo termine la comparsa di un quadro patologico di scompenso ventricolare destro e ipertensione arteriosa polmonare, una condizione emodinamica e fisiopatologica progressiva e complessa caratterizzata da una pressione arteriosa polmonare media a riposo superiore, o uguale, a 25 mmHg, un rimodellamento sostanziale della struttura dei vasi polmonari e un elevato grado di ipertrofia ventricolare destra. Gli esatti meccanismi molecolari coinvolti nell'eziopatogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare, nonché nel rimodellamento ventricolare e vascolare da sovraccarico di volume cronico del ventricolo destro, sono tuttora poco chiari, motivo per cui questa condizione clinica continua a rimanere devastante, con sintomi progressivamente debilitanti ed alta mortalità nella popolazione affetta.

**Obiettivi.** Nella prima fase dello studio (fase di valutazione, osservazionale e descrittiva) sono state eseguite analisi istologiche, biochimiche e molecolari allo scopo di fornire una valutazione approfondita del modello sperimentale di ipertensione polmonare da sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro, essenzialmente un modello di ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite (sottogruppo 1.4.4). Nella seconda fase dello studio (fase di trattamento) sono stati valutati gli effetti della somministrazione in acuto di **albumina nitrosilata**, un nuovo agente donatore di ossido nitrico (*NO-donor*), sull'ipertensione polmonare e sul rimodellamento del ventricolo destro.

**Metodi.** 35 ratti maschi adulti *Sprague-Dawley* (15 nella prima fase, gruppo SHUNT, 20 nella seconda fase, gruppi SHUNT+HSA e SHUNT+S-NO-HSA) del peso di  $400 \pm 50$  grammi, sono stati sottoposti ad intervento di creazione di una fistola aorto-cavale mentre ratti *sham-operated* (n=15) sono stati considerati come controlli nella prima fase dello studio. A distanza di 20 settimane dall'operazione, sezioni di ventricolo destro e arteriole polmonari degli animali della prima fase sperimentale (n=5 per gruppo) sono state analizzate con tecniche istologiche, mentre lo stato di fosforilazione di ERK1/2, Akt e cTnI e i livelli di espressione/attivazione di eNOS e iNOS sono stati valutati mediante analisi Western blot su biopsie di ventricolo destro e polmone di tutti i ratti considerati in entrambe le fasi dello studio. L'analisi HPLC ha infine consentito di determinare sugli stessi campioni i rapporti tra glutatione ossidato e ridotto (GSSG/GSH) e il contenuto dei fosfati ad alta energia.

**Risultati.** L'analisi Western blot eseguita su campioni di miocardio ventricolare destro a distanza di 20 settimane dall'esecuzione dello *shunt* aorto-cavale, ha evidenziato un significativo incremento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 ( $p < 0.001$ ) e di cTnI ( $p < 0.01$ ), una significativa riduzione dello stato di fosforilazione di Akt ( $p < 0.05$ ) e una significativa *down*-regolazione dei livelli di espressione di iNOS ( $p < 0.05$ ) nel gruppo SHUNT rispetto al gruppo SHAM. I ratti del gruppo SHUNT+S-NO-HSA hanno invece mostrato una significativa riduzione dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 ( $p < 0.01$ ) e di cTnI ( $p < 0.01$ ) nel ventricolo destro rispetto al gruppo di controllo SHUNT+HSA, mentre

risultano caratterizzati da una significativa *up*-regolazione dei livelli di espressione di iNOS ( $p < 0.05$ ) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale.

I campioni di tessuto polmonare degli animali del gruppo SHUNT, analizzati mediante Western blot a distanza di 20 settimane dalla creazione della fistola aorto-cavale, hanno mostrato un significativo aumento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 ( $p < 0.01$ ) e dell'espressione di iNOS ( $p < 0.05$ ) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM), mentre il trattamento in acuto con albumina S-nitrosilata (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) ha ulteriormente contribuito ad un sostanziale incremento dei livelli di espressione di iNOS ( $p < 0.05$ ) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA).

La persistenza dello *shunt* aorto-cavale per 20 settimane è risultata indurre un significativo incremento dei livelli di glutatione ossidato (%GSSG,  $p < 0.05$ ) nel ventricolo destro dei ratti SHUNT rispetto ai ratti di controllo SHAM, mentre nessuna variazione statisticamente significativa è stata evidenziata negli animali trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto al gruppo di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale.

Nel tessuto polmonare i livelli di GSSG sono risultati sostanzialmente aumentati ( $p < 0.01$ ) nel gruppo SHUNT rispetto al gruppo SHAM ma significativamente ridotti ( $p < 0.01$ ) in seguito alla somministrazione acuta di S-NO-HSA (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale.

La funzionalità mitocondriale dei cardiomiociti ventricolari destri è risultata complessivamente compromessa (diminuzione di ATP,  $p < 0.05$ ) negli animali del gruppo SHUNT rispetto agli animali *sham-operated* (SHAM), dopo 20 settimane dall'operazione, con una generale tendenza alla preservazione in seguito al trattamento con S-NO-HSA (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) rispetto al gruppo di controllo (SHUNT+HSA).

Variazioni significative dei livelli di AMP e ATP ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  rispettivamente) sono state evidenziate nel tessuto polmonare dei ratti SHUNT rispetto al gruppo SHAM in seguito alla persistenza della fistola aorto-cavale; lo stato energetico polmonare è risultato significativamente preservato (diminuzione AMP:  $p < 0.05$ ; aumento ATP:  $p < 0.01$ ) nel gruppo SHUNT+S-NO-HSA rispetto agli animali non trattati (SHUNT+HSA).

**Conclusioni.** Il modello studiato di sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro con progressivo sviluppo di ipertensione polmonare dimostra il coinvolgimento di vie di segnale attivate nella patogenesi dell'insufficienza ventricolare destra con ipertensione del circolo arterioso polmonare e in particolare:

- ERK 1/2 nell'ipertrofia cardiaca e della componente vascolare polmonare;
- Akt nella sopravvivenza cellulare;
- cTnI nella regolazione della funzione contrattile dei cardiomiociti;
- eNOS e iNOS nell'omeostasi endoteliale e nella generazione di ossido nitrico.

In questo contesto sperimentale, che riproduce condizioni cliniche specifiche, l'utilizzo di un nuovo NO-*donor* quale la S-NO-HSA per via sistemica in acuto, risulta essere vantaggioso non solo per il profilo emodinamico e biochimico ma poiché attenua le alterazioni di mediatori coinvolti in vie biomolecolari di fondamentale importanza per le possibili implicazioni cliniche.

## **ABSTRACT**

**Background.** Chronic volume overload of right ventricle induces right ventricular failure and pulmonary arterial hypertension, a progressive and multifaceted disease process characterized by high morbidity and mortality, high mean pulmonary artery pressure at rest ( $\geq 25$  mmHg), pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy. The exact molecular mechanisms involved in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension remain still unclear as those underlying the development of chronic volume overload-induced right ventricular and pulmonary vascular remodeling.

**Objectives.** In the first part of the study (evaluation phase) the animal model of right ventricular chronic volume overload-induced pulmonary hypertension was assessed by histological, biochemical and molecular analysis. This model was essentially designed to reproduce a particular clinical condition such as pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart diseases (clinical subset 1.4.4). In the second part (treatment phase) the effects of a new NO-donor's acute administration, S-nitroso-albumin, were evaluated in respect of pulmonary hypertension and right ventricular remodeling.

**Methods.** Aorto-caval shunt was surgically created in 35 adult male Sprague-Dawley rats weighting  $400 \pm 50$  g (first part, SHUNT group, n=15; second part, SHUNT+HSA and SHUNT+S-NO-HSA groups, n=10 each one). Sham-operated rats (n=15) were considered as controls only for the first part of the study (SHAM group). 20 weeks after surgery histological sections were obtained from right ventricles and small pulmonary arteries of SHAM and SHUNT animals (n=5 each group), stained in hematoxylin-eosin and finally analyzed. The phosphorylation status of ERK1/2, Akt and cTnI and protein expression/activation levels of eNOS and iNOS were evaluated by Western blot analysis in right ventricles and lungs of all rats in both phases of the study after 20 weeks from surgery. The same samples were used even to determine the ratios between oxidized and reduced glutathione (GSSG/GSH) and high energy phosphates content by HPLC analysis.

**Results.** Western blot analysis on right ventricular myocardium has shown a significant increase of ERK1/2 and cTnI phosphorylation levels ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively), a decrease of Akt phosphorylation ( $p < 0.05$ ) and a significant downregulation of iNOS expression ( $p < 0.05$ ) in SHUNT group compared to the SHAM group, 20 weeks after the aorto-caval shunt. ERK1/2 and cTnI phosphorylation levels were significantly reduced in right ventricle of SHUNT+S-NO-HSA rats compared to the control group (SHUNT+HSA) ( $p < 0.01$ ), while the treatment significantly upregulated the expression of iNOS ( $p < 0.05$ ) after 20 weeks from surgery.

As shown by Western blot analysis performed on lung tissue biopsies 20 weeks after the aorto-caval shunt, there was a significant increase of ERK1/2 phosphorylation levels and iNOS expression in SHUNT group compared to *sham-operated* rats ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  respectively), while S-NO-HSA acute administration induced a further increase of iNOS expression in SHUNT+S-NO-HSA group compared to the control ( $p < 0.05$ ).

Twenty week-aorto-caval shunt induced a significant increase of oxidized glutathione levels in right ventricle of SHUNT rats compared to the control group ( $p < 0.05$ ), while no

changes were shown after S-NO-HSA treatment compared to the SHUNT+HSA group 20 weeks after surgery.

Lung tissue levels of GSSG were significantly increased in SHUNT group ( $p < 0.01$ ) but substantially reduced after acute administration of S-NO-HSA ( $p < 0.01$ ) at 20 weeks from aorto-caval shunt.

As shown by the significant decrease of ATP levels in right ventricle of SHUNT animals compared to the control group ( $p < 0.05$ ), mitochondrial function of right ventricular cardiomyocytes was substantially reduced after 20 weeks from aorto-caval shunt while seemed to be preserved by the treatment with S-NO-HSA compared to the untreated animals.

Significant changes of AMP and ATP content were shown in lung tissue of SHUNT rats compared to the control group ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  respectively) 20 weeks after the aorto-caval shunt while acute administration of S-NO-HSA significantly preserved lung energy status compared to the untreated group ( $p < 0.05$  for the decrease of AMP;  $p < 0.01$  for the increase of ATP).

**Conclusions.** This model of right ventricle chronic volume overload with progressive development of pulmonary hypertension showed the involvement of signaling pathways in the pathogenesis of right ventricular failure with pulmonary arterial hypertension, in particular:

- ERK 1/2 in cardiac hypertrophy and pulmonary vascular remodelling;
- Akt in cell survival;
- cTnI in regulation of cardiomyocyte contractile function;
- eNOS and iNOS in endothelial homeostasis and nitric oxide generation.

In this experimental setting acute administration of a new NO-donor, such as S-NO-HSA, has been shown overall haemodynamic and biochemical effects and a reduction of the altered mediators involved in some pathways of pivotal role in the clinical field.

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 IPERTENSIONE POLMONARE**

Negli ultimi dieci anni, i risultati ottenuti dai numerosi studi clinici nonché dall'ampia ricerca pre-clinica e sperimentale nel campo dell'ipertensione polmonare hanno consentito un sostanziale arricchimento delle conoscenze medico-scientifiche, contribuendo ad un significativo sviluppo di strategie diagnostiche e terapeutiche innovative e più efficaci. Nonostante i recenti progressi e la considerevole disponibilità di dati sulla base dei quali sono state formulate le attuali linee guida (1), molti aspetti riguardanti valutazione e trattamento dell'ipertensione polmonare rimangono ancora largamente inesplorati (2); per tali ragioni, questa condizione patologica rimane tutt'oggi di rilevante importanza clinica.

La complessa e multidisciplinare natura dell'ipertensione polmonare rende ragione della necessità di gestire, nei limiti del possibile, la maggior parte dei pazienti presso (o con l'ausilio di) Centri di Eccellenza nel campo di questa patologia, al fine di garantire la presenza di personale medico e infermieristico competente e altamente specializzato nella gestione e trattamento terapeutico dei pazienti con ipertensione polmonare, nonché la possibilità di eseguire *trials* clinici per lo sviluppo di nuovi agenti farmacologici. I programmi multidisciplinari previsti in questi Centri per il complesso *management* dell'ipertensione polmonare coinvolgono numerose figure specialistiche quali cardiologi, cardiocirurghi, pneumologi, reumatologi, epatologi, specialisti nel settore delle malattie infettive, ematologi, medici di trapianto d'organo, psicologi e assistenti sociali.

### **1.1.1 Definizioni emodinamiche di ipertensione polmonare**

Le linee guida attualmente vigenti definiscono l'ipertensione polmonare come una condizione emodinamica e fisiopatologica caratterizzata da un aumento della pressione arteriosa polmonare media a riposo, misurata mediante cateterismo cardiaco destro, superiore o uguale a 25 mmHg (1). Questo valore è stato e viene tutt'oggi utilizzato come *cut-off* di riferimento per la selezione dei pazienti in tutti i *trials* clinici randomizzati controllati e nei registri di ipertensione arteriosa polmonare (3). Secondo quanto emerso da una recente rivalutazione dei dati disponibili, il valore stimato per la pressione arteriosa polmonare media a riposo, in condizioni normali, sarebbe pari a  $14 \pm 3$  mmHg, con un limite massimo superiore di circa 20 mmHg (4). Ulteriori studi epidemiologici potrebbero essere necessari per chiarire il significato di una pressione arteriosa polmonare media compresa nel range tra 21 e 24 mmHg.

Non vi sono attualmente dati pubblicati che supportino una definizione di ipertensione polmonare come una condizione caratterizzata da una pressione arteriosa polmonare media, valutata mediante cateterismo cardiaco destro, superiore a 30 mmHg durante l'esercizio fisico; è stato infatti recentemente dimostrato come alcuni individui sani, per lo più anziani, siano frequentemente in grado di raggiungere valori pressori notevolmente

più elevati (4). Per questi motivi non è ancora stato possibile fornire una chiara ed appropriata definizione di ipertensione polmonare in condizioni di esercizio fisico.

Le varie combinazioni dei valori di pressione capillare polmonare, resistenza vascolare polmonare e gittata cardiaca hanno consentito la formulazione di molteplici e differenti definizioni emodinamiche di ipertensione polmonare (5) (Tab. 1).

Si definisce **ipertensione polmonare pre-capillare** quella condizione clinica caratterizzata da: pressione arteriosa polmonare media superiore o uguale a 25 mmHg, pressione capillare polmonare inferiore o uguale a 15 mmHg e gittata cardiaca conservata o ridotta. Tale definizione abbraccia tutti i gruppi clinici di ipertensione polmonare, fatta eccezione per il gruppo 2 (ipertensione polmonare associata a patologie del cuore sinistro). In questo gruppo, l'ipertensione polmonare risulta contraddistinta da un'aumentata pressione capillare polmonare con valori superiori a 15 mmHg (**ipertensione polmonare post-capillare**).

Dal punto di vista emodinamico, l'ipertensione polmonare post-capillare può essere a sua volta distinta in: **ipertensione polmonare passiva** (gradiente transpolmonare inferiore o uguale a 12 mmHg) ed **ipertensione polmonare reattiva**, o *out of proportion*, (gradiente transpolmonare superiore a 12 mmHg).

**Tabella 1. Definizioni emodinamiche di ipertensione polmonare <sup>a</sup>.**

<b>Definizione</b>	<b>Caratteristiche</b>	<b>Gruppi clinici <sup>b</sup></b>
<b><u>Ipertensione polmonare</u></b>	PAP media $\geq$ 25 mmHg	Tutti
<b><u>Ipertensione polmonare pre-capillare</u></b>	PAP media $\geq$ 25 mmHg PWP $\leq$ 15 mmHg CO normale o ridotto <sup>c</sup>	1. Ipertensione arteriosa polmonare 3. Ipertensione polmonare associata a patologie polmonari 4. Ipertensione polmonare tromboembolica cronica 5. Ipertensione polmonare con meccanismi non chiari e/o multifattoriali
<b><u>Ipertensione polmonare post-capillare</u></b>	PAP media $\geq$ 25 mmHg PWP $>$ 15 mmHg CO normale o ridotto <sup>c</sup>	2. Ipertensione polmonare associata a patologia del cuore sinistro
- <b><u>passiva</u></b>	TPG $\leq$ 12 mmHg	
- <b><u>reattiva (out of proportion)</u></b>	TPG $>$ 12 mmHg	

<sup>a</sup> Tutti i valori sono misurati a riposo

<sup>b</sup> In conformità con la Tabella 2

<sup>c</sup> Un elevato CO può essere presente in alcune condizioni ipercinetiche quali shunt sistemico-polmonari (soltanto nella circolazione polmonare), anemia, ipertiroidismo, etc.

CO = *cardiac output*; PAP = *pulmonary arterial pressure*; PWP = *pulmonary wedge pressure*; TPG = *transpulmonary pressure gradient* (PAP media – PWP media).

## 1.1.2 Classificazione clinica di ipertensione polmonare

L'attuale classificazione clinica dell'ipertensione polmonare è il risultato di un'ampia serie di revisioni continue e modificazioni apportate nel corso del tempo, a partire dal 1973, anno in cui, in occasione della prima conferenza internazionale sull'ipertensione polmonare primaria, venne proposta la prima versione, approvata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (6). Questa iniziale classificazione prevedeva la distinzione di due sole categorie di ipertensione polmonare, ipertensione polmonare primaria e secondaria, sulla base della presenza o assenza di cause o fattori di rischio identificabili.

Venticinque anni dopo, durante il Secondo Simposio Mondiale sull'ipertensione arteriosa polmonare tenutosi ad Evian, in Francia, venne formulata una nuova classificazione (*Evian classification*) con lo scopo di definire categorie di ipertensione polmonare che condividessero caratteristiche cliniche e patologiche, nonché strategie terapeutiche, simili (7). Tale classificazione, molto più ampia e completa rispetto alla classificazione iniziale, distingueva cinque categorie principali di ipertensione polmonare e consentì la realizzazione di *trials* clinici in gruppi omogenei e ben definiti di pazienti, opportunamente selezionati sulla base di caratteristiche patogenetiche comuni.

In occasione del Terzo Simposio Mondiale sull'ipertensione arteriosa polmonare, tenutosi cinque anni più tardi a Venezia, l'impatto e l'utilità pratica della classificazione di Evian vennero rivalutati con lievi modificazioni della classificazione precedente.

Durante il Quarto Simposio Mondiale sull'ipertensione polmonare, tenutosi a Dana Point, in California, nel 2008, un gruppo di esperti internazionali nel campo dell'ipertensione polmonare espresse il proprio *consensus* nel mantenere definitivamente la filosofia e l'organizzazione generale delle classificazioni di Evian-Venezia, apportando comunque tutte le modifiche necessarie per meglio chiarire alcuni aspetti rimasti incompresi (8).

La nuova classificazione di Dana Point (8) (Tab. 2) distingue dunque sei principali gruppi clinici di ipertensione polmonare, ciascuno contraddistinto da peculiari caratteristiche cliniche e aspetti istologici, nonché specifici approcci diagnostici e terapeutici.

Dati epidemiologici sufficientemente completi, riguardanti la prevalenza dei diversi gruppi clinici di ipertensione polmonare, non risultano attualmente disponibili, sebbene una recente indagine, condotta presso un laboratorio di ecocardiografia (9), abbia riportato una prevalenza di casi di ipertensione polmonare (definita come pressione sistolica arteriosa polmonare > 40 mmHg) pari a 10.5%, su un totale di 4579 pazienti. Dei 483 casi di ipertensione polmonare, il 78.7% dei pazienti presentava patologia del cuore sinistro (gruppo 2), il 9.7% patologie polmonari e ipossia (gruppo 3), il 4.2% manifestava un quadro clinico di ipertensione arteriosa polmonare (gruppo 1) e, infine, lo 0,6% presentava diagnosi di ipertensione polmonare tromboembolica cronica (gruppo 4). Nel 6,8% dei casi non fu possibile definire una diagnosi precisa.

**Tabella 2. Classificazione clinica di ipertensione polmonare (Dana Point, 2008) (8)**

<p><b>1 Ipertensione arteriosa polmonare</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>1.1 Idiopatica</li><li>1.2 Ereditabile<ul style="list-style-type: none"><li>1.2.1 BMPR2</li><li>1.2.2 ALK1, endogлина (con o senza telangiectasia emorragica ereditaria)</li><li>1.2.3 Sconosciuta</li></ul></li><li>1.3 Indotta da farmaci o sostanze tossiche</li><li>1.4 Associata a:<ul style="list-style-type: none"><li>1.4.1 Patologie del tessuto connettivo</li><li>1.4.2 Infezione da HIV</li><li>1.4.3 Ipertensione portale</li><li>1.4.4 Cardiopatie congenite</li><li>1.4.5 Schistosomiasi</li><li>1.4.6 Anemia emolitica cronica</li></ul></li><li>1.5 Ipertensione polmonare persistente del neonato</li></ul>
<p><b>1' Patologia polmonare veno-occlusiva e/o emangiomatosi capillare polmonare</b></p>
<p><b>2 Ipertensione polmonare secondaria a patologia del cuore sinistro</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>2.1 Disfunzione sistolica</li><li>2.2 Disfunzione diastolica</li><li>2.3 Patologia valvolare</li></ul>
<p><b>3 Ipertensione polmonare secondaria a patologie polmonari e/o ipossia</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>3.1 Patologia polmonare cronica ostruttiva</li><li>3.2 Patologia dell'interstizio polmonare</li><li>3.3 Altre patologie polmonari con pattern restrittivo e ostruttivo misto</li><li>3.4 Disturbi della respirazione durante il sonno</li><li>3.5 Condizioni di ipoventilazione alveolare</li><li>3.6 Esposizione cronica all'alta quota</li><li>3.7 Anomalie dello sviluppo</li></ul>
<p><b>4 Ipertensione polmonare tromboembolica cronica</b></p>
<p><b>5 Ipertensione polmonare con meccanismi non chiari e/o multifattoriali</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>5.1 Disordini ematologici: disordini mieloproliferativi, splenectomia</li><li>5.2 Disordini sistemici: sarcoidosi, istiocitosi delle cellule di Langerhans polmonari, linfangioleiomiomatosi, neurofibromatosi, vasculite</li><li>5.3 Disordini metabolici: glicogenosi, malattia di Gaucher, patologie della tiroide</li><li>5.4 Altri: ostruzione tumorale, mediastinite fibrosa, insufficienza renale cronica in dialisi.</li></ul>

### **1.1.3 Classificazione ed epidemiologia dell'ipertensione arteriosa polmonare (gruppo 1)**

Fin dal 1973, anno in cui venne proposta la prima classificazione clinica, l'ipertensione arteriosa polmonare ha continuato a costituire il focus centrale di tutte le classificazioni successive e rappresenta attualmente il tipo di ipertensione polmonare più ampiamente studiato, per il quale sono stati raggiunti, negli ultimi dieci anni, i più elevati livelli di conoscenza. In questo gruppo, l'ipertensione polmonare costituisce il "core" essenziale di tutti i problemi clinici e, per questo motivo, potrebbe essere trattata mediante terapia farmacologica specificamente mirata (1).

Dati epidemiologici recenti (8, 10) suggeriscono una prevalenza dell'ipertensione arteriosa polmonare nella popolazione adulta di circa 15 casi su un milione di individui, con un'incidenza annua pari a 2.4 nuovi casi su un milione.

L'ipertensione arteriosa polmonare comprende condizioni apparentemente eterogenee (Tab. 2) ma di fatto caratterizzate da quadri clinici ed emodinamici simili, nonché alterazioni patologiche della microcircolazione polmonare virtualmente identiche; tali condizioni si distinguono tuttavia per alcuni aspetti specifici che ne determinano la suddivisione in cinque *subsets* differenti: ipertensione arteriosa polmonare idiopatica (1.1), ereditabile (1.2), indotta da farmaci o sostanze tossiche (1.3), forme associate (1.4) e ipertensione arteriosa polmonare pediatrica (1.5). Il riconoscimento specifico di questi *subsets* clinici è fondamentale per garantire un corretto approccio diagnostico nonché un trattamento adeguato dell'ipertensione arteriosa polmonare.

#### **1.1.3.1 sottogruppo 1.1. Ipertensione arteriosa polmonare idiopatica**

L'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica rappresenta il tipo più comune di ipertensione arteriosa polmonare ed è caratterizzata da una prevalenza nella popolazione adulta di circa 6 casi per milione di individui (10), un rapporto femmina/maschio di 1.7:1 (4.3:1 nella popolazione nera) con una maggiore occorrenza nella terza decade per la popolazione femminile e nella quarta decade per la popolazione maschile, e un'età media alla diagnosi di circa 37 anni in entrambi i sessi. Nel 75% dei casi le pazienti di sesso femminile manifestano sintomi severi alla diagnosi, rispetto al 64% dei maschi (11).

Con il termine "idiopatica" viene comunemente definita quella condizione patologica sporadica, caratterizzata da assenza di storia familiare e fattori di rischio identificati (8).

#### **1.1.3.2 sottogruppo 1.2. Ipertensione arteriosa polmonare ereditabile**

La presenza di una componente ereditaria dell'ipertensione arteriosa polmonare è stata riportata in circa il 6-10% dei pazienti (2), la maggior parte dei quali (circa il 70%) (12) è risultata portatrice di mutazioni germinali nel gene codificante il recettore di tipo 2 della proteina morfogenetica dell'osso (*BMPR2*, *bone morphogenetic protein receptor type 2*), un membro della famiglia di *signaling* del TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )

implicato nella modulazione della crescita cellulare vascolare. Più raramente, per lo più in alcuni casi di ipertensione arteriosa polmonare con coesistente telangiectasia emorragica ereditaria, sono state identificate mutazioni nel gene codificante il recettore chinasi di tipo 1 per l'activina (*ALK1, activin receptor-like kinase type 1*), o l'*endoglin*, anch'essi membri della famiglia di *signaling* del TGF- $\beta$  (8). Studi recenti hanno dimostrato la presenza di un quadro clinico di ipertensione arteriosa polmonare molto più severo negli individui portatori di mutazioni nel gene *BMPR2* rispetto ai casi di ipertensione arteriosa polmonare idiopatica senza mutazioni in tale gene (8). L'identificazione di mutazioni nel gene *BMPR2* anche nell'11-40% di quei casi apparentemente idiopatici senza storia familiare (13), ha contribuito a rendere puramente artificiale la distinzione tra mutazioni *BMPR2* idiopatiche e familiari. Tutti i pazienti portatori di mutazioni nel gene *BMPR2* presentano una condizione di ipertensione arteriosa polmonare definita "ereditabile", siano essi i primi casi identificati all'interno delle famiglie e, quindi, portatori di una mutazione *de novo*, oppure appartengano a famiglie con precedenti diagnosi di ipertensione arteriosa polmonare. Da notare rimane inoltre il fatto che nel 30% circa delle famiglie con casi di ipertensione arteriosa polmonare, non sono state identificate mutazioni nel gene *BMPR2* (8). Per questi motivi, nella nuova classificazione clinica di Dana Point, il termine "ipertensione arteriosa polmonare familiare" è stato sostituito con il termine "ipertensione arteriosa polmonare ereditabile".

Le forme ereditabili di ipertensione arteriosa polmonare includono quindi: **ipertensione arteriosa polmonare idiopatica con mutazioni nella linea germinale** (per lo più nel gene *BMPR2* ma anche nei geni *ALK1* o *endoglin*) e **casi familiari con o senza mutazioni germinali identificate**.

L'ipertensione arteriosa polmonare ereditabile (per lo più mutazioni *BMPR2*) è caratterizzata da una modalità di trasmissione autosomica dominante con penetranza incompleta e anticipazione genetica (2): il fenotipo patologico non si manifesta necessariamente in tutte le generazioni e in tutti gli individui portatori della mutazione genetica; la sua espressione risulta tuttavia associata ad una condizione clinica molto severa e a progressione rapida, con un'età di insorgenza particolarmente precoce.

### **1.1.3.3 sottogruppo 1.3. Iipertensione arteriosa polmonare indotta da farmaci o sostanze tossiche**

Attualmente sono stati identificati numerosi fattori di rischio per lo sviluppo dell'ipertensione arteriosa polmonare, intesi come "qualunque fattore o condizione sospettata giocare un ruolo predisponente o facilitante lo sviluppo della patologia. Fattori di rischio potrebbero includere farmaci e chimici, altre condizioni patologiche, o caratteristiche fenotipiche individuali (età, genere)" (8). Sulla base della "forza della loro associazione con l'ipertensione polmonare e il loro probabile ruolo causale", i fattori di rischio sono stati ad oggi categorizzati come: definiti, molto probabili, possibili o improbabili (8). Aminorex e analoghi strutturali quali fenfluramina e dexfenfluramina (farmaci soppressori dell'appetito che incrementano il rilascio della serotonina e ne bloccano il *reuptake*) e l'olio di colza tossico, rappresentano gli unici fattori di rischio "definiti", essendo presenti numerosi studi epidemiologici multicentrici di grandi

dimensioni a dimostrazione della loro associazione con l'ipertensione arteriosa polmonare (7). Studi caso-controllo, a singolo centro hanno definito sostanze quali L-triptofano, amfetamina e metamfetamina (inalata, fumata, orale o intravenosa) fattori di rischio "molto probabili" per lo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare. Fattori di rischio "possibili" (per lo più cocaina, fenilpropanolamina e agenti chemioterapici) sono considerati quegli agenti chimici con meccanismi di azione simili a quelli "definiti" o "probabili" ma non ancora studiati. Contraccettivi orali, estrogeni, fumo di sigaretta rientrano invece nella categoria dei fattori di rischio cosiddetti "improbabili" non essendo per questi stata dimostrata alcuna associazione con l'ipertensione arteriosa polmonare (8).

#### **1.1.3.4 sottogruppo 1.4. Forme associate di ipertensione arteriosa polmonare: ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite (sottogruppo 1.4.4).**

Tra tutte le forme associate a patologie preesistenti, l'ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite (sottogruppo 1.4.4) costituisce una condizione clinica particolarmente importante in ambito cardiocirurgico.

Dati di studi epidemiologici riportano un'incidenza complessiva per le patologie cardiache congenite pari a circa 8 nuovi casi ogni mille nati vivi (14); se non adeguatamente trattati, una significativa proporzione di questi individui con un difetto cardiaco congenito, in particolare nei casi di rilevanti *shunts* sistemico-polmonari, svilupperà un quadro di ipertensione arteriosa polmonare (8). Nei pazienti con *shunt* sistemico-polmonare, infatti, la prolungata esposizione dei vasi polmonari allo *shear stress*, legato all'aumento del flusso ematico e della pressione nel circolo polmonare, sembra costituire uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di una condizione definita di arteriopatia ostruttiva polmonare, con conseguente aumento delle resistenze vascolari polmonari e sviluppo di ipertensione polmonare (2).

Nonostante la scarsa disponibilità di dati epidemiologici, una recente indagine condotta nella popolazione adulta dell'Europa e del Nord-America ha fornito una stima della prevalenza dell'ipertensione arteriosa polmonare associata con *shunts* sistemico-polmonari congeniti: tale prevalenza è risultata compresa nel *range* tra 1.6 e 12.5 casi su un milione di individui dei quali il 25-50% con manifestazione di un quadro clinico più avanzato e severo (sindrome di Eisenmenger) (15). I notevoli progressi ottenuti negli ultimi anni in campo diagnostico e cardiocirurgico hanno reso possibile, nei paesi industrializzati, lo sviluppo e l'applicazione di strategie adeguate ed efficaci per la prevenzione di questo tipo di ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite. Diverse rimangono invece le condizioni dei paesi in via di sviluppo, dove buona parte dei bambini nati con difetti cardiaci congeniti giungono all'età adolescenziale o adulta senza essere sottoposti a correzione cardiocirurgica sviluppando di conseguenza ipertensione polmonare (16).

Il fatto che alcuni bambini con un dato difetto cardiaco congenito sviluppino una patologia vascolare polmonare irreversibile nel primo anno di vita mentre altri, portatori dello stesso difetto, sono in grado di mantenere livelli accettabili di resistenze vascolari polmonari anche per molti anni, indica chiaramente la presenza di una significativa

variabilità biologica nella manifestazione clinica e prognosi dell'ipertensione arteriosa polmonare secondaria a cardiopatia congenita. La recente identificazione di mutazioni nel gene *BMP2* in soggetti con ipertensione arteriosa polmonare secondaria a patologie cardiache congenite suggerisce un possibile contributo della predisposizione genetica nella variabilità biologica osservata in questi pazienti (17). Per tali ragioni, una conoscenza più approfondita del ruolo delle mutazioni genetiche potrebbe essere decisamente utile per la scelta di quei bambini con difetti cardiaci congeniti che dovrebbero essere sottoposti a correzione cardiocirurgia già nella prima infanzia.

Nella classificazione clinica dell'ipertensione polmonare, l'ipertensione polmonare secondaria a cardiopatia congenita è stata inclusa nel primo gruppo: fatta eccezione per la presenza della patologia cardiaca congenita e le condizioni cliniche ad essa associate, questo tipo di ipertensione polmonare sembra condividere infatti la maggior parte delle caratteristiche istopatologiche e patobiologiche dell'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica nonché delle altre forme associate. Sulla base di queste apparenti similarità patobiologiche, alcune strategie terapeutiche dimostrate essere efficaci nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica sono attualmente in fase di valutazione nei pazienti con difetti cardiaci congeniti e ipertensione arteriosa polmonare (2).

Diversi aspetti di questo sottogruppo rimangono tuttavia ancora da chiarire tra cui, in particolare, il ruolo giocato dall'aumentato flusso ematico polmonare nell'eziopatogenesi dell'ipertensione polmonare nei soggetti con cardiopatie congenite a *shunt* sinistro-destro: nonostante l'aumento del flusso polmonare costituisca indubbiamente uno dei principali fattori predisponenti l'insorgenza della patologia, sembra non essere sufficiente come fattore eziopatogenetico esclusivo dell'ipertensione polmonare. Non è ancora chiaro, inoltre, come cardiopatie congenite semplici, associate a *shunt* sinistro-destro pre-tricuspidalico, come ad esempio il difetto interatriale, possano portare a quadri severi di ipertensione polmonare; nel 6% dei difetti interatriali viene infatti descritto lo sviluppo della sindrome di Eisenmenger.

#### **1.1.3.5 Sindrome di Eisenmenger**

Nel momento in cui, per la presenza di uno *shunt* sistemico-polmonare, le resistenze vascolari polmonari giungono ad approssimarsi o addirittura a superare le resistenze vascolari sistemiche, si assiste ad un'inversione dello *shunt* con sviluppo della sindrome di Eisenmenger (18). Tale sindrome rappresenta la forma più avanzata di ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatia congenita ed è definita dall'iniziale presenza di un largo *shunt* sistemico-polmonare responsabile dell'induzione di una patologia vascolare polmonare progressiva e ipertensione arteriosa polmonare con successiva reversione dello *shunt* e cianosi centrale (15). I segni e i sintomi della sindrome di Eisenmenger (dispnea, stanchezza, sincope) derivano dalla presenza di ipertensione polmonare, bassa saturazione di O<sub>2</sub> nel sangue arterioso ed eritrocitosi secondaria. Nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare secondaria a difetti cardiaci congeniti senza reversione dello *shunt*, il grado di cianosi ed eritrocitosi potrebbe essere lieve o moderato (1). Oltre alle tipiche caratteristiche cliniche dell'ipertensione arteriosa polmonare, i pazienti con sindrome di Eisenmenger manifestano ulteriori complicazioni ematologiche

ed emostatiche (emottisi, anomalie di coagulazione), cerebrovascolari, renali, reumatologiche e cardiache dovute allo *shunt* destro-sinistro e alla conseguente ipossemia (1, 2). Per questi individui l'aspettativa di vita risulta complessivamente ridotta, sebbene molti riescano a sopravvivere fino ai 30-40 anni di età e, in alcuni casi, fino a 70 anni (16). Tra i pazienti in attesa di trapianto polmonare (o di cuore-polmone) quelli con sindrome di Eisenmenger sembrano sopravvivere meglio e più a lungo rispetto ai soggetti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica non trattata; un simile miglioramento della sopravvivenza osservato nella sindrome di Eisenmenger potrebbe essere il risultato della preservazione della funzione ventricolare destra: in questi soggetti, infatti, il ventricolo destro sembra non subire alcun rimodellamento dopo la nascita rimanendo comunque ipertrofico (19). La presenza dello *shunt* destro-sinistro, inoltre, contribuisce a sollevare ulteriormente il ventricolo destro dal carico eccessivo con conseguente conservazione dell'*output* cardiaco determinando però in questo modo una condizione di ipossemia e cianosi (1).

#### **1.1.3.5.1 Classificazione clinica degli *shunts* sistemico-polmonari congeniti associati allo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare.**

Pazienti con ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite possono essere meglio caratterizzati con l'aiuto di specifiche classificazioni cliniche (Tab. 3) e anatomo-fisiopatologiche (Tab. 4) degli *shunts* sistemico-polmonari presenti (8, 15).

Tali classificazioni sono state definite sulla base delle seguenti caratteristiche degli *shunts*:

1. **tipo:** sia l'ipertensione arteriosa polmonare che la sindrome di Eisenmenger possono essere il risultato di cardiopatie congenite preesistenti semplici o complesse. Tra i difetti cardiaci semplici, il difetto interventricolare (DIV) sembra essere quello più frequentemente associato allo sviluppo di tali condizioni patologiche, seguito dal difetto interatriale (DIA) e dalla pervietà del dotto di Botallo (20). La frequenza dell'ipertensione arteriosa polmonare associata a difetti semplici pre-tricuspidalici risulta inferiore a quella associata a difetti semplici post-tricuspidalici; secondo quanto riportato da studi recenti, infatti, circa il 50% dei pazienti che svilupperanno patologia vascolare polmonare presenterebbe un largo difetto del setto interventricolare mentre un difetto interatriale sembrerebbe essere presente soltanto nel 10% di questi (2).
2. **dimensione:** un difetto interventricolare < 1 cm e un difetto interatriale < 2 cm vengono definiti "difetti piccoli"; "difetti larghi" risultano associati allo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare con maggiore frequenza rispetto ai "difetti piccoli". Pazienti con difetti del setto interventricolare di piccole o moderate dimensioni sembrano sviluppare patologia vascolare polmonare soltanto nel 3% circa dei casi (2).
3. **direzione dello *shunt***
4. **associazione con altre anomalie cardiache ed extracardiache**
5. **stato di correzione chirurgica:** in alcuni pazienti l'ipertensione arteriosa polmonare insorge in sede post-operatoria, dopo un'efficace procedura chirurgica correttiva o

palliativa. In questi casi le lesioni vascolari polmonari potrebbero già essere presenti prima dell'intervento chirurgico.

**Tabella 3. Classificazione clinica degli *shunts* sistemico-polmonari associati con ipertensione arteriosa polmonare**

**A. Sindrome di Eisenmenger**

Presenza di *shunts* sistemico-polmonari dovuti a larghi difetti, risultanti in un severo aumento delle resistenze vascolari polmonari con conseguente reversione dello *shunt* (polmonare-sistemico) o formazione di uno *shunt* bidirezionale. Sono presenti cianosi, eritrocitosi e interessamento di più organi.

**B. Ipertensione arteriosa polmonare associata con *shunts* sistemico-polmonari**

Presenza di difetti medio-larghi, lieve-moderato aumento delle resistenze vascolari polmonari, *shunt* sistemico-polmonare ancora largamente presente, cianosi non evidenziabile a riposo.

**C. Ipertensione arteriosa polmonare con piccoli difetti**

Presenza di piccoli difetti (diametro effettivo valutato mediante ecocardiografia) e quadro clinico molto simile all'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica.

**D. Ipertensione arteriosa polmonare dopo chirurgia cardiaca correttiva**

Presenza di ipertensione arteriosa polmonare immediatamente dopo la correzione chirurgica del difetto cardiaco congenito o a distanza di molti mesi o anni, in assenza di significative lesioni congenite residue post-operatorie o difetti sviluppatasi in seguito all'operazione.

**Tabella 4. Classificazione anatomo-fisiopatologica degli *shunts* sistemico-polmonari congeniti associati con ipertensione arteriosa polmonare.**

**1. Tipo**

**1.1 *Shunts* pre-tricuspidalici semplici**

- a) difetto interatriale (DIA)
- b) ritorno venoso polmonare anomalo

**1.2 *Shunts* post-tricuspidalici semplici**

- a) difetto interventricolare (DIV)
- b) pervietà del dotto di Botallo

**1.3 Cardiopatie congenite complesse**

- a) difetti atrio-ventricolari
- b) truncus arteriosus
- c) cuore con fisiologia a ventricolo unico senza ostruzione al flusso polmonare
- d) trasposizione delle grosse arterie senza ostruzione al flusso polmonare

**2. Dimensione**

**2.1 Difetti restrittivi**

**2.2 Difetti non restrittivi**

**2.3 Difetti piccoli-moderati: DIV  $\leq$  1 cm, DIA  $\leq$  2 cm**

**2.4 Difetti larghi: DIV  $>$  1 cm, DIA  $>$  2 cm**

**3. Direzione dello *shunt***

**3.1 Prevalentemente sistemico-polmonare**

**3.2 Prevalentemente polmonare-sistemico**

**3.3 Bidirezionale**

**4. Anomalie cardiache ed extracardiache associate**

**5. Stato di correzione chirurgica**

**5.1 Non operato**

**5.2 Intervento chirurgico correttivo**

**5.3 Procedura palliativa**

### **1.1.3.6 Sottogruppo 1.5. Ipertensione arteriosa polmonare pediatrica.**

Le caratteristiche dell'ipertensione polmonare pediatrica, nonché i meccanismi patogenetici di base, si presentano pressoché simili a quelli della forma adulta nonostante, in un bambino in fase di crescita, i polmoni siano ancora in fase di sviluppo. L'esatta incidenza e prevalenza di questa condizione patologica nella popolazione pediatrica non sono attualmente note.

Nei bambini sono state descritte tutte le forme di ipertensione polmonare incluse nella classificazione clinica (Tab. 2), ma la maggior parte di questi pazienti sembra per lo più manifestare le forme idiopatiche/ereditabili o le forme secondarie a cardiopatie congenite preesistenti. Decisamente più bassa risulta invece la prevalenza dell'ipertensione polmonare associata a patologie del tessuto connettivo, ipertensione portale, infezione da HIV, farmaci e sostanze tossiche, mentre pazienti con patologia polmonare cronica della prematurità costituiscono una popolazione crescente (1). Anche l'ipertensione polmonare persistente del neonato è stata classificata all'interno del primo gruppo, nonostante storia naturale e trattamento risultino sostanzialmente diversi rispetto all'ipertensione arteriosa polmonare.

I bambini con ipertensione arteriosa polmonare spesso manifestano un quadro clinico più severo rispetto agli adulti; dispnea, stanchezza e difficoltà nello sviluppo costituiscono i sintomi più comuni. La sincope sembra essere un evento più frequente nei bambini, i quali spesso possono andare incontro a morte improvvisa, addirittura prima della comparsa dello scompenso ventricolare destro (1).

## **1.1.4 Manifestazione clinica, aspetti istopatologici e patobiologici dell'ipertensione arteriosa polmonare**

### **1.1.4.1 Sintomi, segni clinici e principali strategie diagnostiche.**

Un'ampia e approfondita conoscenza dei sintomi e segni clinici, nonché dei principali fattori di rischio associati con lo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare, costituisce un importante elemento per una diagnosi precoce e tempestiva. Attualmente, un tipico quadro clinico di ipertensione polmonare viene spesso riconosciuto e delineato soltanto nelle fasi più avanzate e tardive della patologia, probabilmente a causa di ritardi nella ricerca di consulti medici da parte dei pazienti o dell'incompleta valutazione dei sintomi non specifici associati a tale condizione patologica (21). L'ipertensione polmonare può decisamente complicare il *management* medico o chirurgico delle patologie preesistenti cui risulta frequentemente associata; di conseguenza, il mancato riconoscimento di questa condizione patologica potrebbe condurre ad esiti avversi imprevisti.

I sintomi dell'ipertensione arteriosa polmonare sono molto aspecifici; tuttavia, una sensazione di dispnea sembra costituire il più comune sintomo iniziale (60% dei casi) ed è presente nel 98% dei pazienti al momento della diagnosi (11). Altri disturbi, meno frequenti nelle fasi iniziali, vengono spesso osservati alla diagnosi e includono: stanchezza, debolezza (19% dei casi all'inizio, 73% alla diagnosi), dolore toracico (angina) (7%, 47%), quasi sincope (5%, 41%), sincope (8%, 36%), edema agli arti inferiori (3%, 37%) e palpitazioni (5%, 33%); in alcuni casi è presente anche distensione addominale; la manifestazione dei sintomi a riposo è stata riportata soltanto negli stadi più avanzati della patologia. Il tempo medio stimato dall'insorgenza del primo sintomo alla diagnosi clinica di ipertensione arteriosa polmonare è di circa 2 anni (11). Una grave compromissione della capacità di svolgere attività fisica, sintomi presincopali, sincope o edema agli arti inferiori sono indice di una condizione patologica avanzata e richiedono una valutazione urgente di questi pazienti. Tra i molteplici sintomi aspecifici di ipertensione polmonare la dispnea rimane il più comune e, di conseguenza, può risultare particolarmente importante nella diagnosi: data la frequente associazione ad alterazioni della ventilazione, scambio gassoso, funzione cardiaca, perfusione e rilascio di ossigeno, questo sintomo potrebbe riflettere la presenza di una patologia cardiaca, polmonare o ematologica, *triggers* potenziali per lo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare (21).

I segni fisici dell'ipertensione arteriosa polmonare includono: un'accentuata componente polmonare del secondo suono cardiaco (il segno più comune), sollevamento parasternale sinistro, soffio pansistolico del rigurgito tricuspidalico, soffio diastolico di insufficienza polmonare e un terzo suono ventricolare destro. Segni di distensione della vena giugulare, epatomegalia, edema periferico, ascite ed estremità fredde caratterizzano pazienti in uno stadio patologico più avanzato. I suoni polmonari risultano solitamente normali (1). *Clubbing* o cianosi potrebbero suggerire la presenza di cardiopatia congenita (21).

Il processo di valutazione di un paziente con sospetta ipertensione polmonare richiede tutta una serie di indagini particolari volte a confermare la diagnosi, chiarire il gruppo clinico di ipertensione polmonare nonché l'eziologia specifica all'interno del gruppo

dell'ipertensione arteriosa polmonare e, infine, valutare la compromissione funzionale ed emodinamica (1). Esami clinici specifici si rivelano dunque necessari al fine di determinare la presenza di ipertensione polmonare, le cause o i fattori di rischio associati nonché la gravità della patologia e costituiscono elementi fondamentali nella guida delle decisioni terapeutiche. L'ipertensione polmonare può essere diagnosticata mediante valutazione dei pazienti sintomatici, *screening* dei pazienti definiti "ad alto rischio", oppure casualmente come esito di test clinici ordinati per altri scopi; la diagnosi definitiva richiede tuttavia l'impiego di importanti *tools* diagnostici utilizzati nella pratica di routine:

- **Elettrocardiogramma (ECG):** può fornire indicazioni o supportare l'evidenza di ipertensione polmonare dimostrando l'eventuale ipertrofia e deformazione del ventricolo destro (presenti all'ECG nell'87% dei casi di ipertensione arteriosa polmonare idiopatica) nonché la dilatazione atriale destra. L'assenza di queste caratteristiche non esclude la presenza di ipertensione polmonare né tantomeno di gravi anomalie emodinamiche. L'ECG non presenta sufficienti sensibilità e specificità tali da consentire una diagnosi significativa di ipertensione polmonare. Le aritmie ventricolari sono rare; le aritmie sopraventricolari (per lo più flutter atriale ma anche fibrillazione atriale) possono essere presenti negli stadi più avanzati della patologia (1).
- **Radiografia del torace:** al momento della diagnosi è anomala nel 90% dei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica; può mostrare dilatazione dell'arteria polmonare centrale, perdita dei vasi sanguigni periferici ed eventualmente dilatazione atriale e ventricolare destra (osservate per lo più negli stadi più avanzati) (1).
- **Test di funzionalità polmonare ed emogas arterioso:** possono identificare la concomitante presenza di patologie delle vie aeree o del parenchima polmonare. Pazienti con ipertensione arteriosa polmonare solitamente mostrano diminuita capacità di diffusione polmonare per il monossido di carbonio e da lieve a moderata riduzione dei volumi polmonari. Questi test consentono di identificare l'eventuale ostruzione delle vie aeree periferiche, nonché la tensione arteriosa di ossigeno (normale o solo leggermente più bassa) e di diossido di carbonio (diminuita a causa dell'iperventilazione alveolare) (1).
- **Ecocardiografia:** fornisce numerose variabili che correlano con le emodinamiche del cuore destro (inclusa la pressione arteriosa polmonare); per questo motivo dovrebbe essere sempre eseguita nei casi di sospetta ipertensione polmonare (1). L'ecocardiografia Doppler consente di stimare la pressione sistolica arteriosa polmonare (PASP) e la pressione sistolica ventricolare destra con una precisione particolarmente elevata, simile a quella del cateterismo cardiaco destro, e permette la diagnosi di ipertensione polmonare con una sensibilità del 79-100% e specificità del 60-98% (21). La valutazione della PASP mediante ecocardiografia Doppler durante l'esercizio potrebbe ulteriormente aumentare la sensibilità. L'ecocardiografia consente anche l'identificazione di condizioni patologiche cardiache associate con lo sviluppo di ipertensione polmonare quali, per esempio, disfunzione ventricolare sinistra, patologia valvolare e *shunts* intracardiaci. Nonostante le caratteristiche di elevata sensibilità e non-invasività, le sole informazioni emodinamiche fornite

dall'esame ecocardiografico risultano insufficienti per la diagnosi e il trattamento dell'ipertensione polmonare (21).

- **Valutazione della ventilazione/perfusione polmonare:** costituisce il metodo di elezione per la diagnosi dell'ipertensione polmonare tromboembolica cronica (1).
- **Tomografia computerizzata ad alta risoluzione, tomografia computerizzata con contrasto, angiografia polmonare:** la tomografia computerizzata ad alta risoluzione fornisce immagini dettagliate del parenchima polmonare facilitando quindi la diagnosi di patologia polmonare interstiziale ed enfisema; può rivelarsi particolarmente utile nei casi di sospetta patologia polmonare veno-occlusiva e/o emangiomatosi capillare polmonare. L'angiografia dell'arteria polmonare eseguita mediante tomografia computerizzata con contrasto può fornire importanti informazioni riguardanti lo stato dell'ipertensione polmonare tromboembolica cronica. L'angiografia polmonare tradizionale è tuttora utilizzata in molti centri per la valutazione e il monitoraggio dell'ipertensione polmonare tromboembolica cronica al fine di identificare quei pazienti che potrebbero trarre beneficio dall'endoarterectomia polmonare (1).
- **Risonanza magnetica cardiaca:** rende possibile una valutazione diretta delle dimensioni, morfologia e funzione del ventricolo destro e consente un'analisi non-invasiva del flusso sanguigno, gittata cardiaca, capacità di distensione dell'arteria polmonare e massa ventricolare destra (1).
- **Esami del sangue e immunologia:** i test sierologici sono particolarmente importanti per la diagnosi di concomitanti patologie del tessuto connettivo (per lo più sclerosi sistemica), infezione da HIV ed epatite, condizioni frequentemente associate con lo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare (1).
- **Valutazione addominale con ultrasuoni:** consente l'esclusione di cirrosi epatica e/o ipertensione portale come fattori causali di ipertensione arteriosa polmonare (1).
- **Cateterismo cardiaco destro e vasoreattività:** il cateterismo cardiaco destro è richiesto per confermare la diagnosi di ipertensione arteriosa polmonare, valutare la gravità della compromissione emodinamica e testare la vasoreattività della circolazione polmonare; rimane attualmente il solo metodo di diagnosi definitiva (21). Le variabili registrate mediante cateterismo cardiaco destro sono molteplici: pressione arteriosa polmonare (sistolica, diastolica, media), pressione atriale destra, pressione capillare polmonare, pressione ventricolare destra, output cardiaco, saturazione di ossigeno nel sangue nella circolazione arteriosa sistemica, vena cava superiore e arteria polmonare. In caso di ipertensione arteriosa polmonare il test di vasoreattività dovrebbe essere eseguito durante il cateterismo cardiaco destro al fine di identificare quei pazienti che potrebbero trarre beneficio da una terapia a lungo termine con bloccanti dei canali del calcio. In questo test la capacità di vasodilatazione acuta viene valutata unicamente attraverso l'impiego di sostanze a breve durata d'azione, sicure e facili da somministrare con effetti sistemici limitati (per lo più ossido nitrico). Una risposta positiva al test di vasoreattività acuta è definita da una riduzione della pressione arteriosa polmonare media di più di 10 mmHg fino al raggiungimento di un valore inferiore a 40 mmHg con un *output* cardiaco invariato o aumentato (1).

#### 1.1.4.2 Caratteristiche istopatologiche.

I risultati ottenuti negli ultimi anni dai numerosi studi condotti nel campo della fisiologia, genetica, biologia cellulare e molecolare hanno notevolmente contribuito ad un sostanziale ampliamento delle conoscenze sulle patologie vascolari polmonari ipertensive chiarendo molti aspetti circa la regolazione del tono vascolare polmonare e le risposte al danno vascolare polmonare. Attualmente, le lesioni istopatologiche associate all'ipertensione polmonare, descritte in dettaglio molti anni fa da studi condotti su diversi casi di cardiopatie congenite con *shunt* sinistro-destro (22), hanno assunto un nuovo significato alla luce delle recenti scoperte fisiologiche e di biologia cellulare. I dati istopatologici possono rivelarsi, dal canto loro, particolarmente importanti come guida all'interpretazione delle anomalie cellulari, biochimiche, molecolari identificate con metodi non-morfologici (23).

L'ipertensione polmonare occorre in una moltitudine di situazioni cliniche diverse (Tab. 2) e, per questo motivo, risulta associata ad un largo spettro di anomalie istopatologiche. Dal momento che le varie forme di ipertensione polmonare differiscono non soltanto per l'aspetto istologico ma anche per eziologia e meccanismi patogenetici di base, prognosi e risposta alle terapie, il riconoscimento delle diverse alterazioni istopatologiche caratteristiche può rivelarsi particolarmente importante nella diagnosi differenziale e nella scelta delle strategie terapeutiche più efficaci (23).

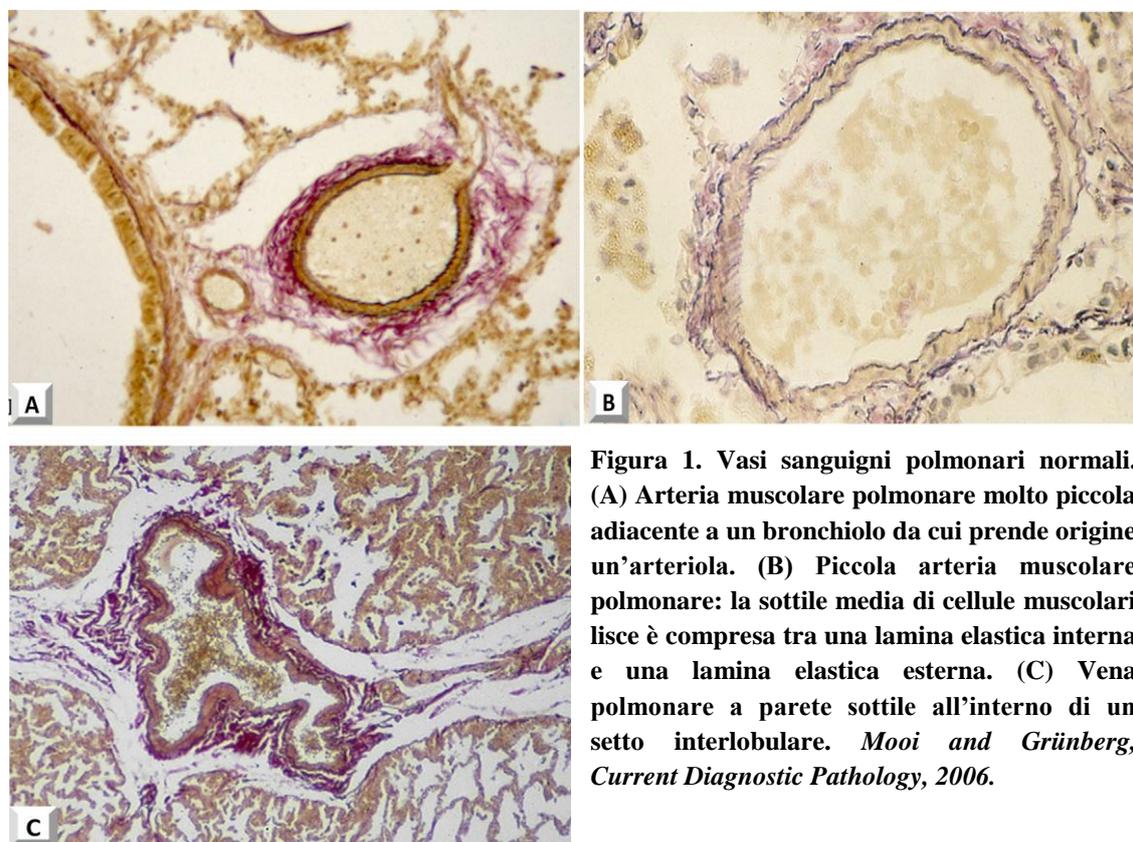
Le tecniche istologiche maggiormente impiegate per lo *staining* tissutale consentono un'appropriata valutazione dei vasi sanguigni polmonari e comprendono la tricromica di Van Gieson (per l'elastina) e lo *staining* con ematossilina/eosina; generalmente vengono esaminate più sezioni seriali (*step sections*) della stessa biopsia polmonare al fine di visualizzare tutte le anomalie focali eventualmente presenti. Vengono spesso eseguiti anche *staining* specifici per il ferro (*staining* di Perls) per l'identificazione di lievi emosiderosi (23).

Una condizione cronica di elevata pressione arteriosa polmonare può determinare l'insorgenza di cambiamenti istologici progressivi, per lo più a carico di alcune arterie e arteriole polmonari; l'insieme di tali modificazioni istologiche costituisce la condizione comunemente definita di **arteriopia plessogenica polmonare**, caratteristica istopatologica dell'ipertensione arteriosa polmonare. Tale "entità morfologica" sembra manifestarsi in due fasi successive (fase precoce: reversibile; fase tardiva: progressiva e irreversibile) (23, 24) mentre gli effetti strutturali associati sono stati suddivisi in 6 gradi progressivi dipendenti da: età, valore di pressione arteriosa polmonare, entità di flusso e resistenze vascolari polmonari; la transizione da un grado all'altro risulta graduale e non sempre ben definita (22).

La prima descrizione dettagliata delle alterazioni istopatologiche dei vasi polmonari è stata prevalentemente eseguita attraverso lo studio di casi clinici di ipertensione arteriosa polmonare secondaria a cardiopatie congenite (principalmente difetti del setto interventricolare); occorre dunque sottolineare che, mentre le modificazioni istologiche più precoci (grado 1) sono parte integrante dell'ampia varietà di alterazioni strutturali e funzionali osservate in presenza di larghi difetti del setto interventricolare, i cambiamenti strutturali successivi (dal grado 2 al grado 6) sono strettamente legati all'aumento della

pressione arteriosa polmonare. Di conseguenza, a differenza delle lesioni di grado 1, tipicamente associate alla presenza di cardiopatie congenite di base, le lesioni dei gradi successivi caratterizzano tutte le forme di ipertensione polmonare, a prescindere dalle diverse eziologie (22).

L'arteriopatia plessogenica polmonare si sviluppa essenzialmente a carico delle piccole arterie polmonari distali (diametro  $<500\ \mu\text{m}$ ), comunemente definite "arterie di resistenza" per la loro capacità di regolazione del flusso sanguigno polmonare (1, 25); le arteriole (diametro  $<100\ \mu\text{m}$ ) (Fig. 1A) e le piccole arterie muscolari polmonari (diametro compreso tra 100 e 300  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 1A e Fig. 1B) sono i vasi prevalentemente affetti (22). Le arterie elastiche (diametro  $>1000\ \mu\text{m}$ ), tra cui le principali arterie polmonari e il tronco arterioso polmonare, possono andare incontro a modificazioni strutturali secondarie, per lo più ispessimento mediale e formazione di placche ateromatose (tipiche lesioni intimali associate ad ipertensione polmonare caratteristiche di queste grandi arterie). Le vene polmonari sono normali e non risultano generalmente coinvolte (22, 24).



**Figura 1. Vasi sanguigni polmonari normali.** (A) Arteria muscolare polmonare molto piccola adiacente a un bronchiolo da cui prende origine un'arteriola. (B) Piccola arteria muscolare polmonare: la sottile media di cellule muscolari lisce è compresa tra una lamina elastica interna e una lamina elastica esterna. (C) Vena polmonare a parete sottile all'interno di un setto interlobulare. *Mooi and Grünberg, Current Diagnostic Pathology, 2006.*

### ***Grado 1. Ipertrofia mediale e regressione dei vasi polmonari al fenotipo fetale.***

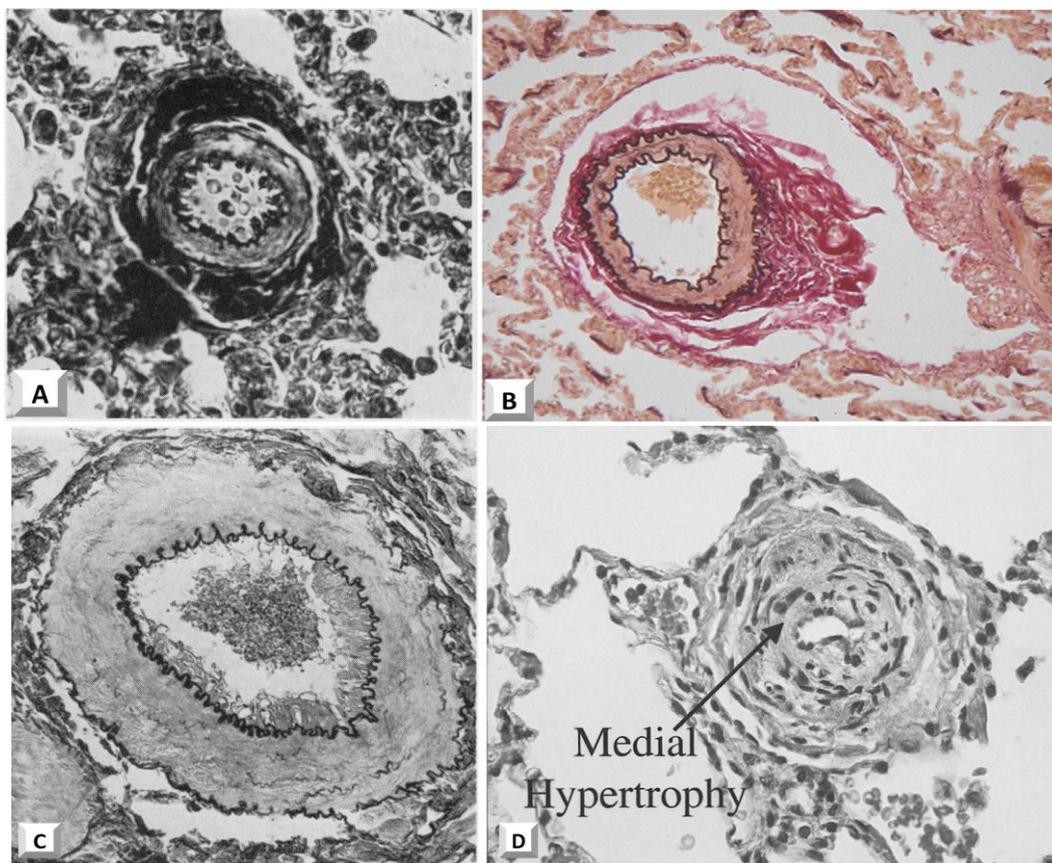
È lo stadio più precoce di arteriopatia plessogenica polmonare; le modificazioni istopatologiche di questo grado sono state osservate soltanto nei casi di larghi difetti del setto interventricolare, pervietà del dotto arterioso e, in generale, in quelle anomalie cardiache congenite determinanti l'esposizione del letto vascolare polmonare alle elevate pressioni sistemiche fin dalla nascita.

In questa fase iniziale, soltanto i tratti delle pareti arteriolari più prossimi ai siti di origine dalle piccole arterie muscolari polmonari, normalmente caratterizzati da una tonaca media

muscolare distinta e compresa tra una lamina elastica interna ed una lamina elastica esterna, presentano un'estensione distale della muscolatura. In questo contesto, anche le arteriole di 30  $\mu\text{m}$  di diametro appaiono simili a piccole arterie muscolari polmonari piuttosto che a vene, non presentano fibrosi intima ma un'avventizia spessa e fibrosa (Fig. 2A); un tale ispessimento delle arteriole rende questi vasi del tutto simili alle arterie polmonari intralobulari fetali.

Le arterie muscolari polmonari risultano caratterizzate da una tonaca media piú spessa, un'intima normale non fibrotica e un'avventizia spessa e fibrosa (Fig. 2B); la tonaca media di questi vasi va incontro a graduale ipertrofia durante la progressione dell'arteriopatia dal grado 1 al grado 3 (Fig. 2C e 2D). In questo stadio non sembra essere presente alcuna relazione tra spessore mediale dei vasi e pressione arteriosa polmonare.

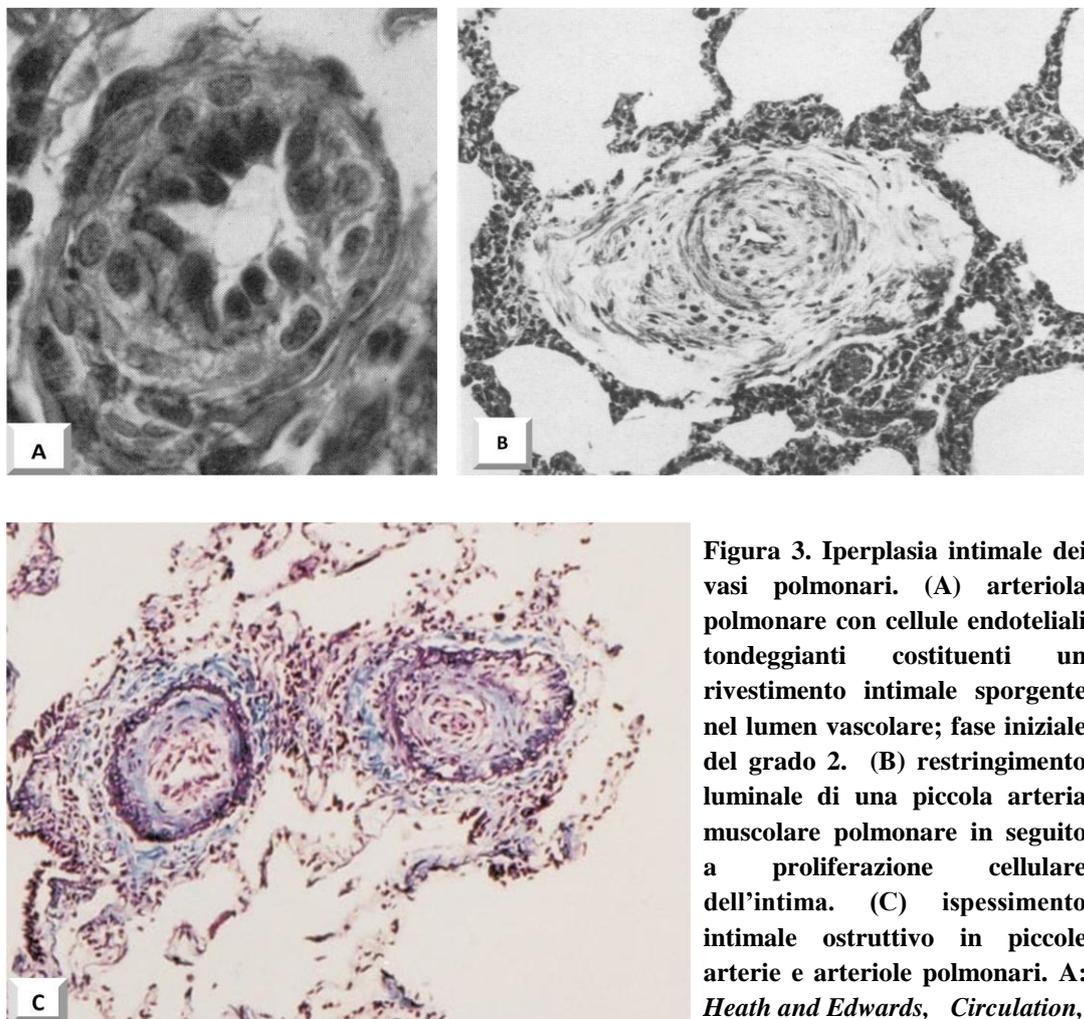
La presenza di un difetto del setto interatriale sembra indurre lo sviluppo di alterazioni istologiche diverse: proliferazione cellulare a livello dell'intima di piccole arterie muscolari e arteriole e fibrosi intima a carico delle vene polmonari (22).



**Figura 2. Ipertrofia mediale dei vasi polmonari. (A)** arteriola polmonare con media muscolare ispessita e lamina elastica interna ed esterna; non si osserva proliferazione intima (grado 1). **(B)** ipertrofia mediale e iniziale ispessimento dell'avventizia di un'arteria muscolare polmonare; fase iniziale e, presumibilmente, reversibile di arteriopatia plessogenica polmonare. **(C)** arteria muscolare polmonare caratterizzata da ipertrofia della media senza reazione intima; aspetto caratteristico del grado 1. **(D)** ipertrofia mediale di una piccola arteria polmonare (ingrandimento 25X). A e C: *Heath and Edwards, Circulation, 1958*. B: *Mooi and Grünberg, Current Diagnostic Pathology, 2006*. D: *Archer and Rich, Circulation, 2000*.

### **Grado 2. Reazione cellulare dell'intima (iperplasia intinale).**

In questa fase le arterie muscolari polmonari più piccole (diametro <300 µm) (Fig. 3B) e le arteriole polmonari (Fig. 3A) mostrano diversi gradi di **iperplasia intinale** fino alla completa occlusione dei vasi nei casi di più marcata proliferazione endoteliale (Fig. 3C). L'iniziale formazione di tessuto fibroso al di sotto dell'endotelio proliferante costituisce lo stadio più precoce del grado 3 (22).



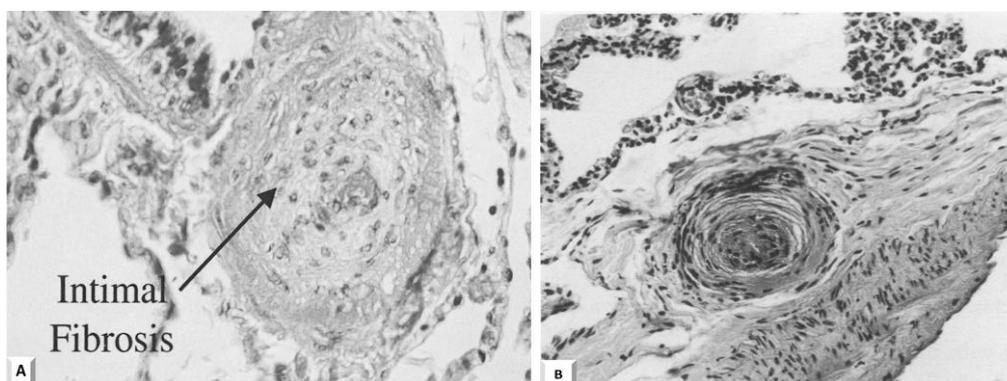
**Figura 3. Iperplasia intinale dei vasi polmonari. (A) arteriola polmonare con cellule endoteliali tondeggianti costituenti un rivestimento intinale sporgente nel lumen vascolare; fase iniziale del grado 2. (B) restringimento luminale di una piccola arteria muscolare polmonare in seguito a proliferazione cellulare dell'intima. (C) ispessimento intinale ostruttivo in piccole arterie e arteriole polmonari. A:**

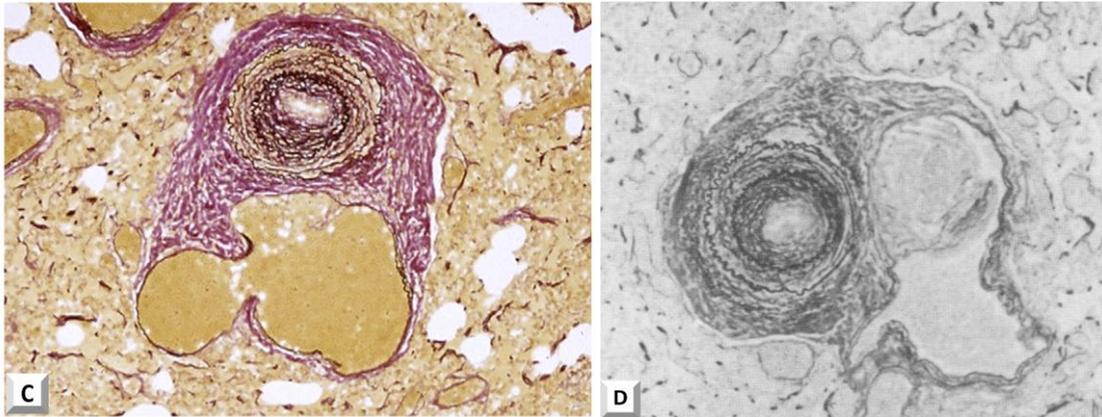
**Heath and Edwards, *Circulation*, 1958 B: Wagenvoort, *Thorax*, 1994 C: Yi et al., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000**

### **Grado 3. Occlusione vascolare fibrosa progressiva.**

Questo grado è caratterizzato da fibrosi intinale progressiva a carico delle piccole arterie muscolari (diametro <300 µm) e arteriole polmonari con un cambiamento nella natura della proliferazione intinale e, soltanto nei casi più severi di ipertensione polmonare, estensione retrograda alle arterie muscolari polmonari di medio calibro (diametro compreso tra 300 e 500 µm). Nelle lesioni precoci di grado 3 si assiste ad un progressivo *switch* della reazione intinale da una proliferazione cellulare prevalentemente endoteliale (grado 2) a una proliferazione degli elementi cellulari costituenti il tessuto fibroso (fibroblasti). Le lesioni intimali tardive appaiono invece caratterizzate da masse

concentriche o eccentriche di tessuto fibroso meno cellulare mentre quelle più vecchie possono presentare addizionali fibrille elastiche intersperse, sottili o, talvolta, anche grossolane. Nelle arterie muscolari le placche intimali fibrotiche sono tendenzialmente distribuite in modo focale anche se, in alcuni casi, si riscontra una continuità tra questi foci di tessuto fibroso intimale e il tessuto fibroso presente nelle arterie muscolari più piccole e nelle arteriole. Le masse concentriche o eccentriche di tessuto fibroso avascolare nelle arterie muscolari e arteriole polmonari determinano un significativo restringimento del lumen vasale risultando talvolta in una completa occlusione dei vasi polmonari interessati (Fig. 4A); nella maggior parte dei casi, tuttavia, rimane quasi sempre pervio un piccolo canale rivestito di endotelio che consente un flusso irregolare. Il quadro istopatologico tipico di questo grado avanzato di arteriopatia plessogenica polmonare risulta dunque caratterizzato da una diffusa occlusione delle arterie muscolari polmonari di diametro inferiore a 500  $\mu\text{m}$  e delle arteriole a causa della presenza di tessuto fibroso acellulare massivo con sottili fibrille elastiche intersperse. Le grosse arterie muscolari (diametro  $>600 \mu\text{m}$ ) raramente mostrano segni di fibrosi intimale anche nei casi di completa occlusione focale delle arteriole e delle arterie di piccolo e medio calibro; in queste arterie e nelle arterie polmonari elastiche, le lesioni ateromatose costituiscono le principali alterazioni, in presenza di ipertensione polmonare severa. In questa fase la tonaca media delle piccole arterie muscolari e arteriole risulta massimamente ipertrofica; nelle arterie muscolari di medio e grosso calibro l'aumento dello spessore mediale sembra essere in parte dovuto allo sviluppo di piccoli fasci longitudinali di muscolatura liscia delimitati da fibrille elastiche e solitamente disposti in stretta apposizione alla lamina elastica interna o esterna. Sebbene la modificazione istologica caratteristica del grado 3 sia costituita essenzialmente dall'ipertrofia mediale, negli stadi più severi e avanzati di questo grado cominciano a comparire aree di assottigliamento mediale, dilatazioni, soprattutto a carico dei vasi pervi e di quelli con zone di occlusione focale (Fig. 4B e 4C); in questo caso, le dilatazioni distali al focus di occlusione fibrotica (per lo più in piccole arterie muscolari e arteriole) potrebbero essere il risultato di una condizione di amiotrofia che si instaura in seguito alla diminuzione della pressione sanguigna distalmente all'occlusione. Le dilatazioni prossimali all'area occlusa, nelle arterie muscolari di medio calibro, sono invece manifestazioni di scompenso vascolare dovuto al marcato aumento della resistenza polmonare (22).





**Figura 4. Fibrosi intimale progressiva e comparsa di dilatazioni vascolari. (A) fibrosi intimale massiva e risultante ostruzione vascolare di una piccola arteria polmonare. (B) restringimento del lumen vascolare di una piccola arteria muscolare polmonare in seguito a fibrosi intimale laminare concentrica (“a buccia di cipolla”). (C) marcata dilatazione di un piccolo vaso arterioso polmonare a parete molto sottile in prossimità dell’arteria di origine caratterizzata da estesa ipertrofia mediale (grado 3 avanzato). (D) arteria muscolare polmonare con marcata fibrosi intimale laminare concentrica; un ramo adiacente, dilatato e privo della normale configurazione elastica parietale, contiene una lesione plessiforme (grado 3 avanzato). A: Archer and Rich, *Circulation*, 2000 B and D: Wagenvoort, *Thorax*, 1994 C: Mooi and Grünberg, *Current Diagnostic Pathology*, 2006.**

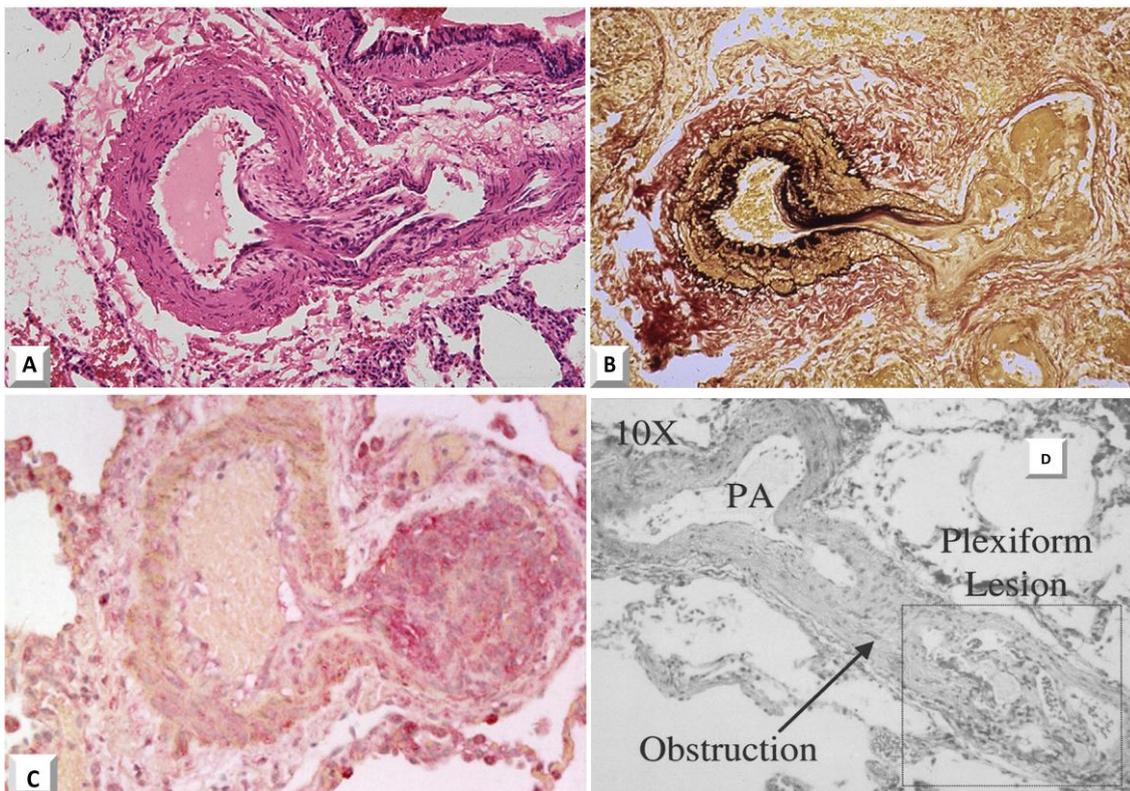
#### ***Grado 4. Dilatazione generalizzata progressiva delle arterie polmonari e comparsa di lesioni plessiformi.***

In questa fase si assiste ad uno *shift* del quadro istologico da una condizione predominante di ipertrofia mediale ad una condizione di progressiva dilatazione generalizzata di tutto il letto vascolare polmonare e formazione di “lesioni complesse” a carico di arteriole e piccole arterie muscolari polmonari. Oltre alla dilatazione generalizzata osservata negli stadi più avanzati del grado 3 (Fig. 4C e 4D) e in tutti i gradi successivi, nelle pareti gravemente dilatate di questi vasi cominciano quindi a comparire delle sacche, simili a microaneurismi, caratterizzate dalla presenza di cellule endoteliali attivamente proliferanti e, talvolta, formazioni trombotiche (lesioni complesse). Le lesioni complesse possono essere distinte in 4 forme principali: lesioni plessiformi, branche simili a vene di arterie muscolari polmonari ipertrofiche e solitamente occluse, lesioni angiomatoidi e lesioni cavernose; le lesioni plessiformi costituiscono il tipo di lesione complessa caratteristica del grado 4 e sono attualmente considerate l’espressione istopatologica principale dell’ipertensione arteriosa polmonare.

Una tipica lesione plessiforme (Fig. 5) si presenta generalmente come una sacca risultante dall’eccessiva distensione della parete di arteriole e piccole arterie muscolari polmonari; le pareti di questa sacca sono piuttosto fragili e consistono di una singola lamina elastica o di uno strato estremamente sottile di muscolatura liscia compreso tra due lamine elastiche non ben definite (22). Piccoli canali delimitati da strati sottili di cellule endoteliali e miofibroblasti (26, 27), costituiscono il corpo di queste lesioni e da esse si dipartono dando origine a capillari delle pareti alveolari. In questi vasi polmonari dilatati i processi di proliferazione endoteliale e trombosi portano generalmente alla formazione di 3 zone ben definite: l’area prossimale della lesione appare caratterizzata dalla presenza di

tessuto fibroso (cellulare nelle lesioni precoci, acellulare nelle lesioni tardive) in continuità con quello presente nell'intima dell'arteria muscolare polmonare dilatata; in quest'area il materiale fibrotico appare organizzato in caratteristici strati concentrici "a cipolla". Nella zona centrale il tessuto endoteliale proliferante spesso assume il caratteristico aspetto plessiforme mentre nell'area distale è frequente la formazione di un trombo, indotta probabilmente dalla proliferazione endoteliale papillifera. Con l'avanzare dell'arteriopatia, le lesioni plessiformi verranno progressivamente invase e sostituite dal materiale fibroso.

Nei gradi più avanzati, molte arterie muscolari e arteriole continuano a mostrare segni di marcata ipertrofia mediale e massiva fibroelastosi intimale.



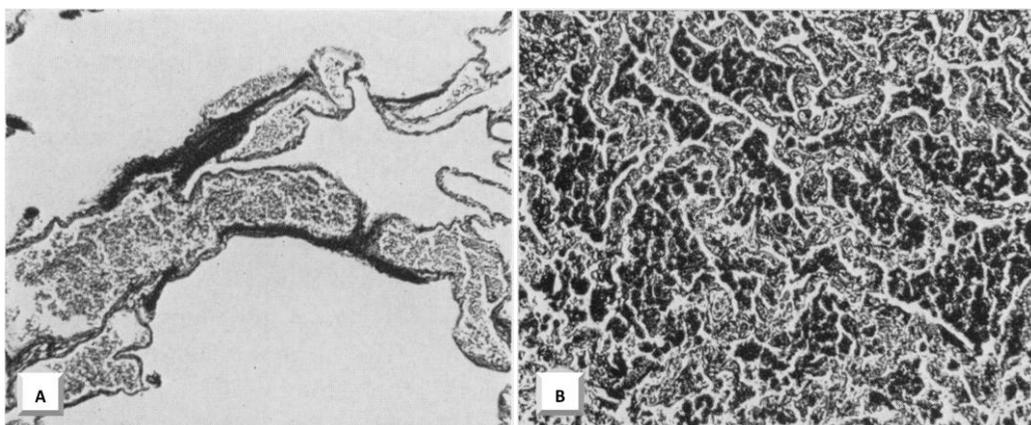
**Figura 5. Lesioni plessiformi.** (A) e (B) piccolo vaso arterioso derivante da un'arteria muscolare polmonare (sinistra) e caratterizzato da fibrosi intimale in corrispondenza e prossimalmente al sito di origine, aumentata cellularità, morfologia irregolare del lumen, alcune formazioni trombotiche murali (B) e marcata dilatazione del lumen nella parte più distale della lesione (destra). (C) lesione plessiforme (rosso) delineata mediante *immunostaining* per VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) con fosfatasi alcalina. (D) tipica lesione plessiforme localizzata appena distalmente all'ostruzione vascolare, come occorre nella maggior parte dei casi; tale posizione potrebbe suggerire una spiegazione circa l'origine dell'angiogenesi in queste lesioni. A, B, C: *Mooi and Grünberg, Current Diagnostic Pathology, 2006* D: *Archer and Rich, Circulation, 2000.*

**Grado 5. Dilatazione cronica con formazione di numerose lesioni complesse e emosiderosi polmonare.**

In questo stadio i vasi polmonari si presentano come tubi rigidi e dilatati e mostrano massiva fibrosi mediale e intimale. La media delle arterie muscolari polmonari e delle

arteriole appare sottile e fibrosa mentre la natura del tessuto fibroso intimale sembra essere per lo più acellulare o, in alcuni casi, ialina.

Comune in questo grado è la presenza di tutti i 4 tipi di lesioni complesse (semplici collaterali simili a vene delle arterie muscolari polmonari ipertensive, lesioni plessiformi, lesioni angiomatoidi, lesioni cavernose) determinanti la formazione di vasi dilatati con pareti sottili, ramificati in tutto il parenchima polmonare, il quale assume così un aspetto altamente vascolarizzato, ricco di vasi particolarmente fragili simili a sinusoidi (Fig. 6A). Caratteristica del grado 5 è la disseminazione di foci di macrofagi contenenti emosiderina in tutto il tessuto polmonare, condizione che sembra instaurarsi in seguito alla diapedesi o allo scoppio dei sinusoidi polmonari (emosiderosi polmonare) (Fig. 6B) (22).



**Figura 6. Vascolarizzazione ed emosiderosi polmonare. (A) sezione trasversale di un polmone raffigurante uno dei numerosi vasi a parete sottile simili a sinusoidi, caratteristici del grado 5. (B) emosiderosi polmonare conseguente a sanguinamento dei sinusoidi polmonari. Heath and Edwards, *Circulation*, 1958.**

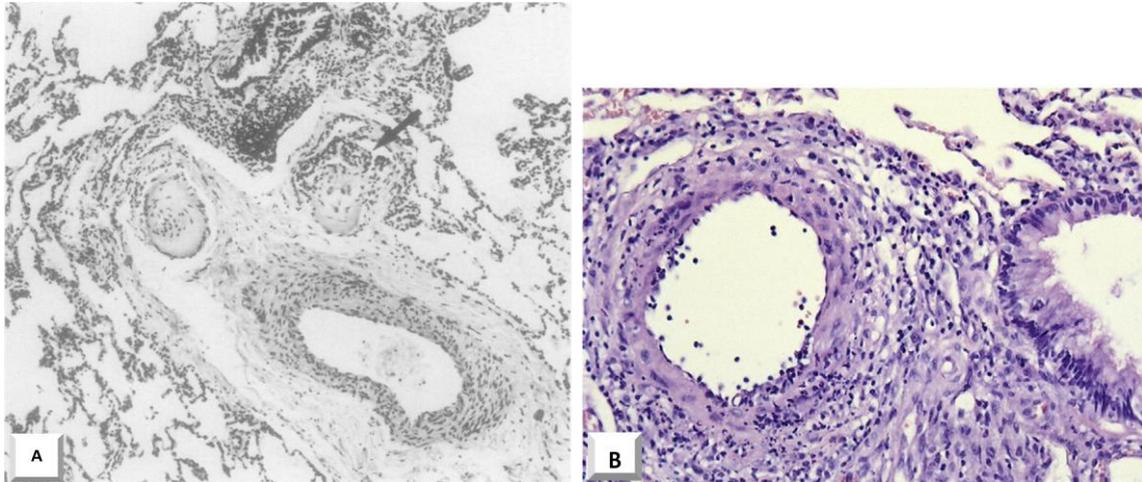
#### ***Grado 6. Arterite necrotizzante.***

Le modificazioni istopatologiche caratteristiche di questo grado costituiscono complessivamente un quadro tipico di arterite necrotizzante e sono state osservate soltanto in pochi casi di ipertensione polmonare idiopatica o associata con stenosi mitralica (22).

Come nel caso della fibrosi intimale e delle lesioni complesse, le giunzioni arteria-arteriola costituiscono i siti preferenzialmente interessati dall'arterite. Nella fase acuta dell'arterite necrotizzante le arterie muscolari polmonari mostrano una completa necrosi fibrinoide della muscolatura liscia (Fig. 7A) e un consistente infiltrato infiammatorio, per lo più costituito da leucociti polimorfonucleati con pochi eosinofili, risulta visibile in tutta l'area circostante le fibrocellule muscolari lisce necrotiche (Fig. 7B).

Molte arterie mostrano invece segni di arterite subacuta con masse di giovane tessuto fibroso cellulare presenti in corrispondenza delle aree muscolari necrotiche con estensioni nell'intima e nell'avventizia; in alcuni casi, possono essere presenti formazioni trombotiche. Il tessuto di granulazione può essere sottile, occupando soltanto un piccolo arco di muscolatura, oppure può talvolta sostituire più di un terzo della media e addirittura l'intero vaso in circostanze eccezionali. Si osserva inoltre un'ampia

ramificazione, in tutto il tessuto fibroso, di tanti piccoli capillari contenenti eritrociti e delimitati da strati di cellule endoteliali proliferanti e voluminose, mentre alcuni vasi dalle pareti altrettanto sottili si dipartono da questo tessuto fino a raggiungere le vecchie fibre di collagene acellulare dell'avventizia (22).



**Figura 7. Arterite necrotizzante. (A) Necrosi fibrinoide in due collaterali di un'arteria muscolare polmonare più grande; la freccia indica la presenza di una lesione plessiforme in fase di sviluppo nella parete di un collaterale. (B) arterite polmonare focale in un caso di arteriopatia plessogenica polmonare avanzata. A: Wagenvoort, *Thorax*, 1994, B: Mooi and Grünberg, *Current Diagnostic Pathology*, 2006.**

#### **1.1.4.3 Aspetti patobiologici.**

L'ipertensione arteriosa polmonare è una condizione patologica risultante da una generale restrizione del flusso sanguigno nella circolazione arteriosa polmonare per effetto del progressivo incremento delle resistenze vascolari polmonari con conseguente aumento della pressione arteriosa polmonare media; se sostenuta nel tempo, tale condizione può portare a scompenso cardiaco destro (28). Similmente a cancro e ad aterosclerosi, l'ipertensione arteriosa polmonare rientra nell'ampia categoria delle patologie complesse, multifattoriali, senza una singola causa precisa; è noto infatti come la patobiologia dell'ipertensione arteriosa polmonare sia estremamente multifattoriale nella sua natura, coinvolgendo vari tipi cellulari differenti e molteplici *pathways* biochimici, molecolari e genetici; rimangono tuttavia poco conosciuti gli esatti processi patogenetici alla base delle modificazioni istopatologiche caratteristiche di questa sindrome (1).

La riduzione o perdita dell'area cross-sezionale del lumen vascolare costituisce la causa principale del marcato incremento delle resistenze vascolari polmonari e sembra risultare dall'interazione di molteplici meccanismi diversi, quali: eccessiva vasocostrizione, infiammazione, trombosi e remodelling ostruttivo della parete dei vasi polmonari principalmente associato ad eccessiva crescita e proliferazione cellulare (ipertrofia e iperplasia) nonché a ridotti tassi di apoptosi.

L'eccessiva vasocostrizione è stata correlata ad anomalie nella funzione o nell'espressione dei canali del potassio nelle cellule muscolari lisce e alla disfunzione endoteliale la quale sembrerebbe essere alla base della ridotta sintesi di molecole con

proprietà vasodilatatorie e antiproliferative (per lo più ossido nitrico e prostaciclina) in favore di un'overespressione di agenti vasocostrittori e proliferativi (trombossano A<sub>2</sub> e endotelina-1). In alcuni pazienti con ipertensione arteriosa polmonare sono stati inoltre detectati ridotti livelli plasmatici anche di altre sostanze ad azione vasodilatatoria e antiproliferativa, come, per esempio, il peptide vasoattivo intestinale.

Lo sbilancio dell'equilibrio tra mediatori vasodilatatori\antiproliferativi e vasocostrittori\proliferativi costituisce un rilevante fattore contributivo sia per l'aumento del tono vascolare (eccessiva vasocostrizione) sia per la promozione del *remodelling* dei vasi polmonari mediante induzione della proliferazione di molteplici tipi cellulari tra cui cellule endoteliali, fibrocellule muscolari lisce e fibroblasti. Conseguentemente, tale squilibrio potrebbe essere coinvolto anche nell'aumentata sintesi dei componenti della matrice extracellulare osservata nei vasi polmonari affetti (collagene, elastina, fibronectina e tenascina).

Anche cellule infiammatorie e piastrine potrebbero giocare un ruolo significativo nell'ipertensione arteriosa polmonare: sono state infatti dimostrate anomalie pro-trombotiche nei pazienti e formazioni trombotiche si osservano frequentemente sia nelle piccole arterie polmonari distali sia nelle arterie polmonari elastiche prossimali (1).

#### **1.1.4.4 Epigenetica, mutazioni somatiche e *triggers* ambientali nell'ipertensione arteriosa polmonare.**

Al di là delle ben note e caratterizzate mutazioni del gene *BMPR2*, il *background* genetico complessivo nonché i determinanti genetici di sopravvivenza e risposta alle terapie nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare continuano a rimanere elusivi; soltanto negli ultimi anni, infatti, la ricerca scientifica ha cominciato a prendere in considerazione il potenziale coinvolgimento delle modificazioni epigenetiche, mutazioni somatiche e co-regolatorie, polimorfismi, modificazioni post-traduzionali e *triggers* ambientali nella patogenesi di questa condizione clinica (29). La bassa penetranza del fenotipo patologico, la presenza di mutazioni nel gene *BMPR2* soltanto nel 12-20% degli individui con ipertensione arteriosa polmonare ereditabile e solo in rari casi di altre forme di ipertensione arteriosa polmonare nonché, infine, una ridotta espressione della proteina *bmpr2* nel tessuto polmonare dei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare, anche in assenza di una mutazione *BMPR2* (30), espressione che sembra diminuire in modo sproporzionato in condizioni di aploinsufficienza del gene *BMPR2* (31), indicano chiaramente il coinvolgimento di altri fattori, genomici o ambientali (*triggers* secondari), nel conferimento del fenotipo clinico ai pazienti suscettibili.

Da un punto di vista puramente genetico, al di fuori del 12-20% degli individui con ipertensione arteriosa polmonare portatori della mutazione nel gene *BMPR2* (il cui ruolo preciso nella patologia vascolare polmonare rimane ancora da definire), molto poco è noto circa la suscettibilità genetica all'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica nonché alle altre forme di ipertensione arteriosa polmonare. Numerosi studi hanno suggerito una possibile relazione tra mutazioni o polimorfismi genetici e caratteristiche cliniche per l'ipertensione arteriosa polmonare, in particolare per le forme associate a sclerodermia, anemia falciforme e ipertensione portale (29); si tratta, tuttavia, di studi di piccole

dimensioni che necessitano quindi di ulteriori validazioni da parte di studi più ampi e indipendenti.

Alcune modificazioni epigenetiche, per lo più modificazioni istoniche, metilazioni del DNA e *imprinting* genotipico, ma anche modificazioni dell'RNA, sembrano giocare un ruolo particolarmente importante nell'ipertensione arteriosa polmonare come potenziali meccanismi di attivazione o inattivazione selettiva di geni coinvolti nel controllo della crescita cellulare, proliferazione e apoptosi. Secondo quanto emerso da dati di studi recenti, modificazioni epigenetiche dei *pathways* di *signaling* della superossido dismutasi di tipo 2 (*SOD2*, *superoxide dismutase-2*) (32), ossido nitrico sintasi endoteliale (*eNOS*, *endothelial nitric oxide synthase*) (33) e *BMPR2* (30), potrebbero essere di importanza critica nello sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare negli individui suscettibili.

Data la notevole somiglianza dell'ipertensione arteriosa polmonare ad una condizione neoplastica, anche le mutazioni somatiche risultano essere di particolare interesse come potenziali *triggers* secondari (29).

Modificazioni dell'RNA, RNA *silencing* e mutazioni patologiche determinanti alterazioni nel *folding* strutturale e conformazionale dell'RNA (34), nonché particolari fattori ambientali come, ad esempio, cambiamenti legati agli estrogeni nell'attività dell'enzima S-nitrosoglutatione reductasi del polmone, possono costituire ulteriori *target* di esplorazione al di là della semplice suscettibilità genetica.

Più recentemente, inoltre, è stata suggerita una potenziale implicazione dei microRNA (miRNA) nell'ipertensione arteriosa polmonare (34). Queste piccole molecole di RNA non codificante sembrano svolgere ruoli importanti nella regolazione dei processi cellulari mediante *binding* specifico a sequenze complementari presenti nelle regioni 3'-UTR degli mRNA (*messenger RNA*) *target*, risultando solitamente in un silenziamento genico. Dati da poco pubblicati hanno dimostrato come, in un modello sperimentale di ipertensione arteriosa polmonare indotta da ipossia, una precoce e pronta risposta della muscolatura liscia dell'arteria polmonare sembra essere *down*-regolata dalla presenza di uno dei principali miRNA regolatori del fenotipo contrattile (35). Tale *down*-regolazione potrebbe determinare uno *shift* verso un comportamento più proliferativo e secretorio contribuendo così al *remodelling* vascolare osservato nell'ipertensione arteriosa polmonare.

La significativa eterogeneità esistente tra i pazienti con ipertensione polmonare (sia in termini di predisposizione genetica e clinica allo sviluppo della patologia sia in termini di risposte cliniche alle terapie disponibili) rende particolarmente difficoltoso lo *screening* per la patologia e, di conseguenza, anche la scelta della terapia più adeguata ed efficace. Una conoscenza più approfondita di questa variabilità, attraverso un'analisi più precisa e completa dei meccanismi genetici (germinali e somatici), epigenetici e post-traduzionali, potrebbe dunque apportare un contributo significativo alla capacità di formulare previsioni decisamente più accurate ed affidabili circa i pazienti che svilupperanno la patologia e risponderanno adeguatamente alla terapia (29).

## 1.2 IL VENTRICOLO DESTRO NELL' IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE

### 1.2.1 Aumento del postcarico, *remodelling* e scompenso ventricolare destro.

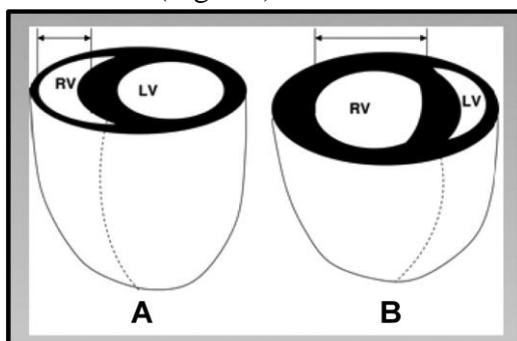
Per ragioni storiche, la letteratura scientifica attualmente disponibile riguardante il ruolo del ventricolo destro in condizioni fisiologiche e patologiche risulta estremamente limitata se confrontata con le numerosissime nozioni acquisite nel corso degli anni sul ventricolo sinistro. La caratteristica parete sottile e poco muscolare, la funzione di pompa sanguigna unicamente “ristretta” ad un singolo organo nonché il minore coinvolgimento, rispetto al ventricolo sinistro, in patologie di proporzioni epidemiche, quali, per esempio, l'ischemia cardiaca, cardiomiopatie o valvulopatie, hanno storicamente portato a considerare il ventricolo destro “un semplice spettatore”, una “vittima” dei processi patologici del sistema cardiovascolare. Per questi motivi, a causa dello scarso interesse rivolto in passato dalla comunità scientifica al ventricolo destro, gli specifici meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nel mantenimento o alterazione della normale funzione ventricolare destra, l'evoluzione strutturale e funzionale della disfunzione ventricolare destra nonché gli strumenti diagnostici e terapeutici più appropriati, rimangono tuttora poco conosciuti (28).

Lo scompenso ventricolare destro costituisce la principale causa di morte nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare; la capacità di adattamento del ventricolo destro al progressivo aumento delle resistenze vascolari polmonari risulta infatti fondamentale nel determinare la capacità funzionale e la sopravvivenza dei pazienti affetti da tale patologia (36). Numerosi studi hanno confermato l'importanza del ventricolo destro nell'ipertensione arteriosa polmonare, identificando un chiaro e significativo valore prognostico in alcuni parametri emodinamici direttamente correlati con la funzione ventricolare destra quali: pressione arteriosa polmonare media, pressione atriale destra, *output* cardiaco e indice cardiaco, valutati principalmente mediante cateterismo cardiaco destro (tecnica “*gold standard*” essenziale per la conferma di ipertensione arteriosa polmonare), ecocardiografia e risonanza magnetica cardiaca. Attualmente, tuttavia, numerosi aspetti riguardanti il ruolo del ventricolo destro nell'ipertensione arteriosa polmonare continuano a rimanere poco chiari (37).

Il ventricolo destro è essenzialmente deputato alla distribuzione del sangue deossigenato ai polmoni, dove avviene lo scambio gassoso, e costituisce un efficace reservoir per il ritorno del sangue al cuore attraverso l'atrio destro, ottimizzando il ritorno venoso e garantendo una perfusione a bassa pressione in tutto il circolo polmonare mediante eiezione pressoché continua del sangue dall'atrio destro ai polmoni. Il ventricolo sinistro, invece, generando un flusso pulsatile ad alta pressione in tutti i vasi arteriosi, risulta caratterizzato da una *compliance* molto più bassa rispetto al ventricolo destro, anatomicamente predisposto alla generazione di una perfusione continua a bassa pressione fino al completo svuotamento della camera ventricolare. In sezione longitudinale, il ventricolo destro si presenta di forma grossolanamente triangolare,

costituito da un tratto di afflusso, un apice muscolare trabecolato e un cono a parete liscia (38); in sezione trasversale la forma della camera ventricolare appare crescente, con una parete libera concava e molto sottile opposta al setto interventricolare convesso, contrariamente al ventricolo sinistro, più spesso e di forma concentrica (Fig. 8A) (36). L'elevata *compliance* e la caratteristica contrazione peristaltica legata alla particolare conformazione anatomica del ventricolo destro, determinano la generazione di un picco pressorio ridotto ma prolungato (39).

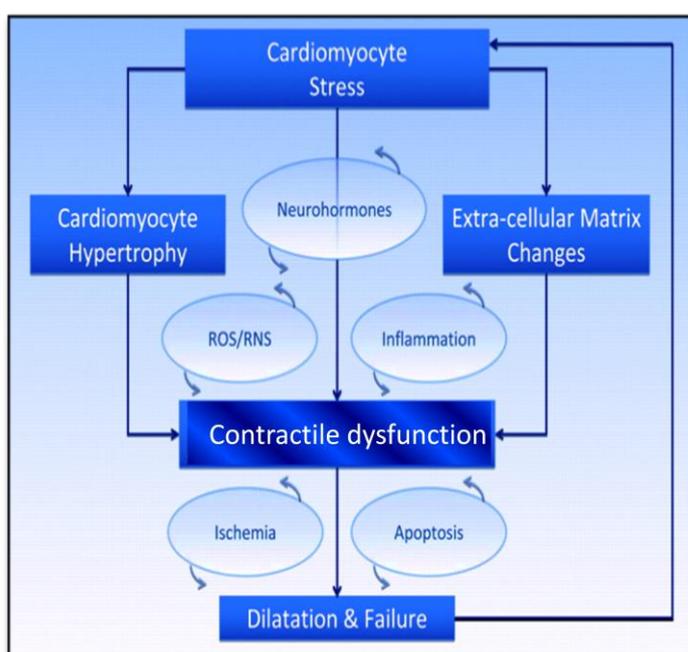
In condizioni di ipertensione arteriosa polmonare, l'aumento del postcarico, principalmente dovuto all'aumento delle resistenze vascolari polmonari e diminuzione della *compliance* vascolare polmonare, determina un progressivo adattamento e *remodelling* del ventricolo destro fino al definitivo scompenso negli stadi patologici più avanzati. In condizioni fisiologiche, la *compliance* elevata del ventricolo destro e l'esistenza di una stretta relazione pressione-volume nel cuore normale consentono un rapido adattamento della camera ventricolare destra al sovraccarico temporaneo di volume e pressione con un aumento della forza contrattile (37). Nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare il ventricolo destro è inizialmente in grado di "fronteggiare" l'elevato postcarico aumentando l'intensità della contrazione sistolica, analogamente a quanto accade in condizioni fisiologiche; in questo stadio, la parete della camera ventricolare destra subisce un *remodelling* di tipo concentrico e si verifica un ripido incremento della pressione arteriosa polmonare media mentre la pressione atriale destra e l'indice cardiaco rimangono normali (37). Dal punto di vista strutturale, in accordo con la legge di Laplace, secondo la quale in una sfera a parete sottile un incremento della pressione intraluminale si traduce in un incremento nello stress di parete senza comportare alcun aumento dello spessore di parete o riduzione del raggio interno, in questa condizione di sovraccarico di pressione, conseguente all'aumento della pressione sistolica e diastolica intraventricolare, il marcato *stretch* meccanico della parete ventricolare destra risulta in un aumento della richiesta di ossigeno nonché in una diminuita perfusione del miocardio con conseguente aumento dello spessore parietale della camera ventricolare destra mediante accumulo di massa muscolare (ipertrofia adattativa); in questa fase precoce il ventricolo destro tende ad assumere una forma più arrotondata (Fig. 8B).



**Figura 8. Configurazione del ventricolo destro in condizioni fisiologiche (A) e nell'ipertensione arteriosa polmonare (B). Nell'ipertensione arteriosa polmonare (B) il ventricolo destro (RV) è caratterizzato da un aumento del volume diastolico, un cambiamento della normale conformazione ventricolare e vari gradi di ipertrofia. Il ventricolo destro nella fase più severa dell'ipertensione arteriosa polmonare assume una forma sferica ed è caratterizzato da un'area cross-sectionale**

più estesa rispetto al ventricolo sinistro (LV), contrariamente a quanto si osserva in condizioni fisiologiche (A). La conformazione sferica del ventricolo destro determina una flessione verso sinistra del setto interventricolare e la conseguente compromissione della performance del ventricolo sinistro. Il grado di dilatazione, ipertrofia e sfericità del ventricolo destro è variabile nei pazienti con disfunzione ventricolare destra ma tutte queste caratteristiche sono presenti nell'ipertensione arteriosa polmonare. *Bozaard HJ et al.. Chest. 2009.*

Il ventricolo destro non è in grado di mantenere la condizione di ipertrofia adattativa a fronte di un prolungato sovraccarico di pressione (Fig. 9); con il tempo, infatti, la forza contrattile tende progressivamente a diminuire (probabilmente a causa di cambiamenti funzionali, strutturali o numerici dei cardiomiociti dovuti, ad esempio, all'attivazione di processi apoptotici) e si assiste ad una graduale dilatazione della camera ventricolare destra (Fig. 8B). Tale dilatazione determina un aumento della tensione di parete e, conseguentemente, un aumento della richiesta di ossigeno da parte dei cardiomiociti ventricolari nonché una simultanea riduzione della perfusione del miocardio ventricolare destro; si instaura così un circolo vizioso risultante in un'ulteriore compromissione della contrattilità e conseguente ulteriore dilatazione (Fig. 9) (40). In questa fase la contrattilità ventricolare destra rimane invariata nonostante si possano verificare ulteriori aumenti del carico pressorio; in questa fase il ventricolo destro appare dunque "disaccoppiato" (37). Un aumento del volume ventricolare potrebbe inoltre essere causa di trazione cordale e dilatazione anulare della valvola tricuspide con conseguente rigurgito tricuspidalico funzionale e sovraccarico di volume del ventricolo destro; ciò comporterebbe un'ulteriore dilatazione anulare progressiva e ulteriore *remodelling* ventricolare destro (41). Il declino della funzione ventricolare destra si traduce in un graduale aumento del tempo di contrazione, con conseguente asincronia ventricolare, e in una diminuzione della gittata sistolica ventricolare destra; si determina così un riempimento incompleto del ventricolo sinistro. Il riempimento della camera ventricolare sinistra è inoltre compromesso dalla progressiva flessione del setto interventricolare verso sinistra a causa del prolungato tempo di contrazione del ventricolo destro (Fig. 8B); tale incurvatura del setto interventricolare riduce drasticamente il volume diastolico del ventricolo sinistro contribuendo così alla marcata diminuzione della gittata cardiaca osservata nell'ipertensione arteriosa polmonare severa (42). Il declino della funzione ventricolare destra porta dunque all'instaurazione di un circolo vizioso di eventi che, se non interrotti, culminano nello scompenso cardiaco destro (37) (Fig. 9).



**Figura 9. Ipotetici meccanismi patobiologici coinvolti nello sviluppo dello scompenso cardiaco destro nell'ipertensione polmonare. In questa condizione patologica lo stress dei cardiomiociti sembra essere principalmente causato dal marcato aumento delle resistenze vascolari polmonari. Differenti *loops* di amplificazione e *remodeling* portano quindi all'insorgenza della disfunzione contrattile, dilatazione e scompenso ventricolare destro sottoponendo così ad ulteriore stress i cardiomiociti rimasti con un meccanismo di amplificazione a *feedback* positivo. Bogaard HJ et al., Chest, 2009.**

### **1.2.2 Aspetti patobiologici del *remodelling* strutturale e scompenso ventricolare destro nell'ipertensione arteriosa polmonare (aumento del postcarico, sovraccarico di pressione).**

Nell'ipertensione arteriosa polmonare la progressione e il mantenimento a lungo termine dell'ostruzione microvascolare polmonare impone al ventricolo destro un carico pressorio sempre più elevato; è proprio la risposta del ventricolo destro ad un tale incremento del postcarico che principalmente determina l'*outcome*, positivo o negativo, dei pazienti. Molto poco è noto circa l'evoluzione strutturale e funzionale della disfunzione ventricolare destra nell'ipertensione arteriosa polmonare, i meccanismi molecolari e cellulari determinanti o gli interventi diretti che potrebbero preservare la funzione ventricolare destra (40).

Il marcato incremento nella massa muscolare della parete ventricolare destra, osservato inizialmente nell'ipertensione arteriosa polmonare in seguito all'aumento del postcarico, rappresenta il risultato finale di una progressiva *up*-regolazione dei processi intracellulari di sintesi proteica con conseguente aumento delle dimensioni dei cardiomiociti in seguito all'aggiunta di sarcomeri (ipertrofia adattativa) (40). Nonostante sia stata recentemente dimostrata l'esistenza di cellule progenitrici cardiache in attiva proliferazione (43) nonché l'influsso di cellule progenitrici derivate dal midollo osseo in grado di differenziare in cardiomiociti (44), lo specifico contributo di queste cellule al *remodelling* e adattamento del ventricolo destro al sovraccarico di pressione non è ancora stato chiarito. La sintesi proteica nei cardiomiociti sembra essere direttamente indotta dallo *stretch* di parete e amplificata da stimoli autocrini, paracrini e neurormonali (come, per esempio, attivazione del sistema renina-angiotensina e sistema simpatico), mentre integrine e canali ionici attivati dagli stress meccanici fungono da sensori (recettori di stress) dell'aumentato postcarico nelle cellule cardiache (cardiomiociti, fibroblasti, cellule endoteliali) mediante interazione diretta con la matrice extracellulare e successiva trasduzione dello stress meccanico in segnali chimici intracellulari risultanti nella sintesi *de novo* di proteine contrattili e molecole per il *signaling* autocrino e paracrino (40).

Anche la sintesi di nuova matrice extracellulare e la formazione di nuovi vasi sanguigni di supporto (angiogenesi) sembrano giocare un ruolo importante nei processi di crescita e proliferazione dei cardiomiociti indotti da *overload* di pressione nell'ipertensione arteriosa polmonare; la matrice extracellulare cardiaca è principalmente costituita da collagene con piccole quantità di fibronectina, laminina ed elastina ed è organizzata in un intricato *network* di fibre collageniche che supportano, raggruppano e interconnettono tra loro singoli cardiomiociti, miofibrille, fibre e fasci muscolari; data la stretta prossimità all'apparato contrattile, tale matrice sembra dunque avere effetti importanti sulla funzione diastolica e sistolica così come sulla dimensione e forma ventricolare (40).

I meccanismi patobiologici alla base dell'incapacità di adattamento della parete ventricolare destra all'ulteriore incremento del carico pressorio e della successiva transizione dalla condizione di ipertrofia adattativa alla dilatazione, osservata negli stadi più avanzati dell'ipertensione arteriosa polmonare, non sono ancora stati ben definiti. Attualmente, inoltre, non è chiaro in che modo i meccanismi molecolari coinvolti nel

*remodelling* vascolare polmonare caratteristico della condizione di ipertensione arteriosa polmonare possano anche essere causa di disfunzione miocardica; gli scarsi dati disponibili riguardanti lo scompenso cardiaco destro associato con l'ipertensione arteriosa polmonare sono per lo più derivati da differenti modelli animali di sovraccarico di pressione del ventricolo destro, ognuno con le proprie limitazioni (37, 40).

Lo sbilancio tra richiesta e apporto di ossigeno al miocardio ventricolare destro, risultante dal marcato stress meccanico a carico della parete e dalla conseguente riduzione della perfusione miocardica, sembra giocare un ruolo importante nella progressiva perdita della capacità di adattamento e successiva dilatazione del ventricolo destro favorendo l'insorgenza di una complessa serie di cambiamenti nei cardiomiociti e nella loro matrice extracellulare (40). Altri fattori potrebbero essere inoltre coinvolti nella progressiva diminuzione della contrattilità e nella determinazione dello scompenso ventricolare destro nell'ipertensione arteriosa polmonare avanzata; questi fattori includono: un'attivazione cronica del sistema nervoso simpatico (45) con alterato *signaling* neuromonale, un'incontrastata formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), un'esagerata attivazione della risposta infiammatoria e l'attivazione di processi apoptotici nei cardiomiociti (40).

Il sovraccarico di pressione prolungato sembra di per sé essere sufficiente ad indurre la transizione dalla condizione di ipertrofia adattativa all'ipertrofia "maladattativa" e scompenso cardiaco; in che modo, però, lo sviluppo di scompenso cardiaco destro associato alla condizione di ipertensione arteriosa polmonare sia modificato dall'attivazione neuromonale, stress ossidativo e nitrosativo, attivazione del sistema immunitario, ischemia miocardica e apoptosi dei cardiomiociti rimane largamente sconosciuto (40).

### 1.3. ASPETTI MOLECOLARI DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE

#### 1.3.1 Remodelling vascolare polmonare e cardiaco da sovraccarico emodinamico.

Il *remodeling* delle piccole arterie polmonari, seguito dal *remodeling* della parete ventricolare destra in condizioni di sovraccarico emodinamico prolungato, rappresenta la principale caratteristica patologica associata all'ipertensione arteriosa polmonare; in questa condizione, infatti, la **marcata proliferazione** delle cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari determina un progressivo restringimento del *lumen* delle arterie polmonari di resistenza con conseguente incremento delle resistenze vascolari polmonari e del carico emodinamico. Il *remodeling* vascolare polmonare è caratterizzato dall'ispessimento di tutti e tre gli strati della parete vasale (tonaca avventizia, media e intima), principalmente dovuto alla **crescita cellulare ipertrofica e/o iperplasica** del tipo cellulare predominante all'interno di ogni *layer* (fibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule endoteliali, rispettivamente) (46). In condizioni fisiologiche le cellule muscolari lisce vascolari consentono il mantenimento della struttura e funzione dei vasi sanguigni e sono costantemente esposte a stress e tensioni di tipo meccanico, deformazioni, stiramenti ciclici causati dalla pressione sanguigna; risposte ipertrofiche, iperplastiche e migratorie eccessive di queste cellule si riscontrano tuttavia in condizioni di sovraccarico emodinamico prolungato (47). Normalmente, le cellule muscolari lisce vascolari adulte mostrano un fenotipo contrattile e non particolarmente responsivo a fattori di crescita o molecole regolatrici della proliferazione e migrazione cellulare; tuttavia, in risposta ad alterazioni del normale stress meccanico, si assiste ad un progressivo *switch* fenotipico di queste cellule da adulto a fetale, caratterizzato da una graduale scomparsa di numerose proteine contrattili caratteristiche delle pareti vascolari adulte, quali isoforme della catena pesante della miosina del muscolo liscio (MHC),  $\alpha$ -actina del muscolo liscio, h-caldesmon e calponina, in favore di una ri-espressione di proteine tipicamente presenti nelle pareti vascolari fetali (es: catena pesante della miosina non-muscolare). Questo *switch* determina dunque una consistente riorganizzazione strutturale delle cellule muscolari lisce vascolari verso un "fenotipo sintetico" caratterizzato da perdita dei miofilamenti e formazione di un esteso reticolo endoplasmatico nonché di un largo apparato di Golgi. In tal modo, le cellule muscolari lisce vascolari perdono la loro capacità di contrarsi, incrementano la sintesi proteica e diventano più responsive a fattori di crescita prodotti con meccanismi autocrini e paracrini dalle stesse cellule muscolari lisce mediali in risposta all'aumentato stress meccanico (alta pressione sanguigna), il quale ulteriormente stimola la crescita ipertrofica delle cellule muscolari lisce mediali e/o l'iperplasia intimale delle pareti vascolari con conseguente incremento ulteriore delle resistenze vascolari polmonari (47).

Nell'ipertensione arteriosa polmonare il sovraccarico emodinamico prolungato induce un progressivo *remodelling* della parete ventricolare destra con un'iniziale crescita ipertrofica dei cardiomiociti fino allo scompenso ventricolare nelle fasi più avanzate della

patologia. L'ipertrofia cardiaca costituisce la risposta primaria del cuore al sovraccarico di lavoro in quanto consente, almeno inizialmente, di potenziare la funzione contrattile (ipertrofia adattativa, fisiologica); in questa fase l'accrescimento della massa muscolare cardiaca riduce l'elevato stress della parete ventricolare e/o compensa l'incremento della domanda emodinamica (48, 49). Stimoli patologici, quali per esempio l'ipertensione arteriosa polmonare e il sovraccarico emodinamico prolungato, possono tuttavia indurre lo sviluppo di fibrosi interstiziale e la ri-espressione di un programma genico fetale (*switch* fenotipico, come per il *remodeling* delle pareti vascolari polmonari) con conseguente rigidità miocardica e riduzione dell'*output* cardiaco (ipertrofia "maladattativa", patologica). Questo tipo di ipertrofia cardiaca predispone all'insorgenza di aritmie, scompenso cardiaco e morte cardiaca improvvisa; gli esatti meccanismi molecolari responsabili della transizione da ipertrofia adattativa a ipertrofia "maladattativa" non sono ancora del tutto noti (48).

I cardiomiociti ipertrofici risultano caratterizzati da specifici cambiamenti rispetto alle condizioni normali: rapida induzione di proto-oncogeni e geni per alcune proteine *heat shock* (geni "immediati-precoci"), alterazioni quantitative e qualitative dell'espressione genica e aumento della sintesi proteica (49).

L'induzione di geni "immediati-precoci" tra cui proto-oncogeni (tipicamente *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*) e geni per alcune *heat shock proteins* (per lo più *hsp70*) costituisce dunque la prima risposta dei cardiomiociti della parete ventricolare destra all'*overload* emodinamico (49). Successivamente si assiste ad una modulazione qualitativa o quantitativa dell'espressione di molti geni: come per le cellule muscolari lisce vascolari, l'espressione di geni codificanti proteine del sarcomero adulto viene progressivamente ridotta e sostituita dall'espressione delle relative isoforme proteiche fetali (es: transizione  $\alpha$ -actina cardiaca  $\rightarrow$   $\alpha$ -actina scheletrica e transizione isoforma  $\alpha \rightarrow \beta$  della catena pesante della miosina); anche il peptide natriuretico atriale (ANP), la cui espressione risulta normalmente ristretta negli atri soltanto per un breve periodo dopo la nascita, viene ri-espresso nei ventricoli in risposta al sovraccarico emodinamico (49). I cuori ipertrofici appaiono inoltre caratterizzati da *over*-espressione di geni pro-ipertrofici e down-regolazione di numerosi geni codificanti proteine di membrana (es: gene per la pompa  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico, SERCA) (49). Uno stress meccanico ripetuto e persistente determina dunque a lungo termine alterazioni dell'espressione genica cardiaca promuovendo ulteriormente il *remodeling* cellulare e dell'intero organo (50).

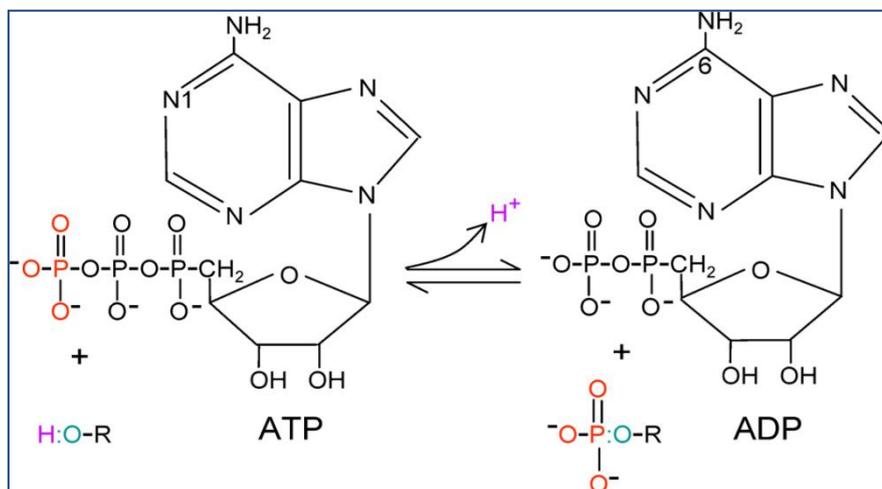
### **1.3.2 MAPKs e ruolo del *signaling* ERK1/2 (Ras-Raf-MEK-ERK *signal transduction cascade*) nel *remodelling* vascolare polmonare e cardiaco da sovraccarico emodinamico.**

ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2*) appartengono ad una famiglia di proteine idrofiliche non recettoriali ubiquitariamente espresse e partecipano alla cascata Ras-Raf-MEK-ERK di trasduzione del segnale, talvolta definita "*MAPK cascade*", cascata delle MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) (51).

Nei mammiferi le MAP chinasi costituiscono un gruppo di serina/treonina protein-chinasi citoplasmatiche coinvolte nella trasduzione di segnali extracellulari e, talvolta intracellulari, dalla superficie verso l'interno della cellula, risultando in un quadro complessivo di alterazioni finemente controllate dell'espressione genica e dei processi cellulari (52).

Le protein-chinasi giocano un importantissimo ruolo regolatorio in quasi tutti gli aspetti della biologia cellulare; nell'uomo la famiglia delle protein-chinasi comprende 518 geni, circa l'1,7% dell'intero genoma, e risulta pertanto una delle più grandi famiglie geniche (53). Le protein-chinasi catalizzano il trasferimento del gruppo  $\gamma$ - $\text{PO}_3^{2-}$  ( $\gamma$ -fosforilico) dall'ATP al gruppo OH (idrossilico) del substrato proteico (Fig. 10); sulla base della natura del gruppo OH fosforilato queste proteine vengono classificate come serina/treonina protein-chinasi (385 membri), tirosina protein-chinasi (90 membri) e proteine simil-tirosin chinasiche (43 membri) (53); si conoscono inoltre ben 106 pseudogeni di protein-chinasi. Un piccolo gruppo di chinasi doppiamente specifiche, tra cui MEK1/2, catalizza la fosforilazione ad entrambi i residui di tirosina e treonina delle proteine *target*, quali, per esempio, ERK1/2; tali chinasi appartengono alla famiglia delle protein-chinasi serina/treonina (52).

La fosforilazione proteica rappresenta la classe più ampiamente diffusa tra tutte le classi di modificazioni post-traduzionali utilizzate nella trasduzione del segnale; la presenza di famiglie di protein-fosfatasi che catalizzano la defosforilazione di substrati proteici contribuisce a rendere il processo di fosforilazione-defosforilazione un processo complessivamente reversibile (52).

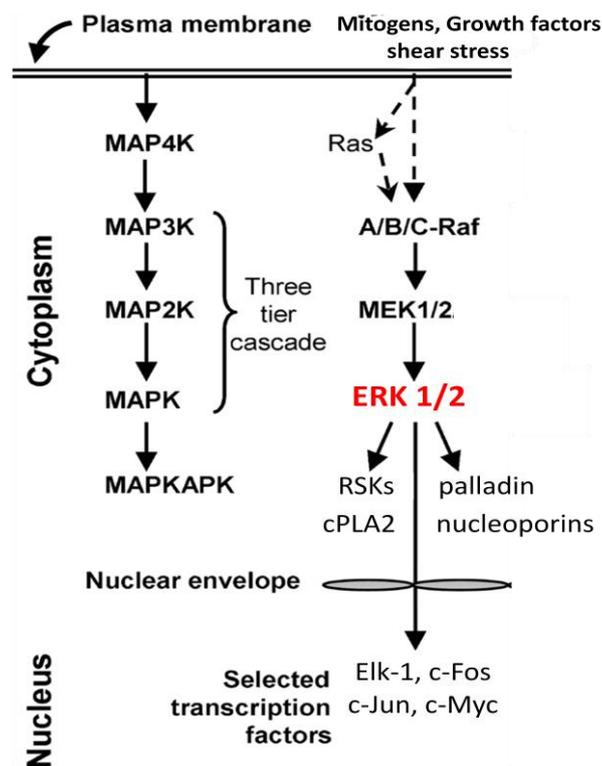


**Figura 10. Reazione di fosforilazione proteica catalizzata dalle protein-chinasi. La reazione protein-chinasi implica il trasferimento del gruppo  $\gamma$ -fosforilico (in rosso) dall'ATP al gruppo idrossilico del substrato proteico (OH-R). Roskoski Jr. *Pharmacological Research*, 2012.**

Il gruppo delle MAPKs comprende la famiglia di ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), p38 chinasi e la famiglia di JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*, anche nota come SAPK, *Stress-Activated Protein Kinase*); sono state descritte 8 isoforme enzimatiche di ERK (ERK1-ERK8), 4 isoforme di p38 MAPK (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ) e 3 isoforme per JNK

(JNK1-JNK3) (54). La trasduzione del segnale ad opera delle cascate MAP chinasiche ha generalmente inizio in seguito all'attivazione di piccole proteine G cui segue un'attivazione "a cascata" di protein-chinasi agenti in modo sequenziale. Ogni cascata di *signaling* delle MAP chinasi è costituita da almeno 3 livelli di chinasi determinanti un intricato *network* di amplificazione del segnale basato sui processi di fosforilazione proteica: le MAPKKKs (MAP3Ks) ricevono gli input di attivazione dalle proteine G associate alla membrana cellulare e attivano a loro volta le MAPKKs (MAP2Ks) le quali fosforilano e attivano infine le MAPKs (Fig. 11) (52, 55). Le MAP chinasi attivate catalizzano la fosforilazione di numerosi substrati proteici quali fattori di trascrizione, altre protein-chinasi e protein-fosfatasi e altre proteine funzionali (52).

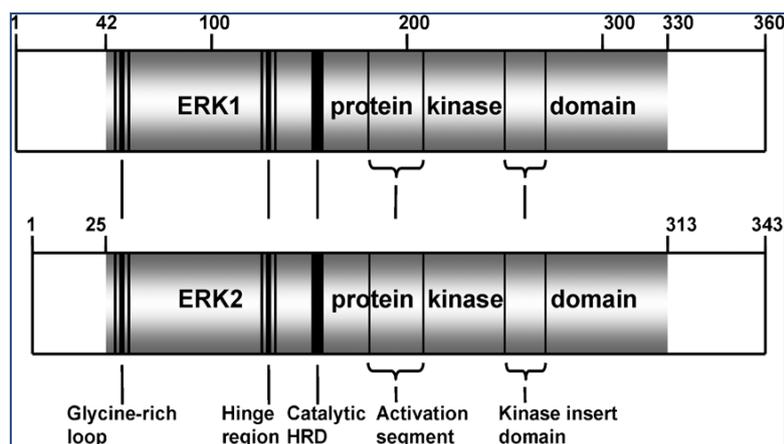
Le vie di *signaling* mediate dalle MAPK p38 e JNK sono generalmente attivate da citochine pro-infiammatorie (per lo più TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) o in risposta a stress cellulari di natura genotossica, osmotica, ipossica o ossidativa; in particolare, la famiglia della p38 MAPK sembra giocare un ruolo importante nell'angiogenesi, proliferazione cellulare, infiammazione e produzione di citochine, mentre la famiglia JNK sembra prendere parte ai processi apoptotici e allo sviluppo di molteplici tipi cellulari del sistema immunitario (52).



**Figura 11.** Cascata di *signaling* delle MAP chinasi. ERK1/2 catalizzano la fosforilazione di dozzine di proteine citosoliche e di numerosi fattori di trascrizione nucleari. Immagine adattata da Roskoski Jr. *Pharmacological Research*, 2012.

Le isoforme enzimatiche umane di ERK1 e ERK2 mostrano l'84% di identità nella sequenza aminoacidica e condividono numerose funzioni (se non addirittura tutte) (56); nell'uomo ERK2, è stata maggiormente studiata rispetto ad ERK1 e risulta costituita da 360 residui aminoacidici (358 in ratto e topo), mentre ERK1 presenta una sequenza aminoacidica di 379 residui (380 in ratto e topo); si riscontrano più differenze nelle sequenze di ERK1 e ERK2 all'interno di una data specie rispetto alle singole isoforme (ERK1 o ERK2) considerate separatamente tra specie differenti (52). Come per la maggior parte delle protein-chinasi, dal punto di vista strutturale entrambe le varianti risultano caratterizzate da specifiche estensioni aminoacidiche all'N- e al C-terminale conferenti la specificità di *signaling*: rispetto ad ERK2, ERK1 contiene un'inserzione di 17 residui aminoacidici all'estremità N-terminale (Fig. 12), mentre una caratteristica inserzione di 31 residui aminoacidici entro il dominio chinasi di entrambe le isoforme (*kinase insert domain*) contribuisce all'ulteriore specificità funzionale (52).

Tutti i fattori cellulari attualmente noti stimolare l'attivazione del *pathway* di ERK1/2 portano ad un'attivazione parallela di entrambe le isoforme enzimatiche (52), tuttavia rimane ancora da definire se tali varianti condividano esattamente le stesse funzioni o se esistano funzioni specifiche differenti per ciascuna di esse; secondo i risultati di studi recenti, in alcune fasi della vita di un animale ERK1 o ERK2 potrebbero svolgere funzioni uniche, specifiche per quell'isoforma: a fronte di studi sperimentali in favore della similarità funzionale delle due isoforme legata all'identica specificità di substrato *in vitro* (57), altri studi condotti *in vivo* sembrano invece smentire la ridondanza funzionale dimostrando come l'ablazione del gene *erk2* risulti letale durante lo sviluppo embrionale dei topi, incapaci di formare il mesoderma e la vascolatura placentale, mentre i topi *knockout* per il gene *erk1* rimangono vitali, fertili e di dimensioni normali con la sola compromissione dello sviluppo dei timociti (58). L'identificazione delle funzioni distinte di ERK1 e 2 nelle precise fasi della vita degli animali rimarrà tuttavia sempre difficile da determinare.



**Figura 12.** Architettura di ERK1 e ERK2 umane. I numeri corrispondono ai residui aminoacidici. *Roskoski Jr. Pharmacological Research, 2012.*

In condizioni fisiologiche la cascata di trasduzione del segnale Ras-Raf-MEK-ERK svolge un importante ruolo nella regolazione di una larga varietà di processi cellulari,

quali: **adesione cellulare**, **progressione del ciclo cellulare**, **migrazione cellulare**, **sopravvivenza cellulare**, **differenziamento**, **metabolismo**, **proliferazione e trascrizione genica** (52). Alterazioni di tale *pathway* sono state riscontrate in una moltitudine di condizioni patologiche, come, per esempio, lesioni cerebrali, ipertrofia cardiaca, diabete e infiammazione; il *signaling* Ras-Raf-MEK-ERK risulta inoltre *up*-regolato in una larga proporzione di tumori umani anche in assenza di mutazioni oncogeniche, sebbene i geni RAS siano attivati in circa il 30% di tutti i cancro umani e mutazioni attivanti in RAF siano presenti nel 7% dei tumori (52).

Numerosi studi hanno inoltre dimostrato come un'eccessiva *up*-regolazione delle cascate MAP chinasiche (in particolare del *pathway* Ras-Raf-MEK-ERK) corredi con lo sviluppo di ipertrofia (adattativa e "maladattativa") di cellule muscolari lisce vascolari e cardiomiociti osservata in condizioni di *stretch* cellulare da sovraccarico emodinamico (47, 48, 49, 50).

Tutti i tessuti nel corpo sono soggetti a forze fisiche derivanti o dalla tensione generata dalle stesse cellule o dall'ambiente; tuttavia, è stata da poco riconosciuta l'importanza del ruolo della forza meccanica nella regolazione della struttura e funzione di cellule, tessuti ed organi. Attualmente è noto come stimoli fisici di varia natura vengono "sentiti" dalle cellule e trasmessi al nucleo in seguito all'attivazione di molteplici e complessi *pathways* intracellulari di trasduzione del segnale che possono risultare in risposte fisiologiche o condizioni patologiche (47).

Stress biomeccanico e fattori neuroendocrini rappresentano i due principali *triggers* di ipertrofia e *remodeling* cellulare; non è ancora chiaro, tuttavia, in che modo lo stress biomeccanico possa essere "sentito" dalle cellule e conseguentemente trasdotto in segnali intracellulari (48). Canali ionici sensibili allo *stretch*, integrine, proteine sarcomeriche e del citoscheletro sembrano giocare un ruolo importante nel complesso *network* di vie di segnalazione implicate nella trasduzione dello stress biomeccanico nella risposta ipertrofica. Al contrario, i fattori neuroendocrini e i relativi *pathways* di *signaling* a valle coinvolti nella crescita ipertrofica e/o iperplastica di cardiomiociti e cellule muscolari lisce vascolari sono ben noti e comprendono: endotelina-1, angiotensina II, catecolamine, insulina e fattori di crescita (EGF, FGF, IGF-1, NGF, PDGF) (47, 48, 52). Molti fattori neuroendocrini mediano i loro effetti ipertrofici mediante attivazione di recettori tirosin chinasiche ma la maggior parte di queste molecole attivano recettori transmembrana accoppiati a proteina G (principalmente quelli accoppiati a proteina  $G_{\alpha_q}$ ) (47, 48). Sembra che questi recettori possano essere direttamente attivati anche dallo stress biomeccanico, fungendo in questo caso da "meccanosensori": per i recettori tirosin chinasiche lo *shear* stress potrebbe quindi direttamente indurre una rapida e transiente fosforilazione di residui di tirosina nel dominio chinamico recettoriale con conseguente attivazione del recettore stesso (47). Per i recettori accoppiati a proteina G, la proteina  $G_{\alpha_q}$  sembrerebbe giocare un ruolo importante nel determinare l'inizio dell'ipertrofia cellulare in risposta allo *shear* stress da sovraccarico emodinamico (47); in questo caso, l'attivazione stress-indotta delle proteine  $G_{\alpha_q}$  porterebbe alla formazione di inositolo-1,4,5-trifosfato in seguito all'attivazione della fosfolipasi C, proteina effettrice, con conseguente incremento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$ , attivazione di protein-chinasi e/o protein-fosfatasi  $Ca^{2+}$ -dipendenti e ipertrofia cellulare (48). Lo stress meccanico potrebbe dunque

direttamente perturbare la superficie cellulare o alterare la conformazione dei recettori “accendendo” specifiche vie di trasduzione del segnale e promuovendo l’espressione genica nonché il *signaling* autocrino e paracrino di fattori di crescita che potrebbero a loro volta evocare ed amplificare la risposta cellulare.

Il *pathway* di *signaling* delle MAP chinasi ERK1/2 (Fig. 11) viene attivato in un’ampia varietà di tipi cellulari per lo più in risposta a stimoli mitogeni ma anche citochine e stress di varia natura; l’acronimo ERK (protein-chinasi regolata da segnale extracellulare), coniato per la prima volta nel 1991, riflette proprio l’ampia varietà di segnali extracellulari responsabili dell’attivazione di questi enzimi (52). Il meccanismo di attivazione di ERK1/2 in risposta a fattori di crescita è stato ben caratterizzato e studi sempre più numerosi riportano l’attivazione diretta di queste chinasi in seguito a *stretch* meccanico in cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vascolari e cardiomiociti (47). La cascata di *signaling* di ERK1/2 (Fig. 11) ha tipicamente inizio in corrispondenza della membrana cellulare in seguito all’attivazione della piccola proteina G **Ras** (circa 21 kDa); questa molecola funziona come un “interruttore” molecolare in quanto la conversione Ras-GDP→Ras-GTP, in un processo mediato da un fattore di scambio del GTP (anche noto come **Sos1/2**), determina la formazione di una proteina Ras attiva con successiva “accensione” del *signaling downstream* (52, 55). Questa conversione Ras-GDP→Ras-GTP può essere indotta dall’attivazione di numerosi recettori tirosin-chinasici in seguito alla dimerizzazione e successiva autofosforilazione indotta dal *binding* del ligando; i residui recettoriali fosforilati costituiscono a loro volta siti di *binding* per particolari proteine come, per esempio, la proteina **Shc**, responsabile del reclutamento di **Grb2** (*growth factor receptor-bound protein 2*) e **Sos1/2** con conseguente attivazione di Ras. Anche integrine e recettori accoppiati a proteina G sono in grado di promuovere la formazione di Ras-GTP attiva, la quale sembra coinvolta nell’attivazione di circa una dozzina di vie di *signaling* a valle, oltre alla cascata Raf-MEK-ERK (52). Ras-GTP attiva sarà poi riconvertita in Ras-GDP inattiva mediante stimolazione dell’attività Ras-GTPasica intrinseca da parte di una proteina attivante (*GAP-GTPase Activating Protein*) (52).

Ras-GTP induce l’attivazione delle MAP3-chinasi della famiglia **Raf** (A-,B-,C-Raf) mediante un complesso processo *multistep* basato sulla formazione di omodimeri ed eterodimeri in prossimità della membrana plasmatica; le chinasi Raf presentano una ristretta specificità di substrato e catalizzano la fosforilazione/attivazione di **MEK1** e **MEK2** (MAP2Ks) *dual-specificity* protein-chinasi che, a loro volta, mediano la doppia fosforilazione su residui di tirosina e treonina di **ERK1** e **ERK2** (MAPKs), gli unici substrati fisiologici noti per questi enzimi (52, 55). MEK1/2 sembrano anche coinvolte nell’ancoraggio di ERK1/2 e nello *shuttling* nucleo-citoplasma, suggerendo quindi l’esistenza di un altro livello di regolazione tra queste due classi di chinasi (55).

ERK1/2 (serina/treonina protein-chinasi) catalizzano quindi la fosforilazione di specifici *target* molecolari nel citosol ma anche nel nucleo dove possono essere traslocate una volta attivate; ERK1 e ERK2 presentano più di 175 substrati a livello citosolico e nucleare (52).

Finora sono stati identificati più di 50 differenti substrati citoplasmatici di ERK1/2, tra cui: fosfoprotein-fosfatasi, protein-chinasi della famiglia RSK, fosfodiesterasi dell’AMP

ciclico (per lo più PDE4), fosfolipasi A<sub>2</sub> citosolica, proteine del citoscheletro, proteine apoptotiche e molecole regolatorie e di *signaling* (52).

Le proteine della famiglia **RSK** (*Ribosomal S6 Kinase*) costituiscono un gruppo di protein-chinasi serina-treonina importanti nella regolazione della **crecita**, **motilità**, **proliferazione** e **sopravvivenza** cellulare; questi enzimi sono componenti chiave a valle della cascata di *signaling* Raf-MEK-ERK e vengono direttamente attivati da ERK1/2 in risposta a fattori di crescita, ormoni polipeptidici, neurotrasmettitori, chemochine e altri fattori di stress. La famiglia RSK regola a sua volta la trascrizione genica catalizzando la fosforilazione di molteplici fattori di trascrizione quali: CREB, SRF (*Serum Response Factor*), *estrogen-receptor-α*, NF-κB (*Nuclear Factor-κB*), NFAT3 (*Nuclear Factor of Activated T cells 3*) e il fattore di inizio della trascrizione TIF1A; questi enzimi fosforilano anche numerose proteine associate ai ribosomi (es: proteina ribosomale S6 e fattore eucaristico di inizio 4B-eIF4B), incrementando così il *rate* di sintesi proteica (52). Il *signaling* di **sopravvivenza cellulare** ERK-RSK mediato sembra essere principalmente dovuto **all'inattivazione di proteine pro-apoptotiche**, tra cui Bad (*Bcl-2-Associated Death promoter*) e DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*); questi enzimi promuovono inoltre la progressione del ciclo cellulare (52).

Alcune **actin-binding proteins** (es. palladina) sembrano costituire un altro *subset* di substrati citoplasmatici specifici per ERK1/2; la fosforilazione di tali proteine gioca un ruolo fondamentale nel *remodelling* dell'actina citoscheletrica con conseguenti influenze sul comportamento mitogeno, morfologico e migratorio delle cellule (52).

ERK1/2 sembrano infine catalizzare la fosforilazione di alcune **nucleoporine** (proteine del complesso del poro nucleare) facilitando la traslocazione di proteine nucleari nel citoplasma (52).

Nel nucleo queste chinasi fosforilano e attivano soprattutto fattori di trascrizione e alcuni dei loro regolatori; in particolare, *target* nucleari di ERK1/2 comprendono la famiglia di fattori di trascrizione del fattore ternario complesso (TCF), fondamentali per l'induzione dell'espressione dei "geni immediati precoci" i cui prodotti genici (per lo più c-Fos e c-Myc) inducono a loro volta "geni tardivi" coinvolti nella promozione dei processi di **sopravvivenza**, **divisione** e **motilità cellulare**. La cascata di ERK1/2 sembra inoltre importante nel *remodelling* cromatinico e nella regolazione della repressione trascrizionale (52, 55). **Elk1** è uno dei più ampiamente studiati *targets* di ERK1/2; appartiene al gruppo di fattori di trascrizione con il dominio Ets, sottofamiglia della famiglia TCF, una delle classi più numerose di fattori di trascrizione, unica dei metazoi; la fosforilazione di Elk1 determina un aumento complessivo dell'attività trascrizionale (52). **c-Fos** è un fattore di trascrizione che costituisce, in associazione con c-Jun, una forma di fattori di trascrizione AP1 (*Activating Protein 1*) coinvolti nella regolazione di processi trascrizionali precoci in risposta alla stimolazione extracellulare; senza la fosforilazione di c-Fos, il relativo mRNA e il prodotto proteico vengono rapidamente degradati. ERK1/2 catalizzano inoltre la fosforilazione del fattore di trascrizione **c-Jun**, risultando ancora una volta in un aumento complessivo dell'attività trascrizionale (52). Elk1, c-Fos, c-Myc e c-Jun sono dunque importanti regolatori della crescita e proliferazione cellulare (55).

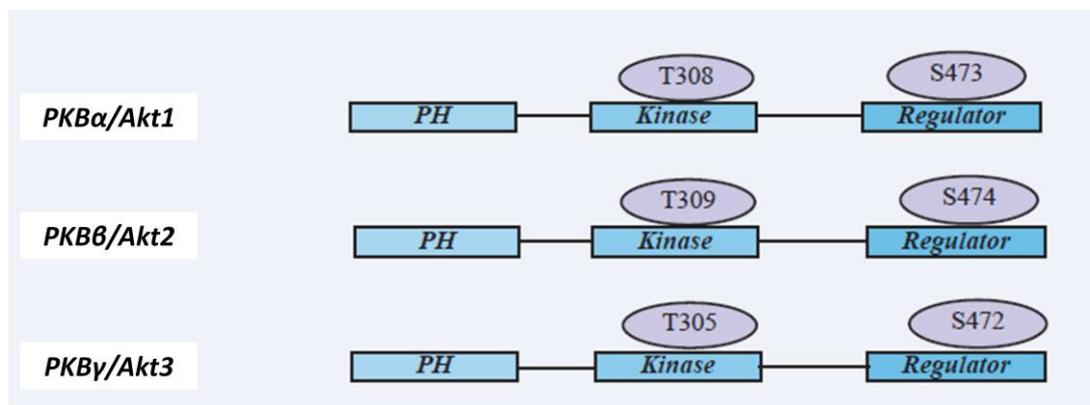
L'inattivazione di ERK1/2 si verifica in seguito alla defosforilazione di uno o di entrambi i residui regolatori di tirosina e treonina nel *loop* di attivazione di questi enzimi; questo processo di defosforilazione e inattivazione può essere mediato da numerose fosfatasi (es: PP2A) oppure da una classe molto più specifica di fosfatasi denominate **DUSPs** (*Dual – Specificity Phosphatases*), formalmente note come MAPK-fosfatasi (55).

### **1.3.3 Ruolo del *signaling* Akt nel *remodelling* vascolare polmonare e cardiaco da sovraccarico emodinamico.**

La protein-chinasi Akt (nota anche come PKB, *protein kinase B*) è una delle protein-chinasi più importanti e maggiormente versatili e costituisce un nodo centrale nel *signaling* di tutte le cellule degli eucarioti superiori, risultando perciò fondamentale nella fisiologia e patologia umana (59). Scoperta per la prima volta come oncogene del retrovirus murino AKT8, responsabile del linfoma delle cellule T dei roditori, Akt è attualmente una delle chinasi più ampiamente caratterizzate e costituisce un nesso critico di integrazione tra stimoli cellulari e successive risposte adattative; i substrati di questa chinasi sono coinvolti in numerosissime funzioni cellulari come crescita, sopravvivenza, proliferazione, metabolismo, *uptake* di glucosio, espressione genica e comunicazione cellula-cellula mediante induzione della produzione di fattori paracrini e autocrini (60).

Akt è una protein-chinasi serina/treonina e appartiene alla super famiglia delle protein-chinasi A, G e C (AGC *protein kinases*), protein-chinasi cAMP-dipendenti strutturalmente omologhe nel loro dominio catalitico e caratterizzate da simili meccanismi di attivazione; alterazioni nella regolazione di alcune di queste chinasi sono frequentemente associate a patologie umane (61). Nei mammiferi sono stati identificati tre geni codificanti tre distinte isoforme di Akt (PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 e PKB $\gamma$ /Akt3) tutte caratterizzate da una tipica struttura a domini conservata: un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) all'estremità N-terminale, un dominio chinamico centrale e un dominio regolatorio al C-terminale contenente un motivo idrofobico, caratteristico delle chinasi AGC (Fig. 13). Il dominio PH N-terminale (circa 100 residui aminoacidici), originariamente identificato nella pleckstrina (principale substrato della PKC nelle piastrine), interagisce con prodotti lipidici di membrana come il fosfatidilinositolo (3,4,5) trifosfato (PIP3-*Phosphatidylinositol trisPhosphate*) prodotto dall'attività della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3 chinasi); questo dominio sembra legare anche PIP2 con simile affinità (61). Il dominio catalitico chinamico di Akt, localizzato nella regione centrale della molecola, presenta un elevato grado di similarità con altre chinasi AGC e contiene un residuo altamente conservato di treonina (T308 in Akt1) la cui fosforilazione può parzialmente attivare Akt (61). Il dominio chinamico è seguito da un'estensione di circa 40 residui aminoacidici all'estremità C-terminale che contiene un motivo idrofobico caratteristico della famiglia delle chinasi AGC; la fosforilazione di un residuo di serina (Ser473 in Akt1) in questo motivo idrofobico è necessaria per la completa attivazione di Akt (61). Tutte le isoforme di Akt contengono dunque due siti di fosforilazione regolatori: Thr308 (per Akt1) nel *loop* di attivazione entro il dominio chinamico e Ser473 (per Akt1) nel dominio regolatorio C-terminale. Nella maggior parte dei casi, l'attivazione di Akt

coinvolge una PI3 chinasi e uno step di traslocazione alla membrana plasmatica dominio PH-dipendente seguito dalla fosforilazione di questi due siti regolatori chiave; la fosforilazione di Thr308 contribuisce ad un'attivazione parziale di Akt che verrà completamente attivata soltanto in seguito alla fosforilazione di entrambi i siti. Numerose Akt *binding-proteins* sono state inoltre recentemente identificate e potrebbero anch'esse contribuire alla regolazione dell'attività di Akt (61).



**Figura13.** Struttura a domini delle 3 isoforme di Akt nell'uomo; i 2 residui aminoacidici fondamentali nell'attivazione di ogni isoforma enzimatica sono indicati. Immagine adattata da Song G. *et al*, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2005.

Akt può essere attivata in risposta ad un'ampia varietà di stimoli *upstream* che sembrano indurre risposte biologiche differenti a seconda del tipo cellulare; tali stimoli comprendono per lo più **ormoni**, **fattori di crescita**, **citochine**, **farmaci/piccole molecole**, **nutrienti** e **stress biomeccanici** (*shear stress*) e stress osmotico. Gli **ormoni** (*signaling* endocrino) e le **citochine** (*signaling* paracrino/autocrino) sono considerati i "classici" attivatori del *signaling* di Akt e includono: adrenomedullina, angiotensina II, peptide natriuretico atriale, eritropoietina, estrogeni, ormone della crescita, insulina, IGF-1, IL-18, PDGF, VEGF e molti altri (60). **Piccoli peptidi di signaling**, come bradichinina e endotelina, mediano l'attivazione di Akt in modo indiretto; la maggior parte dei fattori ormonali e citochinici agiscono mediante il *pathway* di Akt per indurre ipertrofia o reprimere l'apoptosi (effetto anti-apoptotico) (60). Anche piccole molecole quali **agenti farmacologici e integratori nutrizionali** (sintetici o naturali come i polifenoli del vino rosso e del tè verde, i fitoestrogeni della soia o derivati dalla radice del ginseng) possono essere in grado di attivare Akt una volta ingeriti; il trattamento con alcuni donatori di ossido nitrico (*NO donors*) sembra indurre la fosforilazione di Akt con conseguenti effetti vasoattivi (60).

L'attivazione di Akt può inoltre essere influenzata da stimoli extracellulari mediante meccanismi non paracrini come la trasduzione meccanica, o il contatto cellula-cellula; numerosi studi dimostrano come lo **stress meccanico** indotto da vari fattori (es: creazione di uno *shunt* aortocavale con sovraccarico di volume e pressione) possa determinare un significativo incremento nel livello di fosforilazione/attivazione di Akt nei cardiomiociti e cellule delle pareti vascolari, principalmente mediante stimolazione delle integrine cellulari ("sensori meccanici") (60). Da altri lavori sperimentali è tuttavia emerso come lo

scompenso cardiaco risultante dal sovraccarico di volume sia caratterizzato da un iniziale, precoce aumento dell'attività di Akt (ipertrofia adattativa) (62) cui farebbe seguito una significativa diminuzione della fosforilazione di questa chinasi che potrebbe dunque contribuire all'insorgenza di scompenso, osservato nell'ipertensione arteriosa polmonare avanzata (63); in questa luce, la riduzione dell'attività di Akt sembrerebbe dunque associata all'insufficienza cardiaca.

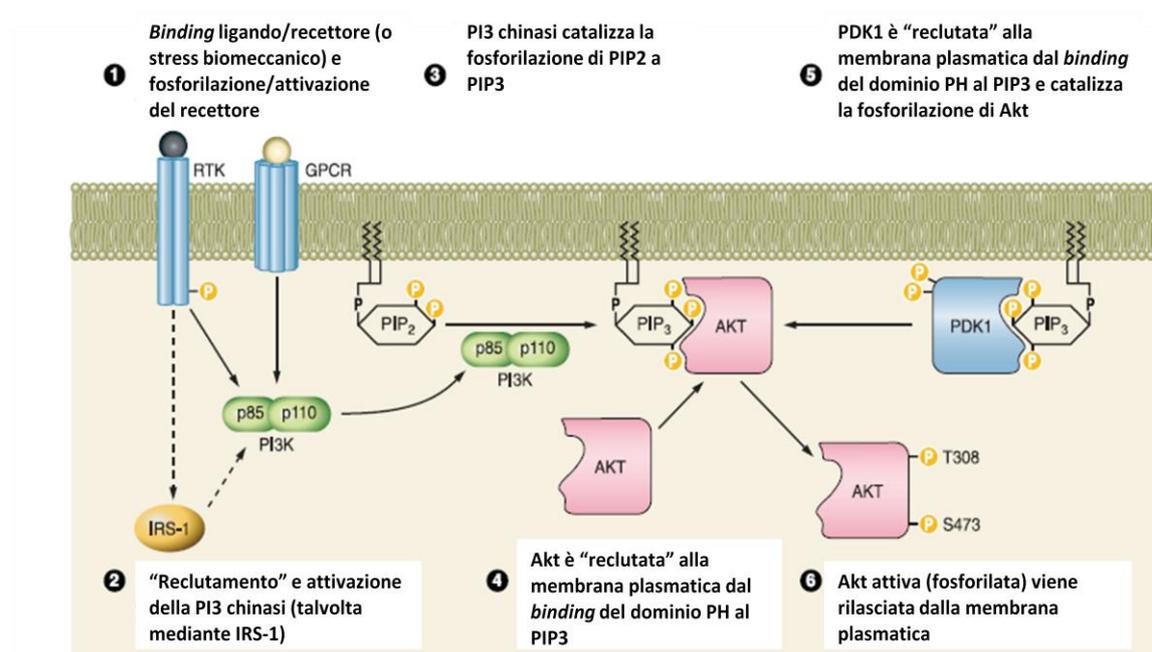
Nelle cellule endoteliali dell'intima vascolare alterazioni del flusso sanguigno con conseguenti alterazioni dello *shear stress* (es.: sovraccarico emodinamico) sembrano indurre la fosforilazione di Akt attraverso l'attivazione di particolari integrine, indicando l'importanza di questo *signal transduction pathway* come potenziale meccanismo contributivo allo sviluppo di quelle profonde alterazioni morfologiche e funzionali dell'endotelio vascolare indotte dallo *shear stress* (64, 65).

La proliferazione e attivazione delle cellule muscolari lisce vascolari, normalmente deputate al controllo del tono vascolare, costituisce un aspetto primario del *remodelling* vascolare indotto dal sovraccarico emodinamico (es.: ipertensione arteriosa polmonare). Numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento del *signaling* di Akt anche nella regolazione della contrattilità, crescita e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (66); l'incremento dei livelli di fosforilazione di Akt nei vasi sanguigni potrebbe dunque contribuire all'iperplasia/ipertrofia mediale, *remodelling* vascolare e altre caratteristiche patologiche tipiche dell'ipertensione polmonare (66).

Il meccanismo di attivazione di Akt (Fig. 14) è stato ampiamente studiato; il *binding* di un ligando specifico (ormone, citochina, peptide o piccola molecola) o lo stress biomeccanico inducono modificazioni della superficie cellulare (per lo più fosforilazione del dominio intracellulare di recettori tirosin-chinasici, cambiamenti conformazionali di recettori accoppiati a proteina G oppure attivazione dei "meccanosensori", integrine, o dei "recettori di morte") e successivo "reclutamento" della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3 chinasi) alla membrana plasmatica (60, 61, 66).

Le **fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3 chinasi)** costituiscono una famiglia altamente conservata di enzimi in grado di catalizzare la fosforilazione sia di proteine che di lipidi; i membri di questa famiglia differiscono per struttura proteica, espressione, regolazione e specificità di substrato ma sono tutti accomunati dalla medesima funzione catalitica, la fosforilazione del gruppo idrossilico D3 dei fosfatidilinositoli di membrana (66). Le PI3 chinasi sono attualmente raggruppate in tre classi principali: gli enzimi di classe I sono molecole eterodimeriche costituite da una subunità catalitica (p110) e una subunità regolatoria (p85) e sono le sole PI3 chinasi in grado di fosforilare PIP2 a PIP3; la loro espressione è ubiquitaria e abbondante nel sistema vascolare e in numerosi tessuti cardiovascolari. Le PI3 chinasi di classe II catalizzano principalmente la fosforilazione del fosfatidilinositolo a PIP (fosfatidilinositolo monofosfato) e sembrano anche contribuire alla produzione di PIP2; la classe III è invece costituita da un solo membro che genera soltanto PIP (66). Il *signalling* delle PI3 chinasi è strettamente regolato da fosfatasi lipidiche che rimuovono i gruppi fosfato precedentemente aggiunti dalle PI3 chinasi stesse; le PI3 chinasi attivano numerosi *targets* cellulari di varia natura contenenti un dominio PH che, in virtù della capacità di legare i fosfatidilinositoli fosforilati, media il "reclutamento" degli effettori *downstream* alla membrana plasmatica (66).

In seguito all'attivazione recettoriale, il dominio SH2 della subunità p85 della PI3 chinasi si lega alla porzione intracellulare del recettore attivato portando il complesso proteico in stretta prossimità della membrana plasmatica dove la subunità catalitica p110 catalizza la fosforilazione del PIP2 a PIP3. Il dominio PH di Akt e della protein-chinasi 3-fosfoinositolo-dipendente PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) lega dunque il PIP3 e porta così le due chinasi in stretta associazione con la membrana plasmatica e, conseguentemente, l'una con l'altra, determinando la fosforilazione PDK1-mediata di Akt ai residui di Ser473 e Thr308, anche se altre chinasi potrebbero contribuire alla fosforilazione della Ser473 (61). Una volta attivata, Akt fosforilata viene rilasciata dalla membrana plasmatica e può migrare nei vari compartimenti cellulari per fosforilare un'ampia varietà di molecole substrato (Fig. 14) (60, 61).



**Figura14. Meccanismo di attivazione di Akt: stimolazione recettoriale e steps di fosforilazione e attivazione necessari per la fosforilazione e attivazione finale di Akt.** GPCR, *G protein-coupled receptor* (recettore accoppiato a proteina G); RTK, *receptor tyrosine kinase* (recettore tirosin chinasi); IRS-1, *insulin receptor substrate 1* (substrato del recettore insulinico, tipo1), PI3K, *phosphoinositide 3-kinase* (fosfatidilinositolo 3-chinasi), PDK1, *phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (protein-chinasi fosfatidilinositolo-dipendente 1), PIP2, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (fosfatidilinositolo bifosfato); PIP3, *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (fosfatidilinositolo trifosfato), PH, *plekstrin homology*. Immagine adattata da Sussman MA et al., *Physiological Reviews*, 2011.

L'attivazione di Akt può essere inibita in modo indiretto o diretto; l'azione delle fosfoinositolo fosfatasi rende reversibile la produzione di fosfoinositoli da parte delle PI3 chinasi: la protein-fosfatasi **PTEN** (*Phosphatase and TENsin homolog*) possiede un'attività fosfoinositolo-fosfatasi che catalizza la rimozione del gruppo fosfato in posizione 3-OH del PIP3 determinando la formazione di PIP2 e conseguente inattivazione indiretta di Akt (60). La serina/treonina protein-chinasi **GSK-3** (*Glycogen Synthase Kinase 3*) che normalmente fosforila e inattiva la glicogeno sintasi e altri substrati, può essere fosforilata e inibita da Akt e mostra a sua volta effetti repressivi indiretti

sull'attività della stessa Akt (antagonismo molecolare reciproco) (60). La defosforilazione diretta con conseguente inattivazione di Akt è generalmente mediata da altre fosfatasi e interazioni inibitorie; nei cardiomiociti, per esempio, le **proteine 14-3-3** (molecole regolatorie ubiquitarie negli eucarioti che inibiscono le risposte ipertrofiche dei cardiomiociti) e l'enzima **PARP** (*Poly ADP-Ribose Polymerase 1*, normalmente coinvolto nella regolazione trascrizionale, detezione dei *breaks* negli strand del DNA e inizio del processo di riparazione del DNA danneggiato) sono importanti regolatori negativi dell'attività di Akt (60). Anche **PTP1B** (*Protein -Tyrosine-Phosphatase 1B*) e la **pleiotrofina**, citochina regolata durante lo sviluppo, sembrano essere regolatori negativi di Akt, antagonizzandone la fosforilazione (60). Numerosi studi hanno suggerito un'attivazione di Akt con meccanismi PI3 chinasi-indipendenti mediati, ad esempio, da agenti in grado di aumentare la concentrazione di cAMP: in questo caso l'attivazione di Akt sembrerebbe essere mediata dall'azione della PKA con un meccanismo non ancora ben chiaro (61).

Sono stati attualmente identificati più di 100 differenti substrati non ridondanti di Akt, molti dei quali risultano altamente conservati nei mammiferi e, talvolta, anche in alcuni organismi modello invertebrati come *Drosophila* o *C. elegans* (59). La maggior parte dei diversi ruoli cellulari di Akt non segue il classico paradigma un substrato-una funzione; ogni risposta fisiologica a valle di Akt sembra infatti essere mediata da molteplici *targets* distinti, alcuni substrati controllano inoltre più di una funzione cellulare e queste funzioni potrebbero variare in un modo cellula- e segnale-dipendente (Fig. 15) (59).

L'attivazione delle chinasi serina/treonina sembra centrale nella patogenesi delle neoplasie e nella resistenza ai processi apoptotici; d'altra parte, l'inibizione di queste chinasi può tuttavia risultare dannosa, indicando la fondamentale importanza del loro ruolo per la normale omeostasi cellulare. Akt gioca un ruolo critico nella promozione della **sopravvivenza cellulare** (Fig. 15) in risposta a fattori di crescita, oncogeni e stress cellulari di varia natura (es.: sovraccarico emodinamico, stress ossidativo); questa chinasi sembra promuovere la sopravvivenza delle cellule principalmente bloccando la funzione di molteplici proteine pro-apoptotiche e dando inizio a cascate di *signalling* protettive (59, 60). L'attivazione di Akt nei cardiomiociti sembra avere una funzione essenzialmente cardioprotettiva ed è stato dimostrato come il *signaling* di questa chinasi sia necessario anche per la sopravvivenza di fibroblasti cardiaci, cellule muscolari lisce vascolari e cellule endoteliali (60). Sono stati identificati numerosi *targets* a valle di Akt coinvolti negli effetti pro-sopravvivenza, quali fosforilazione e regolazione negativa Akt-mediata della funzione e/o espressione di numerose proteine pro-apoptotiche della famiglia **Bcl-2** (per lo più BAX e BAD), inattivazione per fosforilazione ed esclusione dal nucleo dei fattori di trascrizione **Forkhead (FOXO)**, coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare mediante *up*-regolazione della trascrizione di alcuni ligandi dei recettori di morte e overespressione della proteina pro-apoptotica BIM), fosforilazione di **MDM2** e successiva degradazione del fattore di trascrizione pro-apoptotico **p53**, incremento del rilascio di **ossido nitrico** (principalmente in seguito a fosforilazione Akt-mediata di eNOS), regolazione del **ciclo del Ca<sup>2+</sup>** e della sopravvivenza di cellule staminali (59, 60). Akt sembra inoltre inibire l'apoptosi attraverso la fosforilazione e inattivazione della

chinasi **GSK3** (con conseguente inibizione dei suoi *targets* pro-apoptotici) nonché attraverso la fosforilazione diretta e riduzione dell'attività proteasica della **pro-caspasi9**. Si pensa che Akt sia in grado di esercitare alcuni dei suoi effetti pro-sopravvivenza anche attraverso il *cross-talk* con altri *pathways* (es.: attivazione del *signaling* di sopravvivenza di NF- $\kappa$ B o inibizione del *signaling* apoptotico JNK/p38) o mediante effetti sull'*uptake* e il metabolismo dei nutrienti e mantenimento del potenziale della membrana mitocondriale (59).

L'attivazione di Akt gioca un ruolo importante anche nella stimolazione della **proliferazione cellulare** (Fig. 15) agendo su molteplici substrati implicati nella regolazione del ciclo cellulare: la fosforilazione Akt-mediata dell'inibitore chinasi ciclina-dipendente **p27<sup>Kip1</sup>** e il successivo "sequestro" citosolico prevengono, ad esempio, la localizzazione di p27<sup>Kip1</sup> nel nucleo con conseguente attenuazione dei suoi effetti inibitori sul ciclo cellulare. Anche in questo caso, Akt può anche inibire l'espressione di p27<sup>Kip1</sup> fosforilando e inibendo specifici fattori di trascrizione **FOXO** (59). Akt sembra guidare la proliferazione cellulare anche attraverso la regolazione della stabilità e sintesi di proteine coinvolte nella fase iniziale del ciclo cellulare: la fosforilazione e inibizione Akt-mediata di **GSK3** aumenta la stabilità delle cicline di fase G1 (ciclina D e ciclina E) e dei fattori di trascrizione *c-jun* e *c-myc*, fondamentali nella transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare e inattivati dalla fosforilazione GSK3-mediata. Il *signaling* di Akt controlla anche la traduzione di proteine importanti per la progressione del ciclo cellulare (per lo più in seguito a fosforilazione/inibizione di **TSC2**, *Tuberous Sclerosis Complex 2*, e **PRAS40**, *Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa*, e successiva attivazione di mTORC1, *Mammalian Target Of Rapamycin 1*, regolatore critico della proliferazione cellulare) (59).

Akt partecipa come chinasi nodale nel promuovere il metabolismo cellulare e il *remodelling* ed è per questo motivo considerata un attore essenziale nel *signaling* cellulare ipertrofico (60). Una delle funzioni meglio conservate di Akt è il suo ruolo nella promozione della **crescita cellulare** (Fig. 15) (incremento della massa cellulare) agendo principalmente attraverso l'attivazione, per lo più indotta da nutrienti e fattori di crescita del complesso **mTOR1** (o mTORC1), regolatore critico dell'inizio della traduzione e della biogenesi dei ribosomi e fondamentale nel controllo della crescita cellulare; mTORC1 promuove dunque la sintesi proteica agendo sui suoi *downstream targets*. Akt sembra inoltre mediare la fosforilazione dell'enzima **ACL** (*ATP Citrate Lyase*) contribuendo così alla sintesi di nuovi lipidi per la biogenesi delle membrane (59); l'inattivazione Akt-mediata dei fattori **FOXO**, normalmente preposti alla trascrizione di geni atrofici, contribuisce infine alla promozione della crescita cellulare (60).

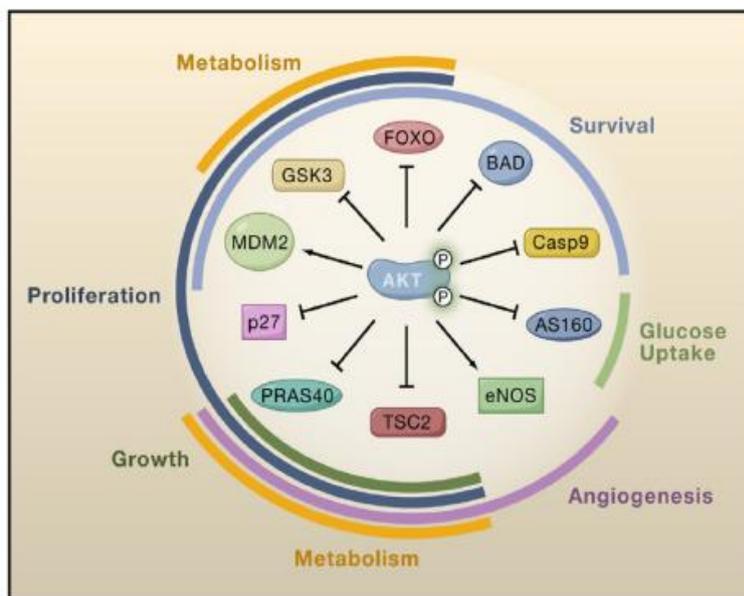
La diminuzione dell'espressione di Akt durante la gravidanza e la normalizzazione nel periodo post-partum suggerisce un probabile ruolo anti-ipertrofico di questa chinasi nell'ipertrofia fisiologica; nei cardiomiociti il *pathway* Akt/mTOR sembra essere correlato allo sviluppo di ipertrofia fisiologica adattativa piuttosto che all'ipertrofia patologica, mentre il *signaling* delle MAP-chinasi sembra partecipare allo sviluppo dell'ipertrofia patologica (60).

Akt gioca un ruolo importante anche nell'**angiogenesi** (Fig. 15) fisiologica e patologica nelle cellule endoteliali e, in generale, in tutte le cellule in grado di produrre segnali

angiogenetici; nelle cellule endoteliali e altre cellule Akt catalizza la fosforilazione diretta e attivazione di **eNOS** (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*) con conseguente rilascio di ossido nitrico il quale stimola la vasodilatazione, il *remodeling* vascolare e l'angiogenesi. Il *signaling* di Akt determina inoltre un aumento della produzione dei fattori di trascrizione indotti da ipossia **HIF $\alpha$**  (*Hypoxia-Inducible Factor  $\alpha$* ), per lo più attraverso la traduzione mTORC1-dipendente, con conseguente espressione e secrezione di VEGF e altri fattori angiogenetici (*signaling* autocrino e paracrino) (59).

In risposta a fattori di crescita il *signaling* di Akt regola l'*uptake* e il **metabolismo dei nutrienti** (Fig. 15) con meccanismi diversi a seconda del tipo cellulare, agendo su una moltitudine di substrati a valle: induzione dell'*uptake* di glucosio in risposta all'insulina (una delle più importanti funzioni fisiologiche di Akt) per lo più mediante associazione con vescicole contenenti il trasportatore del glucosio **Glut4** (*GLU*ucose *T*ransporter 4) e successiva traslocazione nella membrana plasmatica, oppure mediante *up*-regolazione mTORC1-mediata dell'espressione di **Glut1**; regolazione dell'espressione di trasportatori per altri nutrienti (es.: aminoacidi); alterazione del metabolismo del glucosio entro le cellule (per lo più mediante stimolazione Akt-mediata dell'associazione delle esochinasi ai mitocondri e successiva conversione glucosio  $\rightarrow$  glucosio-6-fosfato); induzione della conversione del glucosio in glicogeno e della via glicolitica (per fosforilazione Akt-mediata della GSK3 e *up*-regolazione della sintesi di enzimi glicolitici, rispettivamente); regolazione del metabolismo lipidico per fosforilazione Akt-mediata di GSK3 e di ACL (59, 60).

Akt sembra inoltre implicata nel controllo della **migrazione cellulare** e **invasione della matrice extracellulare** attraverso l'attivazione di meccanismi non ancora ben chiari (59).



**Figura15. Funzioni cellulari di alcuni substrati di Akt.** La fosforilazione Akt-mediata di queste proteine *targets* può determinarne l'attivazione (frecce) o l'inibizione (frecce di blocco). La regolazione di questi substrati da parte di Akt è importante nell'attivazione dei vari processi cellulari indicati (sopravvivenza, crescita cellulare, proliferazione, *uptake* di glucosio, metabolismo e angiogenesi). Come illustrato, i substrati di Akt sono caratterizzati da un alto grado di versatilità funzionale e in molti casi condividono funzioni identiche. *Manning BD and Cantley LC, Cell, 2007.*

### **1.3.4 Ruolo dell'ossido nitrico (NO) nell'ipertensione arteriosa polmonare e nella fisiopatologia cardiaca.**

Inizialmente identificato negli anni 70 come un potente vasodilatatore, l'ossido nitrico (NO) è stato riconosciuto negli ultimi vent'anni come un importante **regolatore** anche della **funzione miocardica**, in grado di agire o in modo indiretto inducendo **dilatazione della vascolatura sistemica**, o **modulando direttamente la funzione contrattile**, il **metabolismo**, la **crescita e la sopravvivenza dei cardiomiociti** (67). La precisa natura di questi effetti non è ancora oggi del tutto chiara per lo più a causa dell'utilizzo estensivo di inibitori non-selettivi per le diverse isoforme degli enzimi deputati alla sintesi dell'NO (ossido nitrico sintasi). L'NO, noto anche come "fattore rilassante endotelio-derivato", è attualmente considerato una molecola "messaggero" che, agendo su numerosi *targets* molecolari, presiede al controllo di molteplici funzioni fisiologiche regolando ad esempio la **trasmissione nervosa** (come neurotrasmettitore) o il **tono vascolare** (e, conseguentemente, la **pressione sanguigna**), la **trascrizione genica** e la **traduzione dell'mRNA** nonché le **modificazioni post-traduzionali delle proteine** (68); in particolare, è ormai ampiamente riconosciuto l'importantissimo ruolo dell'NO nel **mantenimento dell'omeostasi endoteliale**, del delicato equilibrio tra vasocostrittori e vasodilatatori in favore di un basso tono vascolare a livello del circolo polmonare; l'NO sembra inoltre coinvolto nell'**inibizione della crescita cellulare vascolare** e nella **regolazione della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari** (69).

L'NO è una delle più piccole molecole bioattive dell'organismo umano, essendo composto soltanto dall'unione di un singolo atomo di azoto (N) con uno di ossigeno (O) e si presenta come una molecola altamente lipofila, estremamente reattiva a causa della presenza di un elettrone spaiato che le conferisce proprietà radicaliche. Le caratteristiche lipofiliche e la neutralità elettrica consentono alle molecole di NO di diffondere liberamente, secondo gradiente, attraverso il doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari. Alla pressione atmosferica l'NO esiste come gas mentre a livello cellulare reagisce con vari composti (ossiemoglobina, ossigeno molecolare, anione superossido, amine, tioli, ecc..) riducendo la sua emivita a pochi secondi (circa 5 secondi). Un'importante via di inattivazione dell'NO consiste nella reazione di questa molecola con l'anione superossido ( $O_2^-$ ) per formare perossinitrito ( $ONOO^-$ ), un potente ossidante in grado di indurre **danno ossidativo**, nitrificazione e S-nitrosilazione delle biomolecole principali, quali proteine, lipidi e DNA; lo **stress nitrosativo** mediato dalla formazione di  $ONOO^-$  sembra inoltre essere implicato nella formazione di rotture a singolo filamento del DNA (68).

Parallelamente all'alterato equilibrio tra vasodilatatori e vasocostrittori, l'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (**ROS**) e dell'azoto (**RNS**) sembra essere coinvolta nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare; queste molecole altamente reattive regolano infatti la forza e il tono vascolare, la proliferazione cellulare e l'apoptosi modulando la progressione di questa condizione patologica. L'aumento dei livelli di  $O_2^-$  può ridurre la sintesi e la bioattività dell'NO derivato dall'endotelio

inducendo così un aumento della vasocostrizione e conseguente sviluppo di ipertensione polmonare (69). L'NO, le ROS e le RNS sembrano dunque contribuire alla disfunzione dell'endotelio polmonare e al *remodelling* proliferativo patologico caratteristico dell'ipertensione polmonare. Attraverso la sintesi e il rilascio di mediatori vasoattivi l'endotelio gioca un ruolo critico nel mantenimento di un delicato e preciso equilibrio tra molecole vasocostrittrici (per lo più endotelina-1, trombossano A<sub>2</sub> e serotonina) e vasodilatatrici (per lo più prostaglandina I<sub>2</sub> e NO); nell'ipertensione arteriosa polmonare il danno e la disfunzione endoteliale inducono cambiamenti in questa omeostasi, alterando l'equilibrio in favore della vasocostrizione, proliferazione delle cellule muscolari lisce e fenomeni trombotici locali; la compromissione del *signaling* dell'ossido nitrico costituisce quindi un importante elemento coinvolto nel *remodeling* patologico della vascolatura polmonare durante lo sviluppo dell'ipertensione arteriosa polmonare. Una compromessa vasodilatazione endotelio-dipendente rappresenta uno degli eventi precoci nella patogenesi di questa condizione patologica e un'umentata produzione dell'anione superossido nella parete vasale e diminuzione della biodisponibilità dell'NO (per lo più dovuta a sintesi ridotta o incrementato consumo) sono segni caratteristici di disfunzione endoteliale (69). L'alterato *signaling* dell'NO nell'ipertensione arteriosa polmonare sembra essere il risultato di molteplici meccanismi di *signaling* come la riduzione dell'espressione, disfunzione o “disaccoppiamento” degli enzimi deputati alla sintesi dell'ossido nitrico, effetti a valle dell'NO e catabolismo dell'NO da parte di ROS o emoglobina.

La funzione dell'NO nel cuore non è stata ancora ben definita, tuttavia questa molecola sembra giocare un ruolo chiave nella regolazione del processo di **accoppiamento eccitazione-contrazione** alla base della contrazione miocardica (per lo più attraverso la modulazione del *signaling* β-adrenergico) (70). Nel cuore, due tipi cellulari principali sono considerati importanti “fonti” di NO: cardiomiociti e cellule endoteliali dell'endotelio cardiaco (cellule endoteliali vascolari dei vasi sanguigni coronarici e cellule endoteliali dell'endocardio delle camere cardiache); la stretta relazione spaziale esistente tra cellule endoteliali e cardiomiociti (non più di 2-3 μm di distanza) facilita la trasmissione dei segnali tra i due tipi cellulari (67). L'endotelio cardiaco contribuisce all'omeostasi cardiovascolare regolando l'**angiogenesi**, la **permeabilità vascolare**, la **resistenza vascolare** e la **rigidità del miocardio**; analogamente all'endotelio vascolare polmonare, l'endotelio cardiaco rilascia localmente fattori vasocostrittori (endotelina) e vasodilatatori (NO, prostaglandine), fattori pro- e anti-coagulanti e vari fattori di crescita come l'FGF (*Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor BB*), contribuendo così alla modulazione della resistenza vascolare, del contenuto di acqua tissutale e del contenuto di sangue miocardico. Attualmente poco è noto circa l'effetto del *signaling* endoteliale sui cardiomiociti: l'endotelio cardiaco potrebbe esercitare i suoi effetti sulle cellule muscolari cardiache con un meccanismo paracrino di “accoppiamento stimolo-secrezione-contrazione” oppure mediante trasporto ionico transendoteliale, definito come “barriera ionica sangue-cuore”; risultando per lo più in un **effetto sproporzionato sul rilassamento miocardico e performance diastolica** (67). Oltre al coinvolgimento nella

regolazione della funzione contrattile miocardica, i fattori derivati dalle cellule endoteliali cardiache possono anche influenzare la **crescita e l'ipertrofia** dei cardiomiociti.

Bassi livelli di NO sembrano indurre un effetto inotropo positivo sul miocardio mentre alti livelli sono associati ad un effetto inotropo negativo (67); questo effetto dell'NO sui cardiomiociti comporta un'accelerazione del rilassamento e una riduzione del tono diastolico ed è stato attribuito a una diminuita responsività dei miofilamenti al  $Ca^{2+}$ , probabilmente a causa della fosforilazione della Troponina I cardiaca indotta dal *signaling* dell'NO stesso (67).

Nel cuore, l'NO sembra avere effetti anti-ipertrofici come risultato di una modulazione negativa NO-mediata di *pathways* pro-ipertrofici (es.: ERK *signaling*); in questa luce è stato dimostrato il possibile ruolo dell'NO nel prevenire il *remodelling* patologico cardiaco: un aumento della sintesi di NO nel miocardio potrebbe essere importante nell'inibizione della transizione all'ipertrofia "maladattativa". Il ruolo cardioprotettivo dell'NO sembrerebbe inoltre legato ad una riduzione della fibrosi e apoptosi del miocardio e alla soppressione di *pathways* di *signaling* mediati dallo stress ossidativo (67). Altri studi hanno tuttavia riportato effetti pro-ipertrofici associati all'aumentata produzione dell'NO nel cuore in assenza dei tipici stimoli "ipertrofici"; il meccanismo alla base di questo tipo di ipertrofia miocardica NO-indotta rimane comunque non chiaro (67).

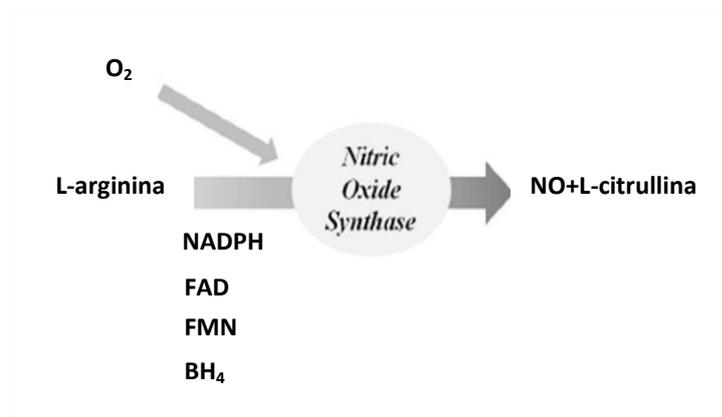
#### 1.3.4.1 Sintesi dell'ossido nitrico e ossido nitrico sintasi (NOS).

Nell'organismo umano l'ossido nitrico può essere prodotto attraverso un meccanismo *enzima-indipendente*, per trasformazione dei nitriti, o *enzima-dipendente*, principalmente per attività delle ossido nitrico sintasi oppure mediante la via della xantina ossidasi in caso di acidosi tissutale.

Nei mammiferi esistono tre isoforme distinte dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS): **ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS o NOS I)**, **ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS o NOS II)** e **ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS o NOS III)**; la nNOS e la eNOS rappresentano le isoforme costitutive e rilasciano quantità di NO dell'ordine delle nM, mentre la iNOS catalizza la formazione di grandi quantità di NO, circa 1000 volte superiore ( $\mu$ M). Tutte le isoforme utilizzano L-arginina come substrato e ossigeno molecolare e NADPH (nicotinammide-adenina-dinucleotide fosfato ridotto) come co-substrati, mentre FAD (flavina adenina dinucleotide) e FMN (flavina mononucleotide) e tetraidrobiopterina ( $BH_4$  o  $H_4BP$ ) sono cofattori di tutti gli isoenzimi che normalmente funzionano come omodimeri (Fig. 16). In condizioni fisiologiche le NOS catalizzano il trasferimento di elettroni dal NADPH attraverso FAD e FMN nel dominio C-terminale, all'eme nel dominio N-terminale; questo dominio lega anche il cofattore essenziale  $BH_4$ , l'ossigeno molecolare e la L-arginina. Al sito dell'eme gli elettroni vengono utilizzati per ridurre ed attivare l'ossigeno molecolare con conseguente ossidazione della L-arginina ad L-citrullina e NO (Fig. 16) (68).

L'NO può agire su un'ampia varietà di enzimi e proteine *target*; la più importante via di *signaling* stimolata dall'NO in condizioni fisiologiche è costituita dall'**attivazione della guanilato ciclasi solubile** e la conseguente **generazione di GMP ciclico** (cGMP) (Fig.

17); tuttavia sono stati identificati anche effetti cGMP-indipendenti dell'NO (per lo più mediante S-nitrosilazione delle proteine *target*) che potrebbero essere particolarmente rilevanti nei casi di eccessiva produzione di NO mediata dall'isoforma inducibile di NOS (67, 70). Nei cardiomiociti e nelle cellule muscolari lisce vascolari, le principali proteine *target* regolate dal cGMP sono per lo più protein-chinasi cGMP-dipendenti (PKGs) e fosfodiesterasi (PDE) dei nucleotidi ciclici stimulate o inibite dal cGMP; le PKGs possono indurre alterazioni nella funzione cellulare mediando l'attivazione di cascate di fosforilazione di altre protein-chinasi a valle mentre le fosfodiesterasi sono preposte alla modulazione dei livelli intracellulari dei nucleotidi ciclici (soprattutto cGMP e cAMP) (67) (Fig. 18).



**Figura 16. Sintesi di NO catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS, Nitric Oxide Synthase). NADPH (nicotinammide-adenina-dinucleotide fosfato ridotto), FAD (flavina adenina di nucleotide), FMN (flavina mononucleotide),  $BH_4$  (tetraidrobiopterina).**

La **NOS neuronale** è costitutivamente espressa in specifici neuroni del cervello (Fig. 17) ed è regolata da  $Ca^{2+}$  e calmodulina; la localizzazione in differenti compartimenti subcellulari sembra contribuire alle molteplici funzioni di questo isoenzima (68). Oltre al tessuto cerebrale la nNOS è stata identificata nel midollo spinale, nei gangli simpatici e nelle ghiandole surrenali, nei nervi periferici, nelle cellule epiteliali di vari organi, nelle cellule della macula densa renale, nelle cellule delle isole pancreatiche e nel muscolo liscio vascolare. Nei mammiferi la fonte più abbondante di nNOS in termini di massa tissutale è costituita dal muscolo scheletrico (68), mentre nel cuore è espressa nei neuroni intrinseci degli atri, delle arterie coronarie epicardiche e nel tessuto di conduzione cardiaco specializzato (nodo senoatriale e nodo atrioventricolare) (71). La nNOS sembra essere implicata nella plasticità sinaptica coinvolta nei processi di apprendimento e formazione della memoria; l'ossido nitrico derivato da questo isoenzima partecipa inoltre al controllo centrale della pressione sanguigna mentre nel sistema nervoso periferico agisce come un neurotrasmettitore atipico preposto al controllo delle componenti rilassanti della peristalsi intestinale, vasodilatazione ed erezione del pene (Fig. 17) (68).

La **NOS inducibile** non viene normalmente espressa dalle cellule ma in condizioni fisiopatologiche, come l'infiammazione, può essere indotta localmente e transitoriamente da particolari endotossine come il lipopolisaccaride (LPS) batterico o alcune citochine pro-infiammatorie (es.:  $IFN-\gamma$ - *interferon- $\gamma$* ,  $TNF-\alpha$ - *tumour necrosis factor  $\alpha$* ,  $IL1-\beta$ - *interleukin 1- $\beta$* ) diventando l'isoforma preminente; NF-kB e STAT1 sono due importanti fattori di trascrizione per l'mRNA di iNOS. Nonostante l'iniziale identificazione nei macrofagi, l'espressione di questo enzima può essere stimolata virtualmente in ogni tipo

cellulare o in ogni tessuto e non soltanto nelle cellule del sistema immunitario; nel cuore è stata detectata nei cardiomiociti ventricolari, cellule endoteliali microvascolari, fibroblasti, cellule muscolari lisce vascolari e cellule degli infiltrati infiammatori (71). Una volta espressa, iNOS è costantemente attiva e non soggetta a regolazione da parte del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare (68) e produce quantità elevate di ossido nitrico (nell'ordine delle  $\mu\text{moli}$ ); in condizioni fisiologiche tale *overproduzione* viene modulata nel tempo e nello spazio dalla NOS inducibile durante il suo relativamente breve periodo di espressione (solitamente fino a pochi giorni) ed esercita effetti benefici che consentono una rapida eliminazione dei microrganismi invasori mediante l'azione citotossica dei livelli "massicci" di ossido nitrico (68, 71). L'elevata affinità per il ferro legato alle proteine rende infatti l'NO in grado di inibire enzimi importanti contenenti ferro nei loro siti attivi come, ad esempio, enzimi dipendenti da *cluster* ferro-zolfo coinvolti nella catena di trasporto elettronico mitocondriale (complessi I e II), ribonucleotide reduttasi (implicato nella regolazione della replicazione del DNA attraverso la sintesi di deossinucleotidi trifosfato) e la *cis*-aconitasi (enzima chiave nel ciclo dell'acido citrico); alte concentrazioni di NO possono inoltre interferire direttamente con il DNA cellulare causando rotture e frammentazioni. La combinazione di questi effetti sembra essere alla base dell'azione citostatica e citotossica dell'NO sui microrganismi patogeni e alcune cellule tumorali (68). Anche cellule non appartenenti al sistema immunitario possono essere indotte da citochine ad attivare iNOS e rilasciare quantità di NO sufficientemente alte da danneggiare le cellule vicine: in seguito alla stimolazione citochinica, ad esempio, le cellule endoteliali sono in grado di indurre la lisi delle cellule tumorali (68).

Gli alti livelli di NO prodotti dalle cellule attivate (per lo più macrofagi, neutrofilo e altre cellule non immunitarie) oltre ad essere tossici per patogeni indesiderati o cellule tumorali possono recare danno anche alle cellule sane; quando, per qualche ragione, l'espressione di iNOS "sfugge" al suo fine meccanismo di regolazione, l'abbondante quantità di NO prodotta in modo sregolato nello spazio e nel tempo, può indurre gravi danni infiammatori a tessuti e organi, talora risultanti in formazione di ulcere, in seguito agli effetti del radicale NO di per se stesso o alla reazione dell'NO con l'anione superossido ( $\text{O}_2^-$ ) e successiva formazione di perossinitriti ( $\text{ONOO}^-$ ) altamente tossici (68, 71). L'induzione dell'espressione di iNOS e gli elevati livelli di NO sembrano essere implicati nello sviluppo di numerose condizioni patologiche tra cui molti disordini infiammatori e autoimmuni (caratterizzati da un'abbondanza di macrofagi e neutrofilo attivati) e alcune patologie neurodegenerative di origine infiammatoria (apoptosi dei neuroni  $\text{ONOO}^-$  indotta in seguito all'attivazione di astrociti e cellule della microglia). L'eccessiva produzione di NO in seguito all'attività di iNOS gioca un ruolo cruciale anche nello shock settico, condizione solitamente iniziata dalla presenza di endotossine batteriche nel circolo sistemico e caratterizzata da massiva vasodilatazione delle arteriole periferiche, danno microvascolare e ipotensione (principalmente dovuta alla produzione eccessiva iNOS-mediata di NO nella parete vascolare) (68). Il ruolo dell'isoforma inducibile di NOS nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare rimane ancora da chiarire.

La **NOS endoteliale** è il principale regolatore del tono vascolare in condizioni basali; è principalmente espressa nelle cellule endoteliali (Fig. 17) ma è stata identificata anche nei monociti, nelle piastrine, negli eritrociti, in alcuni neuroni del cervello, nel trofoblasto

della placenta umana e nelle cellule epiteliali del tubulo renale LLC-PK<sub>1</sub>. Nel cuore questo isoenzima è espresso a livello dell'endotelio endocardico e dei vasi coronarici (inclusi capillari e venule), nei cardiomiociti e nel tessuto di conduzione cardiaco specializzato (68, 71). eNOS e nNOS costituiscono le due isoforme di ossido nitrico sintasi costitutivamente espresse in molti tipi cellulari e tissutali e garantiscono la produzione di quantità minime “fisiologiche” o “toniche” di NO (tipicamente inferiori a 50 nM).

Similmente alla nNOS, la calmodulina Ca<sup>2+</sup>-attivata risulta importante per la regolazione dell'attività di eNOS: questa isoforma catalizza infatti la sintesi dell'NO in un modo “pulsatile” con marcati incrementi nell'attività in seguito ad aumenti della concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup>, il quale induce il *binding* della calmodulina all'enzima. Attualmente si conoscono numerose proteine in grado di interagire con eNOS e regolarne l'attività come, ad esempio, la proteina *heat shock* 90 (hsp90), modulatore allosterico attivante e promuovente il *recoupling* enzimatico o la proteina delle caveolae caveolina-1 che interagisce con la frazione di eNOS localizzata nelle caveolae, mantenendola in uno stato inattivo. Il legame della calmodulina e della proteina hsp90 alla ossido nitrico sintasi endoteliale può dislocare la caveolina-1 dall'enzima che viene rilasciato nel citoplasma e attivato (68).

La eNOS sembra essere attivata anche da stimoli che non inducono sostenuti incrementi nella concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup>, tra i quali lo shear stress fluidico è stato maggiormente caratterizzato e sembra indurre la fosforilazione dell'enzima. La NOS endoteliale può essere fosforilata su molti residui di serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr); la fosforilazione in Ser1177 aumenta la sensibilità dell'enzima al Ca<sup>2+</sup> costituendo così un meccanismo di attivazione aggiuntivo e indipendente. La fosforilazione di eNOS può essere mediata dall'attività di numerose protein-chinasi come Akt (il solo regolatore critico della funzione di eNOS), AMPK (*AMP-activated protein kinase*), CaMKII (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*), PKA (*protein kinase A*, principalmente attivata da *shear stress*) (68). La Thr495 tende ad essere fosforilata in assenza di stimolazione, per lo più dall'attività della PKC (*protein kinase C*); tale fosforilazione sembra interferire con il *binding* della calmodulina alla NOS endoteliale in quanto la defosforilazione di questo residuo viene indotta da stimoli associati ad aumenti delle concentrazioni intracellulari di Ca<sup>2+</sup> e incremento dell'attività di eNOS (68).

La NOS endoteliale sembra essere un regolatore omeostatico di numerose funzioni cardiovascolari essenziali; l'NO eNOS-derivato induce **dilatazione di tutti i tipi di vasi sanguigni** agendo sulle cellule muscolari lisce della media vascolare ed è un **potente inibitore dell'aggregazione e adesione piastrinica** all'endotelio vascolare. Con la sua produzione di NO, eNOS svolge dunque un ruolo importante nella **protezione dalla trombosi** e nella **prevenzione del rilascio del PDGF** con conseguente inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce e della produzione di molecole della matrice extracellulare. Questo enzima è inoltre fondamentale nel **remodelling vascolare adattativo** ai cambiamenti cronici del flusso ematico (68).

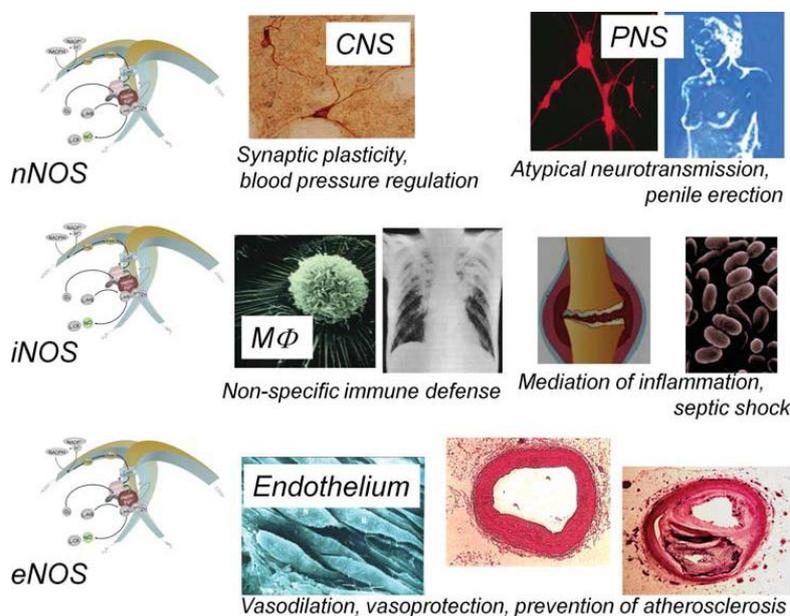
L'NO prodotto dall'endotelio può essere considerato un **fattore “anti-aterosclerotico”**; sembra infatti essere coinvolto nel **controllo dell'espressione di geni implicati nell'aterogenesi** e può anche **inibire l'adesione dei leucociti alla parete vascolare**

(evento precoce nello sviluppo dell'aterosclerosi); esercita inoltre **effetti anti-infiammatori vascolari** sopprimendo l'apoptosi delle cellule endoteliali in risposta a citochine pro-infiammatorie e altri fattori quali ROS (*Reactive Oxygen Species*) (68).

L'ossido nitrico è stato inoltre mostrato **inibire la sintesi del DNA e i processi mitotici e proliferativi delle cellule muscolari lisce vascolari**; in questo modo potrebbe prevenire ulteriormente la formazione di placche fibrose nel processo aterogenetico (68).

L'NO eNOS-derivato sembra giocare un ruolo critico anche nell'angiogenesi post-natale attraverso la mediazione di segnali a valle di fattori angiogenici ed è coinvolto inoltre nello **sviluppo e morfogenesi polmonare**, stimolando la formazione della rete vascolare polmonare. Gli effetti positivi dell'NO sulla sopravvivenza delle cellule endoteliali sembrano ulteriormente contribuire agli **effetti pro-angiogenici**.

L'espressione di eNOS nelle cellule stromali del midollo osseo sembra essere importante per la **mobilizzazione e "reclutamento"** ai siti vascolari di **cellule staminali e progenitrici endoteliali** e conseguente neovascolarizzazione (68).



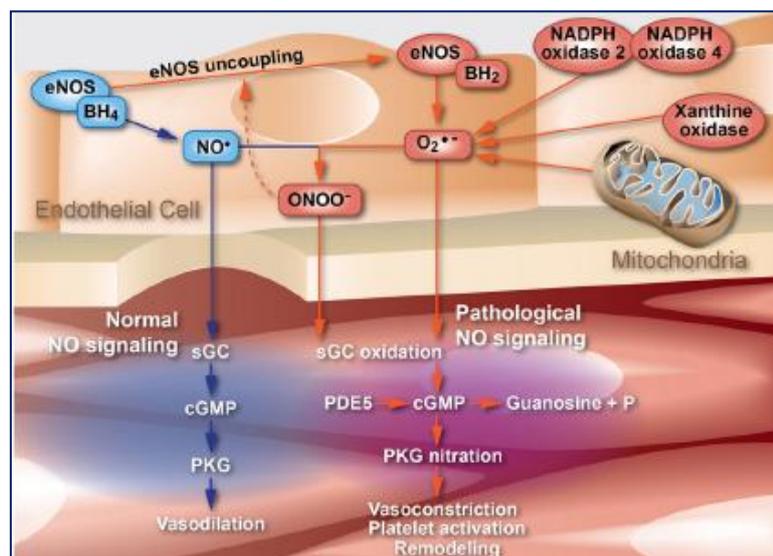
**Figura 17. Principali funzioni e localizzazione delle diverse isoforme di NOS. nNOS (NOS neuronale), iNOS (NOS inducibile), eNOS (NOS endoteliale), CNS (sistema nervoso centrale), PNS (sistema nervoso periferico), MΦ (macrofagi). Förstermann U and Sessa WC, *European Heart Journal*, 2012.**

### 1.3.4.2 Disfunzione endoteliale, eNOS *uncoupling* e stress ossidativo.

Pazienti con fattori di rischio cardiovascolare, patologie vascolari, ipertensione arteriosa polmonare mostrano segni di **disfunzione endoteliale** che si manifestano per lo più come una scarsa capacità dell'endotelio di generare quantità adeguate di ossido nitrico bioattivo e conseguente compromissione delle capacità vasodilatatorie NO-mediate.

Fattori di rischio cardiovascolare e patologie vascolari risultano spesso associati anche ad aumenti della produzione di ROS; tra i numerosi sistemi enzimatici potenzialmente coinvolti nella generazione di ROS nella parete vascolare (NADPH ossidasi, xantina ossidasi, enzimi della catena respiratoria mitocondriale), **il disaccoppiamento di eNOS** (eNOS *uncoupling*) sembra giocare un ruolo particolarmente importante.

In condizioni fisiopatologiche, gli elevati livelli di stress ossidativo possono indurre un aumento del *rate* di degradazione dell'NO in seguito a reazione con l'anione superossido ( $O_2^-$ ). Lo stress ossidativo sembra inoltre essere causa della conversione dell'attività di eNOS da enzima deputato alla sintesi di NO ad un enzima in grado di generare  $O_2^-$ ; un processo tipicamente denominato “*eNOS uncoupling*” (Fig. 18) in cui eNOS risulta caratterizzata da modificazioni nella struttura quaternaria con una riduzione dell'assemblaggio dell'omodimero in favore di una struttura monomeric



**Figura 18. eNOS uncoupling.** Sintesi eNOS-mediata di NO nell'endotelio normale (sx, in blu) e nell'endotelio disfunzionale (dx, in rosso): un endotelio danneggiato produce generalmente una maggiore quantità di  $O_2^-$  rispetto all'endotelio in condizioni normali. Rappresentazione schematica della possibile interazione del disaccoppiamento di eNOS, ROS (specie reattive dell'ossigeno) e guanilatociclastasi solubile nella patogenesi di patologie vascolari.

Meccanismi implicati nel disaccoppiamento di eNOS includono l'**ossidazione della tetraidrobiopterina** ( $BH_4$ ), cofattore critico per l'enzima, **deplezione della L-arginina**, **accumulo delle metilarginine endogene** e **S-glutationilazione**.

Il perossinitrito ( $ONOO^-$ ), un componente altamente citotossico prodotto dalla reazione tra NO e  $O_2^-$ , può portare al disaccoppiamento della riduzione dell'ossigeno dalla generazione di NO nella eNOS; l'ossidazione o la rimozione del cofattore essenziale dell'enzima, la tetraidrobiopterina, o il danno ossidativo della struttura enzimatica a livello del sito di *binding* di L-arginina e  $BH_4$ , potrebbero essere la causa del disaccoppiamento di eNOS in presenza di  $ONOO^-$ . Il perossinitrito potrebbe infatti ossidare  $BH_4$  a  $BH_3$ , un radicale biologicamente inattivo; la sintesi dell'NO da parte di

eNOS sembra essere strettamente correlata con le concentrazioni intracellulari di BH<sub>4</sub>, i cui livelli sono bassi nei pazienti con disfunzione endoteliale (68).

In condizioni fisiopatologiche le concentrazioni plasmatiche di L-arginina (normalmente intorno alle 100 μmol/l) possono cadere bruscamente (meno di 60 μmol/l) e, generalmente, si assiste ad un accumulo intracellulare di L-arginina per un valore 10 volte superiore rispetto alle condizioni normali; le cellule endoteliali umane non dipendono dall'*uptake* di L-arginina dallo spazio extracellulare in quanto possono “reciclare” efficacemente la L-citrullina riconvertendola in L-arginina, oppure possono ottenere L-arginina in seguito alla proteolisi. Le arginasi presenti nelle cellule endoteliali possono competere con eNOS per il substrato, “affamando” l’enzima e disaccoppiandolo (aumento della produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup>), se altamente espresse. Oltre all’eccessiva attività arginasica, la quantità di L-arginina potrebbe essere ridotta nelle cellule endoteliali anche a causa della presenza di radicali “*scavenger*”, della cooperatività dei siti di *binding* di eNOS per L-arginina e BH<sub>4</sub> o della competizione della L-arginina con la dimetil-L-arginina asimmetrica (ADMA) per il *binding* al sito attivo dell’enzima (68).

L’ADMA è considerata un fattore di rischio per tutte le cause di mortalità cardiovascolare; è infatti un normale inibitore endogeno di eNOS ma, in concentrazioni elevate sembra indurne il disaccoppiamento. Lo stress ossidativo sembra aumentare l’attività dell’arginina-N-metiltransferasi (PRMT tipo I), enzima chiave per la produzione di ADMA, e ridurre l’attività della dimetilarginina dimetilaminoidrolasi (DDAH), deputato alla degradazione di ADMA, portando quindi ad un aumento delle concentrazioni di ADMA e eNOS *uncoupling* (68).

Nelle cellule endoteliali lo stress ossidativo può promuovere anche la S-glutationilazione di eNOS in corrispondenza di due residui altamente conservati di cisteina, fondamentali per la sua funzione; tale modificazione post-traduzionale determina una diminuzione reversibile della produzione di NO e un aumento della generazione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> con compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente (68).

Nell’endotelio disfunzionale il perossinitrito può essere protonato e formare acido perossinitrico (ONOOH) che, a basse concentrazioni, può andare incontro ad una rapida isomerizzazione e formare nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e un protone (H<sup>+</sup>). Tuttavia, ad alte concentrazioni, l’acido perossinitrico diffonde secondo gradiente di concentrazione dalle cellule endoteliali vascolari nel circolo sanguigno dove può essere scisso in radicale idrossile (OH) e radicale diossido di azoto (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), entrambi potenti ossidanti, oppure in ione nitronio (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>). Lo stress ossidativo generato dall’endotelio disfunzionale riduce quindi la biodisponibilità di NO nel sistema cardiovascolare, causa vasocostrizione dei capillari e aumenta la pressione sanguigna; i radicali liberi agiscono su numerosi componenti cellulari portando a inattivazione enzimatica, danno al DNA, perossidazione lipidica e danno alle membrane e possono quindi contribuire alla patogenesi di aterosclerosi, patologie cardiovascolari, neurologiche, polmonari e cancro.

### 1.3.5 Ruolo della troponina I cardiaca nella regolazione della funzione cardiaca contrattile.

La contrazione del muscolo striato è principalmente regolata dalla presenza di un particolare complesso proteico denominato “tropomiosina”, localizzato a livello dei filamenti sottili di actina; tale complesso è essenzialmente costituito da due componenti distinti: tropomiosina e troponina.

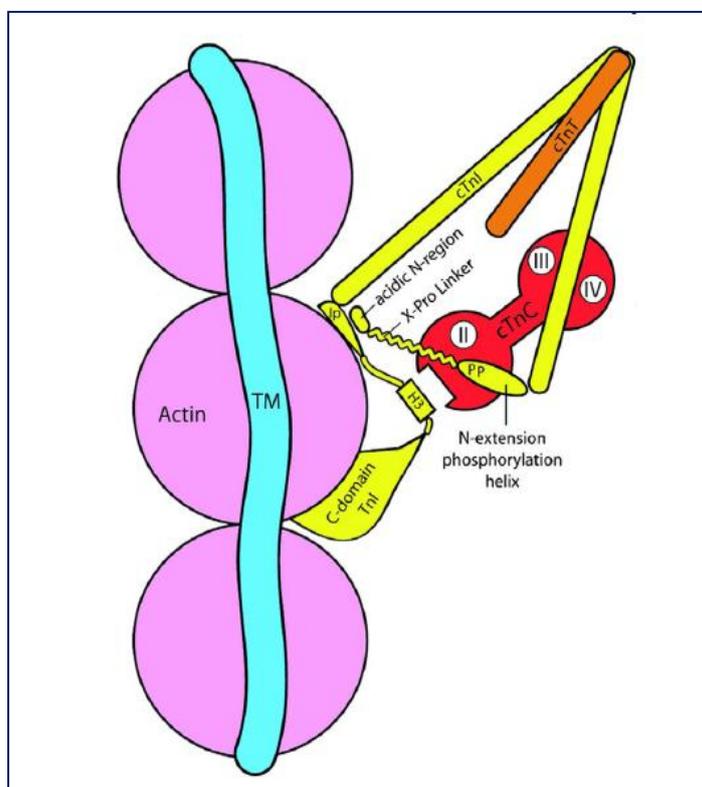
Il complesso della troponina è costituito da tre componenti, ognuno con una funzione specifica: la troponina C (TnC) lega il  $\text{Ca}^{2+}$  con alta affinità, la troponina I (TnI) inibisce l'attività ATP-asi della miosina e la troponina T (TnT) media il *binding* del complesso della troponina alla tropomiosina (72).

La **troponina I** costituisce dunque l'unità “inibitoria” del complesso della troponina, è pertanto associata ai filamenti sottili di actina e ostacola le interazioni actina-miosina attraverso l'inibizione dell'attività ATP-asi della miosina (73). Nel muscolo striato sono state descritte tre isoforme distinte della troponina I, codificate da tre geni differenti; due isoforme sono caratteristiche delle fibre muscolari scheletriche rapide e lente (fsTnI, *fast skeletal*, e ssTnI, *slow skeletal*, rispettivamente) mentre una sola isoforma è espressa specificamente nel muscolo cardiaco (cTnI, *cardiac*). La troponina I è costituita da circa 181-211 residui aminoacidici e l'isoforma cardiaca presenta una caratteristica estensione di circa 30 residui all'estremità N-terminale, assente nelle altre isoforme (72).

L'espressione dei geni della troponina I è strettamente legata ai diversi stadi dell'ontogenesi: entrambe le isoforme cTnI e ssTnI sono espresse nel cuore fetale umano, dopo la nascita, invece, la il gene della ssTnI viene “spento” mentre viene potenziata l'espressione dell'isoforma cardiaca che diventa progressivamente l'isoforma esclusiva del cuore (dal nono mese di vita in poi) (72).

La cTnI gioca un ruolo importante nel controllo e nella modulazione delle dinamiche sarcomeriche e presenta una struttura bastoncellare e flessibile costituita da alcune regioni distinte: un'estensione N-terminale cardiaco-specifica di circa 30 residui aminoacidici, un “braccio IT”, una regione inibitoria (Ip), una “*switch region*” (H3) e un dominio C-terminale mobile (Fig. 19). La regione del “braccio IT” è caratterizzata dalla presenza di due  $\alpha$ -eliche che interagiscono con il lobo C della TnC e con l' $\alpha$ -elica del dominio C-terminale della TnT; fatta eccezione per il “braccio IT”, la struttura della cTnI appare flessibile e la “*switch region*” e il dominio mobile al C-terminale possono subire transizioni strutturali a seconda dello stato del  $\text{Ca}^{2+}$  legato al sito regolatorio specifico di *binding* nel lobo N della TnC (74). Durante la fase diastolica (rilassamento) la regione inibitoria e il dominio mobile C-terminale della cTnI interagiscono con l'actina inibendo la formazione dei *cross-bridges* actina-miosina; in particolare, il *binding* della regione inibitoria sembra indurre un cambiamento strutturale nell'actina impedendo in questo modo le interazioni forti actina-miosina, mentre il dominio mobile C-terminale potrebbe contribuire ad incrementare la concentrazione locale di molecole di cTnI sull'actina facilitando l'interazione della regione inibitoria (74). Il *binding* del  $\text{Ca}^{2+}$  al sito regolatorio della TnC induce l'esposizione di una regione idrofobica nel lobo N rendendo così possibile il legame della “*switch region*” (H3) della cTnI alla TnC con conseguente distacco della regione inibitoria e del dominio mobile dall'actina. La regione inibitoria

subisce in questo modo uno *switch* conformazionale, assume una struttura più allungata che consente l'interazione della cTnI con la regione *linker* centrale della TnC con conseguente stabilizzazione dello stato attivo del complesso troponinico. La regione del “braccio IT” sembra essere coinvolta nell'attivazione dei miofilamenti in seguito alla formazione dei *cross-bridges* actina-miosina (74).



**Figura 19. Modello raffigurante le interazioni dei componenti del complesso troponinico nello stato diastolico (rilassamento), in presenza della fosforilazione (PP) dei residui Ser23/Ser24 nell'elica di fosforilazione dell'estensione N-terminale cardiaco-specifica della cTnI, costituita inoltre da un'elica linker ricca in prolina e una regione acida. Tm, tropomiosina, cTnI, troponina I cardiaca, cTnT, troponina T cardiaca, H3, “switch region” legante la cTnC, Ip, regione inibitoria. Il dominio (II) della cTnC corrisponde al dominio regolatorio (lobo-N) di binding del  $Ca^{2+}$ . Durante la diastole la regione N-terminale fosforilata della cTnI interagisce con la regione inibitoria. Solaro RJ et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008.**

Normalmente la cTnI gioca un ruolo importante nel controllo della contrattilità cardiaca, inibendo le interazioni actomiosiniche durante la fase diastolica, in presenza di bassi livelli di  $Ca^{2+}$  intracellulare. Durante la sistole, il consistente aumento della concentrazione citosolica e il successivo *binding* del  $Ca^{2+}$  alla TnC inducono modificazioni conformazionali nella struttura della cTnI con conseguente annullamento dell'influenza inibitoria, promozione della formazione dei *cross-bridges* actomiosinici e contrazione miocardica. Con il declino dei livelli citosolici del  $Ca^{2+}$  ai valori diastolici e successiva dissociazione del  $Ca^{2+}$  dalla TnC, l'azione inibitoria della cTnI sull'interazione actina-miosina viene ripristinata; questa proteina costituisce dunque un regolatore chiave nella contrazione e rilassamento del muscolo cardiaco, fungendo da *linker* tra il *binding*  $Ca^{2+}$ -TnC e l'attivazione delle reazioni di *cross-bridge* con i filamenti sottili (73).

In condizioni fisiopatologiche, alterazioni della funzione cardiaca contrattile potrebbero essere legate a cambiamenti nella risposta dei miofilamenti al  $Ca^{2+}$  e/o a cambiamenti nell'intensità o durata delle correnti cellulari di  $Ca^{2+}$ , il cui ruolo centrale nella regolazione della contrazione e rilassamento muscolare risulta peraltro ben riconosciuto. Attualmente, tuttavia, è stato dimostrato come anche le proprietà dei miofilamenti possano contribuire significativamente alla modulazione dinamica della funzione

contrattile: un'alterata funzione dei filamenti sottili potrebbe per esempio giocare un ruolo importante nella disfunzione contrattile associata a scompenso cardiaco (73).

La fosforilazione, mediata da numerose protein-chinasi differenti, della cTnI in specifici residui di serina e treonina costituisce uno dei principali meccanismi fisiologici responsabili delle alterazioni delle proprietà dei miofilamenti; cambiamenti nello stato di fosforilazione della cTnI sono stati infatti riportati in alcuni cuori umani scompensati e potrebbero essere il risultato di uno squilibrio tra attività chinasiche e fosfatasiche (73). Numerosi studi hanno dimostrato come la **fosforilazione PKA-mediata dei siti Ser23 e Ser24** presenti nell'estensione N-terminale di 30 residui aminoacidici, caratteristica dell'isoforma cardiaca della troponina I, sia associata ad **un'attenuazione della risposta sarcomerica al  $Ca^{2+}$**  e ad un **incremento delle cinetiche di formazione dei *cross-bridges***, conferendo così alla cTnI un ruolo critico nella regolazione fisiologica della funzione cardiaca contrattile (74). La fosforilazione della cTnI ai siti Ser23/Ser24 sembra diminuire la sensibilità dei miofilamenti al  $Ca^{2+}$  risultando quindi un fattore significativo nel rilassamento cardiaco, una modificazione post-traduzionale importante per il normale mantenimento della forza e della frequenza delle risposte ventricolari. Gli effetti funzionali di tale fosforilazione potrebbero manifestarsi in seguito all'alterazione delle interazioni inter- e intra-molecolari dell'isoforma cardiaca: la principale interazione inter-molecolare è l'interazione relativamente debole della cTnI non-fosforilata con il dominio regolatorio (lobo N) della TnC, responsabile dell'alta affinità del lobo N della TnC per il *binding* del  $Ca^{2+}$ . La fosforilazione PKA-mediata della cTnI ai siti Ser23/Ser24 indebolisce ulteriormente l'interazione cTnI (estensione N-terminale cardiaco-specifica)-TnC (lobo N) con conseguente riduzione dell'affinità del lobo N per il  $Ca^{2+}$  e aumento della dissociazione del  $Ca^{2+}$  dal complesso troponinico. L'estensione N-terminale fosforilata (Ser23/Ser24) si dissocia dunque dal lobo N della TnC risultando così più flessibile e in grado di interagire con la regione inibitoria: la dissociazione del  $Ca^{2+}$  dal dominio regolatorio della TnC induce un cambiamento conformazionale della regione inibitoria con conseguente indebolimento dell'interazione di tale regione con l'actina dei filamenti sottili e alterazione delle reazioni di formazione dei *cross-bridges* (74).

In condizioni patologiche quali l'ipertrofia ventricolare cronica e lo scompenso cardiaco, la disfunzione contrattile è stata da sempre associata ad alterazioni nell'espressione e nelle proprietà di proteine chiave nella regolazione dell'omeostasi intracellulare di  $Ca^{2+}$  (per lo più SERCA-ATPasi e scambiatore  $Na^+/Ca^{2+}$ ); attualmente, tuttavia, numerosi studi hanno fornito evidenza di come anche anomalie patologiche nelle proprietà dei miofilamenti possano essere implicate nello sviluppo di un fenotipo disfunzionale. Alterazioni di alcune delle principali proteine contrattili, come la miosina con la sua catena pesante e leggera e l'isoforma cardiaca della TnI, sembrano giocare un ruolo significativo nella riduzione dell'attività ATPasica miofibrillare e della forza contrattile, diminuzione della velocità di accorciamento muscolare e frequenza di formazione dei *cross-bridges*, anomalie osservate nell'ipertrofia ventricolare "maladattativa" e scompenso cardiaco (73). Un incremento della fosforilazione PKA-mediata della cTnI ai siti Ser23/Ser24 potrebbe determinare dunque una drastica riduzione della sensibilità dell'apparato contrattile al  $Ca^{2+}$  con conseguente diminuzione della tensione contrattile e dell'attività ATPasica, effetti probabilmente risultanti dalla ridotta affinità della cTnI-

fosforilata per la TnC, la quale lega il  $\text{Ca}^{2+}$  con minore affinità. La fosforilazione dei residui Ser23/Ser24 induce dunque significative modificazioni conformazionali nella struttura della cTnI indebolendone l'interazione con la TnC e il *binding* del  $\text{Ca}^{2+}$  ai siti regolatori della TnC con conseguente desensibilizzazione dei miofilamenti al  $\text{Ca}^{2+}$  e disfunzione contrattile (72).

## 1.4 MODELLI ANIMALI DI IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE.

Attualmente sono disponibili diversi modelli animali di ipertensione polmonare tra i quali i più comunemente utilizzati sono il **modello di ipossia cronica** e il **modello di danno da monocrotalina (MCT)**; questi modelli sono stati largamente impiegati nella ricerca sperimentale e clinica dell'ipertensione polmonare apportando un significativo contributo all'ampliamento e progressione delle conoscenze in merito ai molteplici meccanismi eziopatogenetici potenzialmente coinvolti in questa condizione patologica. Tuttavia, la possibilità di considerare questi modelli animali modelli effettivi di ipertensione arteriosa polmonare umana costituisce ancora oggi un argomento largamente dibattuto (75).

### 1.4.1 **Modelli animali “classici”: ipossia cronica.**

Il modello dell'ipossia cronica rappresenta uno dei modelli animali di ipertensione polmonare più comunemente utilizzati ed è ottenuto in seguito all'esposizione degli animali (per lo più ratti o topi) a condizioni di ipossia cronica per un periodo di due-quattro settimane, in un ambiente normobarico (mediante inalazione di una miscela gassosa costituita dall'80% di azoto e 10% di ossigeno) o in ambiente ipobarico (mantenendo gli animali in una cameretta con pressione pari a 0.5 atmosfere) (76). Queste condizioni inducono un **progressivo incremento della pressione arteriosa polmonare media** da 12-15 a 30-35 mmHg, **e dell'indice di Fulton** (rapporto tra il peso del ventricolo destro e il peso del ventricolo sinistro con il setto) da 0.25% a 0.5%. L'aumento della pressione arteriosa polmonare e l'ipertrofia del ventricolo destro raggiungono i valori massimi dopo 3-4 settimane di ipossia e sono **facilmente reversibili** in seguito all'inalazione di aria normale mantenuta per un periodo continuo di 3 settimane (76). La **prevedibilità** e l'**alta riproducibilità** in ciascuna specie animale selezionata rendono questo **modello particolarmente vantaggioso** anche se si registra comunque un'**ampia variabilità** inter- e intra-specifica nonché correlata all'età e allo sviluppo dell'animale (con gli individui più giovani più sensibili rispetto agli individui adulti) nelle risposte all'ipossia cronica (75). In tutti i mammiferi impiegati fino ad oggi **l'ipertensione polmonare** indotta da ipossia cronica è **lieve** associata a modificazioni strutturali molto simili, sebbene di proporzioni diverse: muscolarizzazione precoce di piccole arterie della parete alveolare, normalmente non muscolari, rapida crescita ipertrofica delle cellule muscolari lisce delle pareti di arteriole precedentemente non-muscolarizzate e ispessimento delle pareti delle arterie polmonari pre-capillari muscolarizzate (marcata ipertrofia e iperplasia delle cellule muscolari lisce mediali). In

questo processo di *remodeling* vascolare polmonare indotto da ipossia, l'infiammazione sembra giocare un ruolo significativo coinvolgendo per lo più citochine pro-infiammatorie, chemochine, molecole di adesione e cellule mononucleate; in questo modello si osserva inoltre un significativo ispessimento e fibrosi delle larghe arterie polmonari prossimali che appaiono particolarmente rigide. Tuttavia, le alterazioni ultrastrutturali che caratterizzano il primo gruppo di ipertensione polmonare non sono presenti. La maggior parte degli animali esposti ad ipossia cronica sviluppa un'**ipertrofia ventricolare destra lieve** senza scompenso. Dal punto di vista molecolare, nel tessuto polmonare dei ratti esposti ad ipossia cronica si assiste generalmente ad un aumento dell'espressione di geni coinvolti nella sopravvivenza e proliferazione delle cellule endoteliali (es.: PI3K) e diminuzione dell'espressione di geni pro-apoptotici.

Nonostante le caratteristiche istopatologiche simili, soprattutto a carico dei vasi polmonari, l'ipertensione polmonare e il *remodeling* vascolare polmonare e ventricolare destro indotti dall'esposizione cronica all'ipossia possono regredire completamente in seguito al ritorno degli animali alle condizioni fisiologiche, caratteristica limitante del modello perché assolutamente assente nei pazienti affetti da ipertensione arteriosa polmonare (fatta eccezione per quelle persone affette da sindrome di Monge le quali sviluppano ipertensione polmonare alle alte altitudini e migliorano notevolmente con il ritorno al livello del mare) (75).

Tutti i modelli animali di ipossia cronica mostrano dunque **fibrosi intinale reversibile e non presentano le tipiche lesioni plessiformi** caratteristiche dell'ipertensione arteriosa polmonare umana; inoltre, la gravità dei cambiamenti strutturali osservati nei polmoni ipossici può essere associata a molteplici fattori oltre che all'ipossia (es.: emodinamiche, infiammazione..). Rimane ancora oggi materia di discussione il fatto che l'ipossia cronica possa portare a perdita o rarefazione dei microvasi polmonari, condizione normalmente ritrovata nell'ipertensione arteriosa polmonare umana (75). I modelli di ipertensione polmonare indotta da ipossia cronica nei roditori potrebbero essere considerati come modelli più per lo studio delle forme di ipertensione polmonare umana meno severe rispetto all'ipertensione arteriosa polmonare, come l'ipertensione polmonare associata a condizioni ipossiche quali patologie del parenchima polmonare, sindrome delle apnee notturne, patologie polmonari cronico-ostruttive o l'ipertensione polmonare lieve che si riscontra negli abitanti delle alte quote (75).

Questo modello non si rivela dunque un modello valido per lo studio pre-clinico dell'ipertensione polmonare appartenente al primo gruppo (ipertensione arteriosa polmonare).

#### **1.4.2 Modelli animali “classici”: danno da monocrotalina (MCT).**

Un altro modello di ipertensione polmonare comunemente utilizzato consiste nel trattamento degli animali (per lo più ratti o cani) con monocrotalina (MCT), un alcaloide pirrolizidinico tossico presente nello stelo, nelle foglie e nei semi della pianta *Crotalaria spectabilis*, tipicamente diffusa nelle regioni tropicali e sub-tropicali (75, 76).

Una volta ingerita o somministrata, la monocrotalina è soggetta a trasformazione epatica per azione del sistema monossigenasico del citocromo P450 (CYP450) con formazione del pirrolo monocrotalina, il metabolita attivo che raggiunge il parenchima polmonare attraverso il circolo sanguigno e induce danno vascolare (76).

L'esistenza di una stretta associazione tra l'ingestione di monocrotalina e lo **sviluppo progressivo di ipertensione polmonare** è stata per la prima volta descritta più di quarant'anni fa, in seguito a ripetute somministrazioni orali dell'alcaloide in ratti di laboratorio (75). Attualmente, questo modello animale di ipertensione polmonare viene per lo più ottenuto mediante singola iniezione subcutanea o intraperitoneale di monocrotalina, risultando così un modello estremamente semplice da riprodurre e, quindi, tecnicamente attraente, disponibile per un ampio spettro di ricercatori (75).

Una singola somministrazione di monocrotalina (generalmente mediante iniezione subcutanea alla concentrazione di 60 mg/kg) o del suo metabolita attivo, risulta dunque sufficiente ad indurre ipertensione arteriosa polmonare. Le lesioni iniziali osservate in questi **modelli animali progressivi** consistono generalmente in una **degenerazione o iperplasia endoteliale, ipertrofia della muscolatura liscia mediale ed edema dell'avventizia** con conseguente **aumento della resistenza vascolare** e **sovraccarico di pressione del ventricolo destro** (76). Rispetto all'ipossia cronica, la monocrotalina sembra indurre un aumento più spinto della pressione arteriosa polmonare (da 50 fino a 80 mmHg) e l'ipertensione arteriosa polmonare nonché la distrofia cardiaca ad essa associate risultano **processi irreversibili**; tuttavia, si assiste frequentemente ad un **elevato grado di mortalità degli animali** a circa 4 settimane dall'iniezione (76).

Sfortunatamente, esiste un'ampia variabilità tra le diverse specie, razze e, talvolta, anche tra gli individui della stessa specie e razza, nelle risposte alla monocrotalina, a causa della presenza di differenze nel metabolismo epatico associate al citocromo P-450 (75, 76). Attualmente, il ratto rappresenta la specie più comunemente utilizzata per lo studio dell'ipertensione polmonare indotta da monocrotalina; nei topi, sono stati invece ottenuti risultati altamente variabili anche in seguito alla somministrazione del pirrolo attivo.

Nei mammiferi di maggiori dimensioni, come i cani, l'ipertensione polmonare può essere indotta soltanto mediante iniezione diretta del metabolita tossico diidromonocrotalina, probabilmente perché il fegato di questi animali non possiede i componenti enzimatici necessari per la conversione della monocrotalina nel pirrolo attivo. Nei giovani cani l'iniezione diretta del pirrolo monocrotalina porta dunque a sviluppo di ipertensione polmonare con **significativo remodeling vascolare delle piccole arterie polmonari** associato a **proliferazione della neointima** (75, 76).

L'**infiltrazione massiva di cellule mononucleate** nelle regioni perivascolari delle arteriole e arterie muscolari che accompagna l'ipertensione arteriosa polmonare indotta da monocrotalina contribuisce a rendere questo modello un **modello standard** per l'**ipertensione arteriosa polmonare idiopatica** (76).

Sebbene non sia ancora chiaro il meccanismo esatto mediante il quale la monocrotalina riesca ad indurre ipertensione polmonare, si pensa che possa causare un danno diretto a livello dell'endotelio con conseguente sviluppo e progressione di ipertensione polmonare severa e, talvolta, letale. Secondo altri ricercatori, tuttavia, il rimodellamento vascolare e l'ipertensione polmonare sarebbero attribuibili, in questi modelli animali, all'accumulo

precoce e, spesso drammatico, di cellule infiammatorie mononucleate nell'avventizia dei piccoli vasi intra-acinari (75). Di conseguenza, molti ritengono che l'infiammazione dell'avventizia e, in particolare, l'accumulo di cellule macrofagiche, giochino un ruolo più rilevante nella patogenesi dell'ipertensione polmonare rispetto al danno endoteliale (75).

Attualmente, tuttavia, si discute sulla possibilità di considerare questo modello come un modello effettivo di ipertensione arteriosa polmonare: sono state infatti identificate **alterazioni e infiltrati infiammatori anche nelle piccole vene** e sembra che la maggior parte degli animali trattati con monocrotalina sviluppi **danno epatico e renale** fino alla **patologia epatica veno-occlusiva** in alcuni casi.

D'altra parte, il modello animale di ipertensione polmonare indotta da monocrotalina costituisce un modello importante per lo studio dell'**ipertrofia** e **disfunzione ventricolare destra**, due aspetti importanti nello studio dell'ipertensione polmonare e particolarmente sviluppati in questi animali. La monocrotalina ad alte dosi sembra indurre un significativo incremento della pressione sistolica del ventricolo destro (fino a 80 mmHg, *overload* di pressione), a 5 settimane dall'iniezione, riducendo molto la sopravvivenza; tuttavia, la significativa miocardite biventricolare, causata da questo alcaloide pirrolizidinico, impedisce uno studio adeguato dell'ipertrofia/scompenso ventricolare destro, caratteristiche tipiche di un quadro severo di ipertensione polmonare (75).

A differenza di quanto accade nell'ipertensione arteriosa polmonare umana, i ratti trattati con monocrotalina non mostrano segni di lesioni intimali ostruttive nelle arterie polmonari periferiche; per questo motivo, nonostante l'importante e largo utilizzo della monocrotalina nel produrre modelli sperimentali di ipertensione polmonare, tale modello potrebbe essere considerato più un modello di intossicazione acuta, caratterizzato dalla presenza di un danno acuto/sub-acuto della vascolatura periferica del polmone e di altri organi (per lo più reni, fegato e cuore), piuttosto che un modello di ipertensione arteriosa polmonare paragonabile a quella dell'uomo. Il rimodellamento vascolare polmonare indotto dalla monocrotalina sembra inoltre reversibile: attualmente più di 30 differenti agenti farmacologici sembrano in grado di prevenire e, in alcuni casi, annullare, l'ipertensione polmonare prodotta dalla monocrotalina.

**La particolare natura acuta/sub-acuta e la totale reversibilità delle alterazioni strutturali prodotte**, rendono questo modello molto diverso dalla natura dell'ipertensione arteriosa polmonare umana, e pertanto non sempre idoneo allo studio di tale condizione patologica (75).

### **1.4.3 Modelli animali “classici”: legatura del dotto arterioso.**

La legatura del dotto arterioso negli animali (per lo più agnelli), eseguita durante la vita fetale, induce ipertensione polmonare cronica nel feto e costituisce quindi un **modello di ipertensione polmonare persistente del neonato**, una sindrome clinica caratterizzata da elevata resistenza vascolare polmonare che si traduce in uno *shunt* destro-sinistro attraverso il *foramen* ovale e il dotto arterioso con conseguente ipossiemia severa (76).

Tale modello è caratterizzato da una persistenza della morfologia fetale del circolo polmonare, ipertensione polmonare severa e ipertrofia mediale.

#### **1.4.4 Modelli genetici: ratti con ipertensione polmonare spontanea.**

Data l'importanza della componente genetica in alcuni casi di ipertensione polmonare, sono stati recentemente sviluppati alcuni modelli animali con lo scopo di valutare il contributo di molteplici fattori genetici allo sviluppo di ipertensione arteriosa polmonare. I ratti **Fawn Hooded (FHR)** costituiscono un particolare ceppo genetico in cui gli adulti sviluppano ipertensione arteriosa polmonare al livello del mare con peggioramento della patologia in seguito ad esposizione a ipossia moderata. Tuttavia, i ratti FHR neonati esposti ad ipossia moderata sviluppano ipertensione arteriosa polmonare severa con compromessa densità alveolare e vascolare polmonare (76). Come per gli uomini, nei ratti FHR l'ipertensione arteriosa polmonare risulta associata ad **elevati livelli di endotelina, aumentata vasocostrizione indotta da serotonina, compromissione del pool di riserva piastrinico ed eccessiva proliferazione delle cellule muscolari lisce dell'arteria polmonare** (76).

#### **1.4.5 Modelli genetici: animali geneticamente modificati.**

Sono attualmente disponibili per gli studi clinici e sperimentali sull'ipertensione arteriosa polmonare anche modelli animali ottenuti in seguito alla manipolazione di geni coinvolti nella patobiologia di questa condizione clinica. Sono stati quindi sviluppati ratti con *overespressione* del gene per l'angiopoietina-1, associata con ipertensione arteriosa polmonare e ipertrofia mediale, e numerosi modelli murini opportunamente ingegnerizzati. Topi mutanti con ridotta espressione del gene per il trasportatore della serotonina (5-HTT) mostrano emodinamiche normali in condizioni normali di ossigenazione ma aumentano considerevolmente la loro vasoreattività in condizioni ipossiche ma non sviluppano ipertensione arteriosa polmonare neppure in seguito ad ipossia cronica (da 2 a 5 settimane di esposizione). Al contrario, i topi mutanti *overesprimenti* il gene 5-HTT nella muscolatura liscia sono caratterizzati da ridotta vasoreattività all'ipossia, sviluppano ipertensione arteriosa polmonare in condizioni normali di ossigenazione e, in condizioni ipossiche, mostrano una forma più severa della patologia rispetto ai topi di controllo (76).

Topi eterozigoti per il gene codificante il recettore BMPR-2 presentano parametri emodinamici normali in condizioni fisiologiche di ossigenazione ma, in seguito ad infusione continua di serotonina, sviluppano ipertensione arteriosa polmonare che appare molto più severa in condizioni ipossiche. Tuttavia, l'*overespressione* di BMPR-2 non sembra migliorare l'ipertensione arteriosa polmonare indotta da monocrotalina (76).

Topi con mutazioni nel gene codificante il recettore 1B della serotonina presentano una ridotta vasoreattività polmonare all'ipossia e non sembrano sviluppare ipertensione arteriosa polmonare dopo esposizione ad ipossia cronica (76).

Topi mutanti *loss of function* per il fattore VEGF-B (fattore di crescita dell'endotelio vascolare di tipo B) sono meno suscettibili all'ipertensione arteriosa polmonare da ipossia (76).

Considerata la particolare implicazione della disfunzione endoteliale nella patobiologia dell'ipertensione arteriosa polmonare, sono stati sviluppati differenti modelli di topi geneticamente modificati per lo studio di questo processo disfunzionale; topi *knockout* per la triptofano idrossilasi, per esempio, tendono a non sviluppare ipertensione arteriosa polmonare, anche in condizioni ipossiche (76).

Topi mutanti *loss of function* per eNOS sono più sensibili all'ipertensione arteriosa polmonare da ipossia rispetto ai controlli, mentre l'*overespressione* della iNOS o della prostaciclina sintasi protegge contro l'ipertensione arteriosa polmonare indotta da ipossia o monocrotalina (76).

## **1.5. LO SHUNT AORTO-CAVALE COME MODELLO DI SOVRACCARICO DI VOLUME DEL VENTRICOLO DESTRO E IPERTENSIONE POLMONARE.**

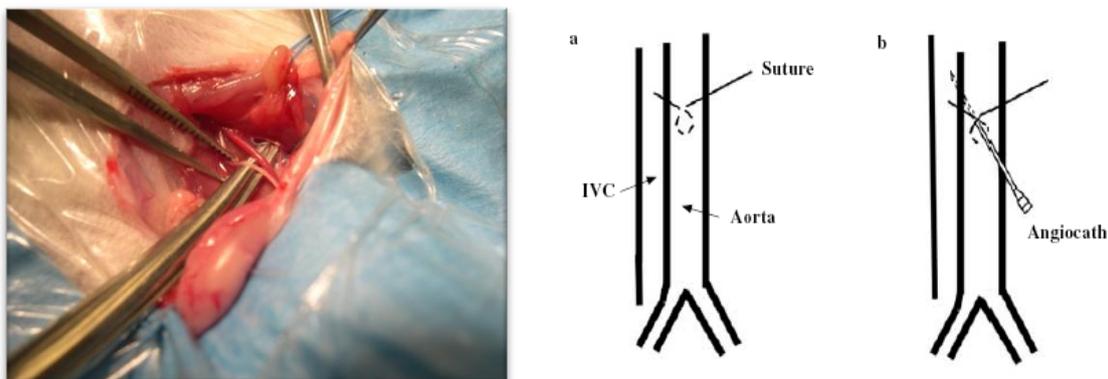
I modelli animali di ipertensione polmonare attualmente disponibili (per lo più i modelli classici di ipossia cronica e del danno da monocrotalina) sono stati largamente utilizzati nel campo della ricerca biomedica sperimentale ed hanno significativamente contribuito al miglioramento della comprensione di alcuni meccanismi fisiopatologici coinvolti nello sviluppo e progressione di questa condizione patologica. Questi modelli presentano però considerevoli limitazioni che li rendono inadeguati allo studio dell'ipertensione arteriosa polmonare nell'uomo; per questi motivi, diversi sforzi sono stati effettuati negli ultimi anni per migliorare i modelli classici o sviluppare modelli animali alternativi più "fedeli" alla patologia umana.

Il modello dello *shunt* aorto-cavale è stato recentemente preso in considerazione come possibile modello per lo studio dell'ipertensione arteriosa polmonare umana; tale modello risulta inoltre di particolare importanza in quanto consente di valutare anche i meccanismi adattativi messi in atto dal **ventricolo destro** in risposta al **sovraccarico di volume cronico**, un comportamento molto poco studiato se paragonato alla valutazione della risposta ventricolare destra al sovraccarico di pressione, ampiamente indagata in molteplici modelli animali di ipertensione polmonare.

Attualmente è noto come il **sovraccarico di volume acuto e subacuto del ventricolo destro** ne riduca significativamente la contrattilità con conseguente dilatazione della camera ventricolare (77).

Nel 1990 Garcia (78) descrisse per la prima volta un metodo relativamente semplice per la creazione di uno *shunt* aorto-cavale nei ratti; fino ad allora, infatti, modelli sperimentali simili venivano ottenuti con l'impiego di tecniche microchirurgiche particolarmente complesse e con elevati rapporti di mortalità. Il metodo di Garcia, ancora oggi il metodo di riferimento principale, prevede l'esposizione dell'aorta addominale e del tratto addominale della vena cava inferiore del ratto mediante una laparotomia mediana; dopo clampaggio aortico sottorenale, un angiocatetere (16 Gauge) viene quindi avanzato

attraverso la parete aortica e, successivamente, attraverso la parete cavale creando così una fistola. Il punto di entrata dell'angiocatetere sulla parete aortica viene infine chiuso mediante applicazione di una particolare colla biologica trenta secondi prima del declampaggio aortico (Fig. 20).



**Figura 20. Creazione della fistola aorto-cavale modificata nel ratto.**

L'applicazione della colla comportava tuttavia una serie di difficoltà tecniche a causa della formazione di aderenze addominali che impedivano la facile visualizzazione dei vasi addominali; in certi casi, inoltre, la colla veniva assorbita dalla parete aortica e cavale determinando la chiusura dello *shunt* stesso. Per questi motivi, la procedura è stata successivamente modificata e resa più semplice e veloce attraverso l'utilizzo di una borsa di tabacco al posto della colla e un angiocatetere di dimensioni leggermente più piccole (18 Gauge) (79). Tale modello è stato inizialmente considerato un modello di scompenso cardiaco dovuto a sovraccarico acuto di volume; la creazione di uno *shunt* di grosse dimensioni in un ratto di 200 g di peso porta infatti ad un sovraccarico acuto di volume a carico del ventricolo destro con precoce scompenso cardiaco. Successivamente, sono state valutate le alterazioni strutturali ed emodinamiche a livello del ventricolo destro in risposta al sovraccarico di volume cronico (1, 2, 4, 8 e 16 settimane dallo *shunt* aorto-cavale) (80). Con questo modello è stato possibile distinguere tre fasi differenti e progressive di rimodellamento strutturale e funzionale del ventricolo destro in seguito all'*overload* di volume cronico: una prima fase di sviluppo di ipertrofia con peggioramento della funzione sistolica e diastolica del ventricolo destro, una seconda fase intermedia in cui l'ipertrofia riesce a ridurre lo stress di parete con normalizzazione temporanea dei regimi pressori endocavitari e recupero transitorio della funzione sistolica e diastolica ventricolare destra, e, infine, un'ultima fase tardiva caratterizzata da significativa compromissione della funzione sistolica e diastolica fino allo scompenso cardiaco, in seguito al concomitante sviluppo di sovraccarico di pressione del ventricolo destro causato dall'incremento delle resistenze a vascolari polmonari. Un aumento della pressione nel circolo polmonare risulta in una riduzione della frazione d'eiezione e della gittata sistolica del ventricolo destro: come dimostrato nei modelli sperimentali di aumento del post-carico (*overload* di pressione) del ventricolo destro mediante bendaggio dell'arteria polmonare, per far fronte all'aumento del post-carico il ventricolo destro

inizialmente innesca dei meccanismi compensatori principalmente volti ad indurre un aumento transitorio della contrattilità, probabilmente in seguito ad alterazioni dello stato adrenergico. Successivamente il ventricolo destro comincia a dilatarsi continuando a mantenere un'adeguata gittata cardiaca per un certo periodo di tempo; tuttavia, una volta esauriti questi meccanismi di compenso rapido, si assiste ad un'ulteriore dilatazione della camera ventricolare destra fino allo stato di scompenso cardiaco con improvvisa e rapida riduzione della funzione contrattile del ventricolo destro. Ne consegue, dunque, una certa capacità intrinseca del ventricolo destro nel far fronte ad un sovraccarico cronico di volume (aumento del pre-carico), tuttavia, l'aumento della pressione a livello del circolo polmonare, conseguente all'esposizione cronica del letto vascolare polmonare all'aumentato flusso sanguigno, porta inevitabilmente ad un sovraccarico di pressione (aumento del post-carico) che il ventricolo destro non è in grado di sostenere con i diversi meccanismi compensatori. Molteplici studi dimostrano dunque come il sovraccarico di volume cronico del ventricolo destro non causi di per sé una depressione della contrattilità ma il conseguente aumento del post-carico costituisce un significativo fattore limitante i meccanismi di compenso ventricolari. Altri ricercatori riportano tuttavia dati contrastanti queste evidenze, descrivendo un significativo peggioramento della *performance* ventricolare destra in risposta al sovraccarico di volume cronico.

Nonostante la fondamentale importanza di questi studi, non è ancora stata eseguita una valutazione completa della *performance* del ventricolo destro in risposta al sovraccarico di volume, considerando anche parametri indipendenti dalle condizioni di *loading* del ventricolo stesso; emerge quindi la necessità di una valutazione più approfondita del comportamento ventricolare destro in risposta al sovraccarico di volume cronico.

Nel corso degli anni alcuni ricercatori hanno cominciato ad utilizzare il modello dello *shunt* aorto-cavale per la valutazione del ruolo dell'iperafflusso polmonare nell'ipertensione polmonare. Nel 2003 Nishimura e collaboratori confrontarono gli effetti della fistola creata con un angiocatetere di 20 Gauge in ratti di 350 g di peso sull'ipertensione polmonare indotta da monocrotalina, a distanza di 4 settimane e conclusero che lo *shunt* aorto-cavale e l'iperafflusso polmonare riducevano gli effetti della monocrotalina sul microcircolo polmonare e il grado di ipertrofia ventricolare destra (81). Diverse limitazioni caratterizzano tuttavia questo studio, pregiudicandone l'attendibilità: in primo luogo, le piccole dimensioni dello *shunt* creato da Nishimura consentono la creazione di un iperafflusso polmonare cronico i cui effetti non risultano ben valutabili a distanza di sole 4 settimane; in secondo luogo, i parametri presi in considerazione per la valutazione del modello (pressione polmonare media, ipertrofia ventricolare destra e alterazioni istologiche dei vasi polmonari) non risultano sufficienti in mancanza di una valutazione emodinamica completa e di un'adeguata valutazione dell'ipertrofia ventricolare con metodi diretti o strumentali (RM, ECO). Inoltre, la natura acuta del danno indotto dalla monocrotalina sul circolo polmonare e sul miocardio e l'immediatezza delle alterazioni prodotte a livello del microcircolo polmonare rischiano di mascherare gli effetti prodotti dall'iperafflusso stesso.

Studi successivi (82) riportarono invece un peggioramento dell'ipertensione polmonare indotta da monocrotalina negli animali con lo shunt aortocavale rispetto agli animali trattati unicamente con l'alcaloide, accompagnato da un aumento della mortalità.

È stato poi dimostrato che, nello stesso modello di *shunt* aorto-cavale, l'esposizione del circolo polmonare all'iperafflusso per tempi più lunghi (11 settimane) era in grado di indurre un considerevole aumento della pressione polmonare nei ratti con lo *shunt* rispetto ai ratti di controllo.

Tra i molteplici metodi attualmente disponibili per la creazione di uno *shunt* sinistro-destro negli animali sperimentali, il più comunemente utilizzato risulta essere il modello dello *shunt* aorto-cavale descritto per la prima volta da Garcia nel 1990 (78), principalmente impiegato per lo studio della risposta ventricolare destra al sovraccarico di volume acuto o cronico e dei suoi effetti sul circolo polmonare. Tuttavia, l'elevata conflittualità esistente tra i numerosi dati presenti in letteratura fa sì che l'interazione tra funzione ventricolare destra e sinistra e il *remodelling* vascolare rimangano spesso trascurati facendo al tempo stesso emergere la necessità di una valutazione più adeguata di questo modello sperimentale con tecniche che consentano di chiarire i diversi effetti dell'iperafflusso polmonare anche dal punto di vista istopatologico e molecolare.

### **1.5.1 Fase preliminare dello studio: validazione del modello di ipertensione polmonare da sovraccarico di volume cronico del ventricolo destro in seguito allo *shunt* aorto-cavale.**

Al fine di verificare l'effettivo sviluppo di ipertensione polmonare, il modello sperimentale proposto da Garcia (78) è stato inizialmente sottoposto ad un'approfondita valutazione delle alterazioni strutturali e morfologiche a carico dei ventricoli e del circolo polmonare in seguito alla persistenza cronica dello *shunt* aorto-cavale.

In una fase preliminare dello studio il modello è stato dunque validato attraverso l'utilizzo di metodi non invasivi, quali l'emogasanalisi e l'ecocardiografia per la valutazione delle alterazioni morfologico-strutturali biventricolari, e mediante valutazione emodinamica a livello del ventricolo destro e sinistro e dell'arteria polmonare.

La validazione del modello sperimentale in questione è stata eseguita in una serie preliminare di ratti maschi adulti del ceppo Sprague-Dawley, del peso di  $400 \pm 50$  grammi, dopo un periodo di esposizione di 10 e 20 settimane alla fistola aorto-cavale, rispetto agli animali *sham-operated* di controllo (n=10 per gruppo).

#### **1.5.1.1 Emogasanalisi e calcolo Qp/Qs.**

Per l'emogasanalisi campioni di sangue (0.5 ml) sono stati ottenuti dall'arteria polmonare, dalla carotide esterna e dalla vena giugulare. Il rapporto Qp/Qs è stato calcolato con la formula:

$$\text{Qp/Qs} = \frac{\% \text{ saturazione in aorta} - \% \text{ saturazione in vena cava superiore}}{\% \text{ saturazione in vena polmonare} - \% \text{ saturazione in arteria polmonare}}$$

Con una saturazione in aorta >95% la saturazione in vena polmonare è stata considerata del 100%, mentre con una saturazione in aorta <95% la saturazione in vena polmonare è stata considerata pari al 95%.

Il rapporto Qp/Qs è risultato significativamente aumentato in entrambi i gruppi sottoposti a *shunt* aorto-cavale per 10 e 20 settimane rispetto al gruppo di controllo (Tab 5., Fig. 21).

	Controllo	10-set	20-set
Qp/Qs	1±0,12	2,12±0,54*	1,98±0,41*

Tabella 5. Valori del rapporto Qp/Qs tra i diversi gruppi. \*, p<0.05 vs controllo.

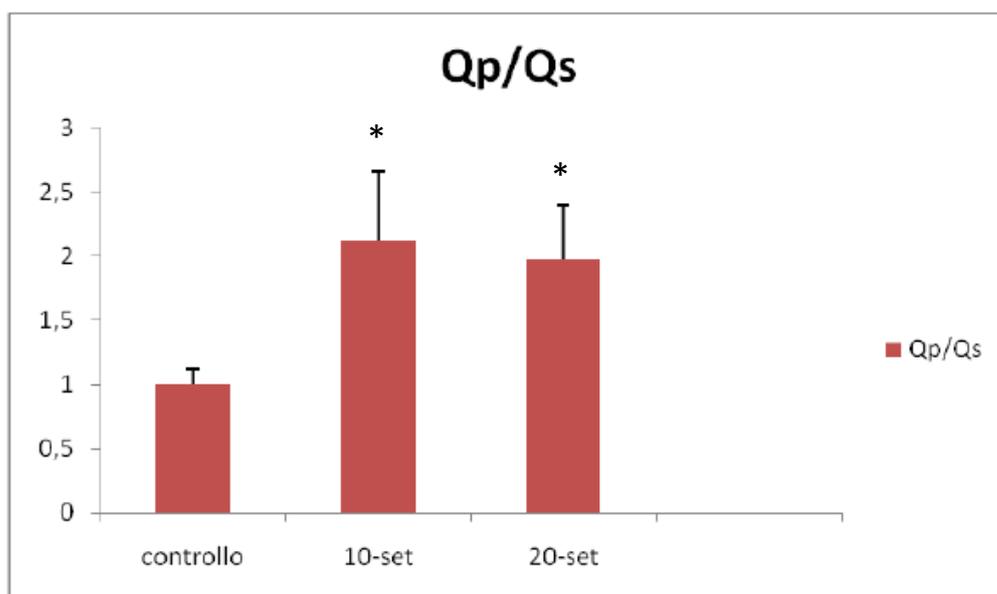


Figura 21. Significativo aumento del rapporto Qp/Qs nei gruppi con *shunt* aorto-cavale (10-set e 20-set) rispetto al controllo. \*, p<0.05.

### 1.5.1.2 Valutazione ecocardiografica.

A distanza di 10 e 20 settimane dall'operazione chirurgica, gli animali sono stati dunque nuovamente storditi ed anestetizzati con modalità descritte più avanti (par. 3.1 *Animali e disegno sperimentale*), il torace, le zampe anteriori e una delle zampe posteriori sono state rasate per rendere possibile il posizionamento degli elettrodi ECG, e si è infine proceduto con la valutazione non invasiva del modello sperimentale mediante **esame ecocardiografico trans-toracico bidimensionale, monodimensionale e Doppler continuo e pulsato**, attraverso un sistema GE Vivid Q con sonda 10s (da 5 a 7.5 Mhz).

L'analisi ecocardiografica **M-mode**, eseguita in asse corto parasternale, a livello dei muscoli papillari, ha consentito la valutazione dello **spessore della parete libera del ventricolo destro** e delle **dimensioni telediastoliche della cavità ventricolare destra**. Con lo stesso metodo, è stata inoltre ottenuta una stima del **TAPSE** (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*), universalmente considerato un indice di contrattilità ventricolare destra.

Un Doppler continuo del flusso sanguigno polmonare è stato inoltre ottenuto in asse corto parasternale, a livello della valvola aortica. Data la particolare difficoltà per la determinazione nel ratto del rigurgito tricuspidalico, uno dei parametri maggiormente utilizzati nella pratica clinica per la valutazione della PAPS (pressione sistolica in arteria polmonare), è stata valutata l'eventuale comparsa di un'**incisura mesosistolica nel profilo Doppler del flusso transpolmonare**, parametro già considerato come segno attendibile di aumentata **pressione arteriosa polmonare** nei ratti.

Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nelle misure del TAPSE nei ratti esposti allo *shunt* aorto-cavale per 10 e 20 settimane rispetto ai controlli, mentre lo spessore della parete libera del ventricolo destro e le dimensioni telediastoliche della cavità ventricolare destra sono risultati lievemente aumentati negli animali con fistola aorto-cavale.

Il profilo dell'onda Doppler del flusso polmonare dei ratti sottoposti a *shunt* si è inoltre rivelato caratterizzato dalla comparsa di un'incisura mesosistolica, assente nei profili Doppler dei controlli (Tab. 6; Figg. 22, 23).

	<b>controllo</b>	<b>10-set</b>	<b>20-set</b>
<b>Area tele diastolica Vdx</b>	0,225±0,9	0,35±0,057	0,34±0,041
<b>Diametro tele diastolico Vdx</b>	0,275±0,095	0,45±0,057	0,475±0,095
<b>spessore parete libera Vdx</b>	0,225±0,05	0,35±0,05	0,325±0,05
<b>TAPSE</b>	22,5±5	19,75±0,5	19,25±0,25
<b>incisura mesosistolica</b>	-----	+++++	+++++

**Tabella 6. Parametri ecocardiografici presi in considerazione.**

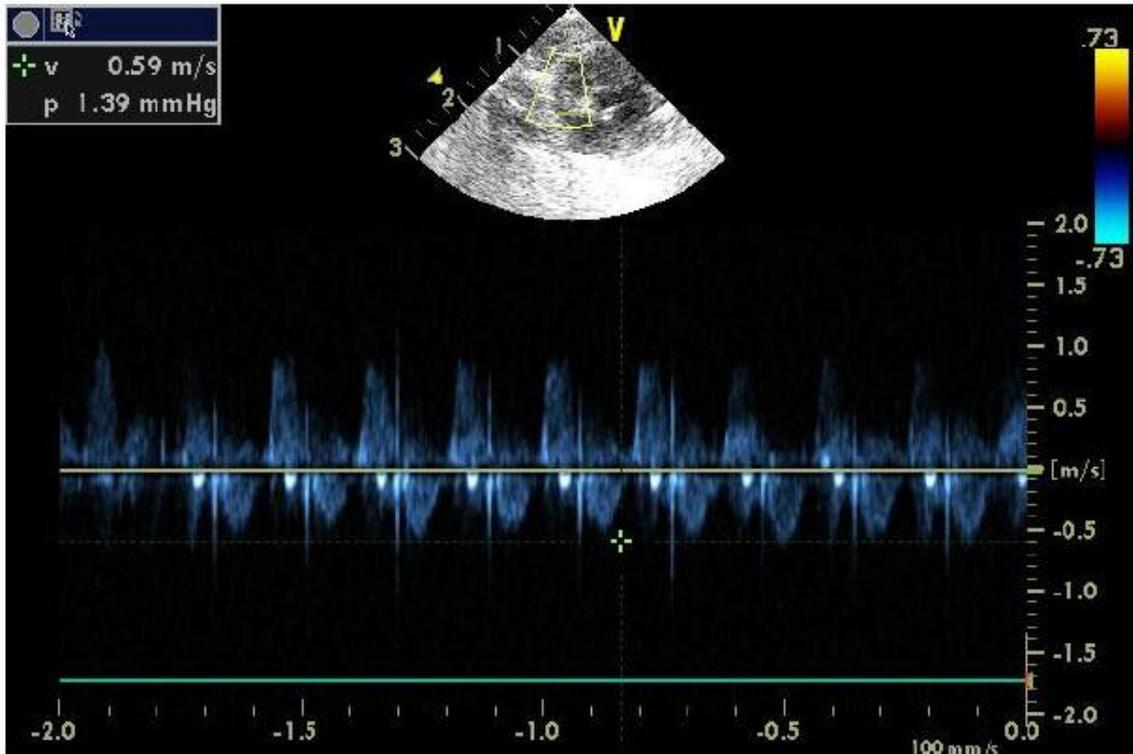


Figura 22. Assenza dell'incisura mesosistolica nel gruppo di controllo.

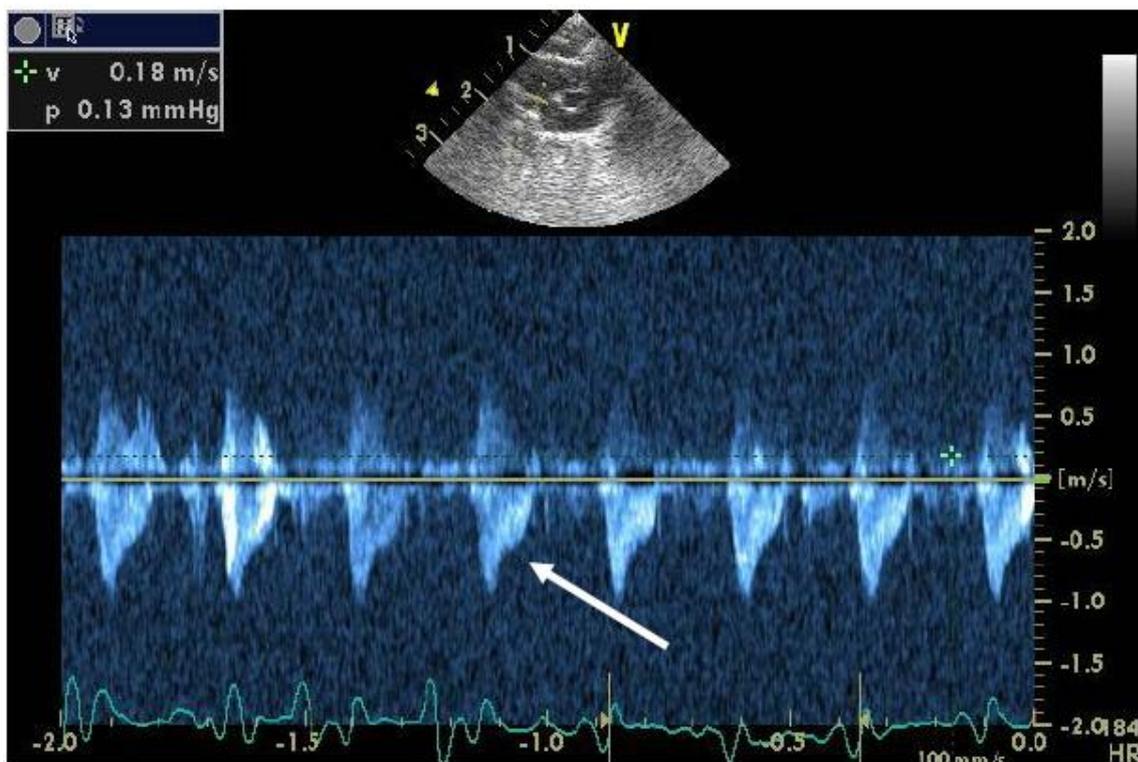


Figura 23. Presenza dell'incisura mesosistolica (indicata dalla freccia), indice di aumentata pressione polmonare, in entrambi i gruppi *shuntati* a 10 e 20 settimane.

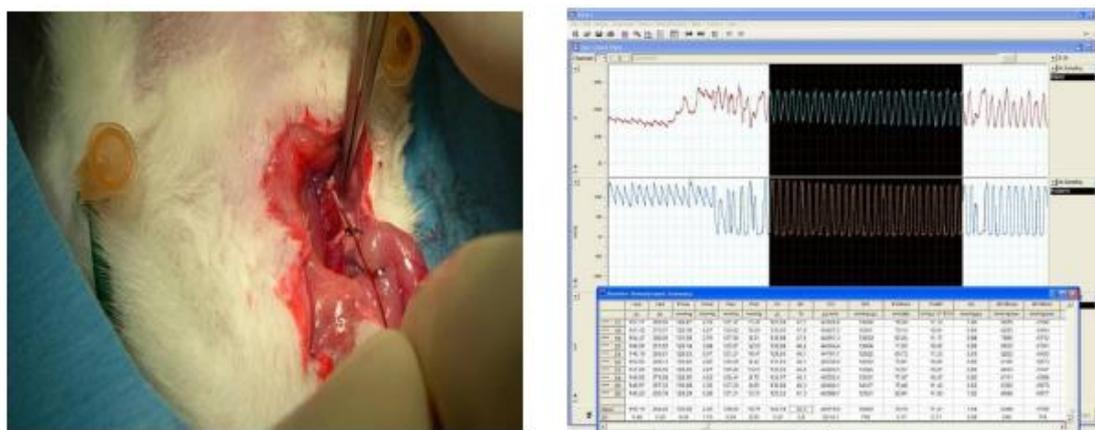
### 1.5.1.3 Valutazione emodinamica.

Il monitoraggio emodinamico è stato eseguito a distanza di 10 e 20 settimane dalla creazione dello *shunt* aorto-cavale e nei ratti *sham-operated*, intubati e ventilati meccanicamente con modalità descritte più avanti (par. 3.1 *Animali e disegno sperimentale*). Dopo aver inciso la cute e i piani sottocutanei sulla linea mediana del collo, è stata identificata la trachea e, subito a destra di questa, il fascio vascolo-nervoso; l'arteria carotide destra è stata dunque isolata, legata cranialmente e clampata caudalmente. Dopo aver effettuato un piccolo taglio con forbice microchirurgica, si è proceduto con l'inserimento in carotide di un catetere miniaturizzato, del diametro di 2-Fr (modello SPR 838, Millar Instruments, Houston, Texas, USA) (Fig. 24).



**Figura 24.** Catetere a conduttanza per il monitoraggio delle pressioni e dei volumi in ventricolo sinistro, destro e in arteria polmonare (Millar Instruments, Texas, USA).

Tale catetere è stato quindi collegato al relativo trasduttore e quindi all'unità *Power-Lab* (ADInstruments, Colorado Springs, Colorado, USA), la quale è stata a sua volta collegata, mediante porta USB, ad un computer per la visualizzazione in tempo reale delle curve pressione-volume e la registrazione dei dati per mezzo del software *Chart* (ADInstruments). Il catetere a conduttanza è stato dunque introdotto in carotide e fatto avanzare fino al ventricolo sinistro: la corretta posizione del catetere è stata raggiunta seguendo l'andamento della curva della pressione, ovvero il passaggio dalla caratteristica forma arteriosa della curva (in carotide e, successivamente, in aorta) alla tipica forma ventricolare (posizione corretta del catetere in ventricolo sinistro) (Fig. 25).



**Figura 25.** Introduzione del catetere a conduttanza e registrazione dei dati emodinamici.

Il segnale è stato registrato in modo continuo, con una frequenza di campionamento di 1000/s, in modo da poter monitorare i cambiamenti emodinamici per tutta la durata dell'intervento.

Sono stati valutati i seguenti parametri emodinamici:

- **Pressione telediastolica ventricolare sinistra** (LVEDP- *Left Ventricular End Diastolic Pressure*);
- **Pressione telesistolica ventricolare sinistra** (LVESP- *Left Ventricular End Systolic Pressure*);
- **Volume telediastolico ventricolare sinistro** (LVEDV- *Left Ventricular End Diastolic Volume*);
- **Volume telesistolico ventricolare sinistro** (LVESV- *Left Ventricular End Systolic Volume*);
- **Massimo incremento della pressione sistolica** (+ dP/dt);
- **Massimo decremento della pressione diastolica** (-dP/dt);
- **Rapporto pressione-volume alla fine della sistole** (ESPVR- *End Systolic Pressure Volume Relationship*);
- **Rapporto pressione-volume alla fine della diastole** (EDPVR- *End Diastolic Pressure Volume Relationship*);
- **Carico di lavoro sistolico** (SW- *Stroke work*);
- **Precarico e carico di lavoro sistolico reclutabile** (PRSW- *Preload and Recrutable Stroke Work*);
- **Elastanza arteriosa**;
- **Costante di tempo tau-Weiss.**

Successivamente è stata eseguita una sternotomia mediana con apertura del pericardio; una volta esposta l'arteria polmonare, il catetere di Millar è stato introdotto nel ventricolo destro in prossimità dell'apice del cuore e si è proceduto con la rilevazione degli stessi parametri emodinamici considerati precedentemente per il ventricolo sinistro. Il catetere è stato infine fatto avanzare fino all'arteria polmonare per il monitoraggio della pressione arteriosa polmonare (PAP).

La calibrazione del sistema di conduttanza è stata eseguita utilizzando un blocchetto alto 1 cm con 9 fori cilindrici inseriti, di diametro conosciuto variabile tra i 2 e gli 11 mm, ognuno dei quali è stato riempito con sangue intero eparinizzato di ratto. In questa calibrazione, il volume assoluto, noto, contenuto in ogni cilindro è stato associato ad un segnale preciso ottenuto mediante il catetere a conduttanza e la regressione lineare volume-conduttanza così ottenuta è stata dunque confrontata con i segnali grezzi del catetere e quindi utilizzata per la formula di calibrazione del volume.

### ***Funzione sistolica del ventricolo sinistro.***

#### **Parametri precarico-dipendenti:**

il volume telesistolico e il volume telediastolico del ventricolo sinistro sono entrambi risultati aumentati nei gruppi con *shunt* aorto-cavale rispetto al controllo anche se la significatività statistica è stata raggiunta soltanto nel gruppo *shuntato* a 20 settimane.

Non sono state rilevate variazioni significative nei diversi gruppi relativamente alla pressione sistolica del ventricolo sinistro, mentre il rapporto  $dP/dt$  max, un parametro classico di contrattilità, si è dimostrato ridotto in maniera significativa in entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale, con una riduzione più marcata nel gruppo a 20 settimane (Fig. 26).

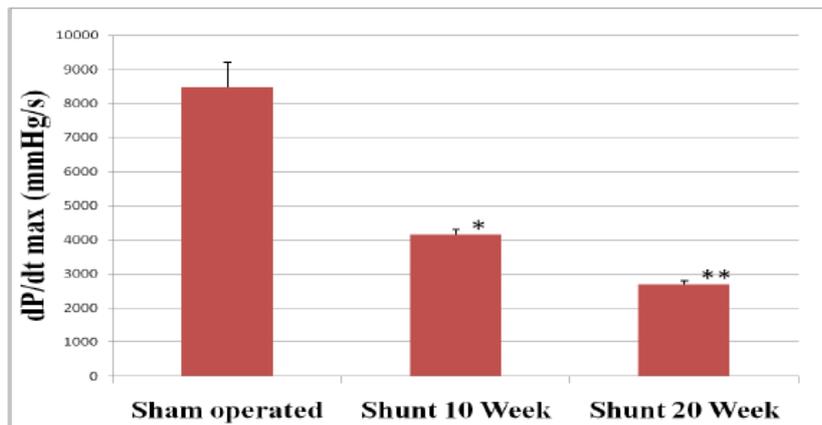


Figura 26. Significativa riduzione del  $dP/dt$  max nel ventricolo sinistro dei ratti con *shunt* aorto-cavale (Shunt 10 week e Shunt 20 week) rispetto agli animali di controllo *sham-operated*. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ .

Parametri precarico-indipendenti:

come parametri precarico-indipendenti sono stati valutati il *preload recruitable stroke work* (PRSW=SW/EDV) e la relazione pressione-volume telesistolico (ESPVR); entrambi questi parametri sono risultati ridotti nei due gruppi con *shunt* aorto-cavale rispetto al controllo, anche se la significatività statistica è stata raggiunta soltanto nel gruppo *shuntato* a 20 settimane (Fig. 27).

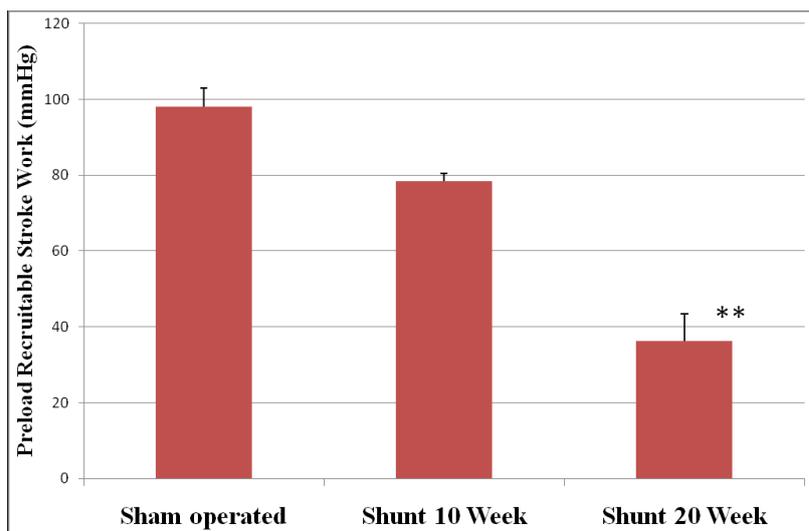


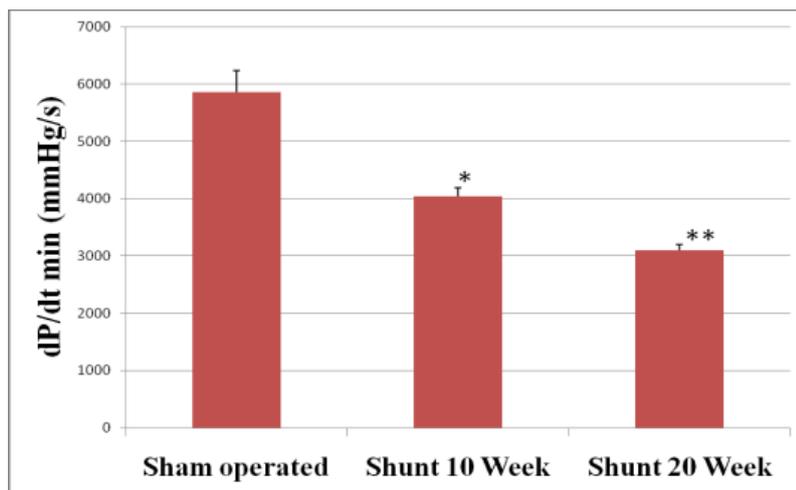
Figura 27. Significativa riduzione del *preload recruitable stroke work* nel ventricolo sinistro dei ratti con *shunt* aorto-cavale a 20 settimane (Shunt 20 week) rispetto agli animali di controllo *sham-operated*. \*\*,  $p<0.01$ .

### ***Funzione diastolica del ventricolo sinistro.***

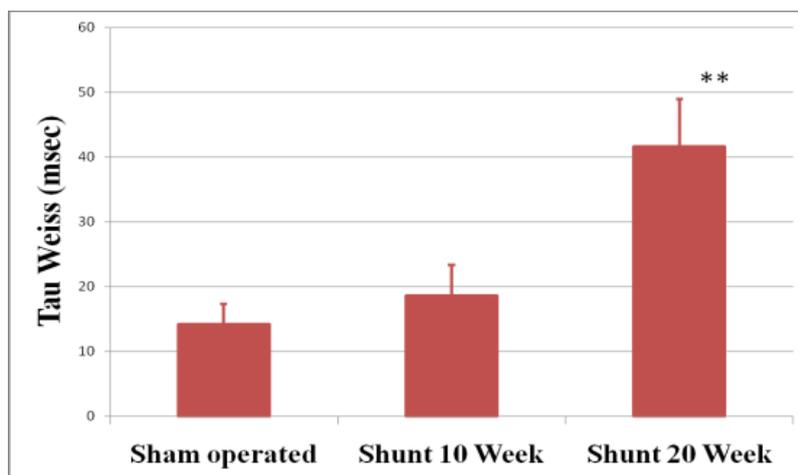
#### **Indici di rilasciamento ventricolare:**

il  $dp/dt$  min, un parametro di rilasciamento diastolico, è risultato significativamente ridotto in entrambi i gruppi *shuntati*, indicando un alterato rilasciamento ventricolare (Fig. 28).

Un generale incremento della costante di tempo tau-Weiss è stato inoltre dimostrato negli animali con *shunt* aorto-cavale rispetto al controllo, con livelli di significatività statistica raggiunti soltanto nel gruppo *shuntato* a 20 settimane (Fig. 29).



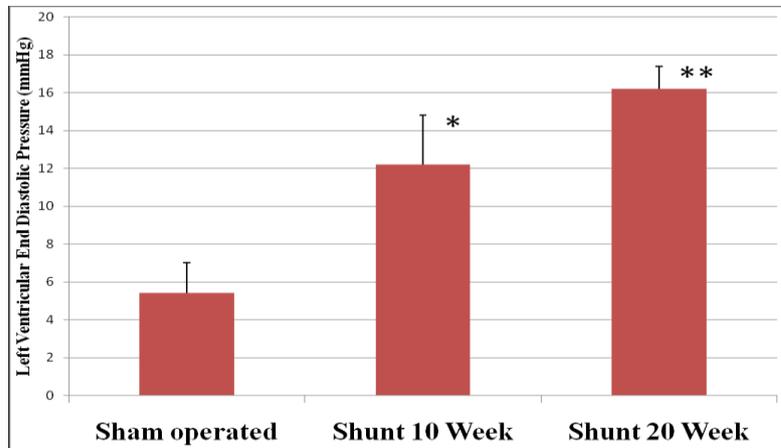
**Figura 28. Significativa riduzione del  $dp/dt$  min nel ventricolo sinistro dei ratti con *shunt* aorto-cavale (Shunt 10 week e Shunt 20 week) rispetto agli animali di controllo *sham-operated*. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .**



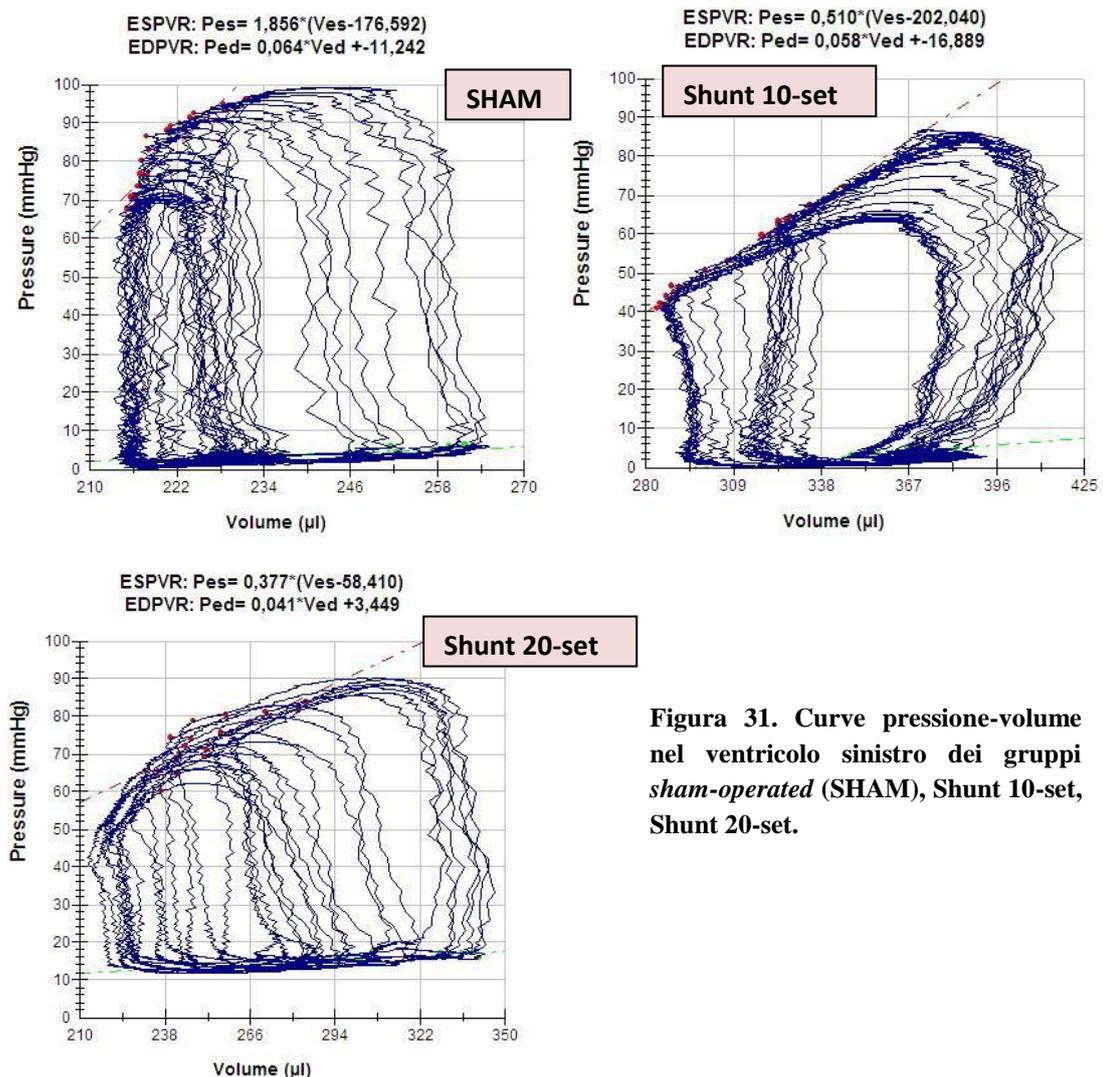
**Figura 29. Significativo incremento della costante di tempo Tau Weiss nel ventricolo sinistro dei ratti con *shunt* aorto-cavale a 20 settimane (Shunt 20 week) rispetto agli animali di controllo *sham-operated*. \*\*,  $p < 0.01$ .**

Indici di *stiffness* ventricolare sinistra:

La pressione telediastolica del ventricolo sinistro (LVEDP) è risultata significativamente aumentata in entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale a 10 e 20 settimane rispetto al gruppo di controllo (Fig. 30). Una diminuzione significativa della relazione pressione-volume telediastolico (EDPVR) si è notata in entrambi i gruppi *shuntati* (Fig. 31).



**Figura 30.** Significativo incremento della pressione telediastolica (LVEDP) nel ventricolo sinistro dei ratti con *shunt* aorto-cavale (Shunt 10 week e Shunt 20 week) rispetto agli animali di controllo *sham-operated*. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .



**Figura 31.** Curve pressione-volume nel ventricolo sinistro dei gruppi *sham-operated* (SHAM), Shunt 10-set, Shunt 20-set.

LV	Sham operated	Shunt 10 Week	Shunt 20 Week
LVSP (mmHg)	120 ± 15	98 ± 8	102 ± 6
LVEDP (mmHg)	5,4 ± 1,6	12,2 ± 2,6*	16,2 ± 1,2**
dP/dt max (mmHg/s)	8470 ± 738	4166 ± 148*	2697 ± 108**
dP/dt min (mmHg/s)	5860 ± 375	4037 ± 154*	3104 ± 96**
PRSW (mmHg)	98 ± 5	78,4 ± 2	36,2 ± 7,2**
Tau Weiss (msec)	14,2 ± 3,1	18,6 ± 4,7	41,6 ± 7,3**
VES (μl)	232,7 ± 13,1	245,6 ± 9,7	307,6 ± 9,1 *
VED (μl)	267,7 ± 12,5	290,5 ± 9,3	374,6 ± 19,6**

Tabella 7. Parametri emodinamici nel ventricolo sinistro (LV) di ratti *Sham-operated* e con *shunt* aorto-cavale a 10 (Shunt 10 week) e 20 settimane (Shunt 20 week). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

### *Funzione sistolica del ventricolo destro.*

#### Parametri precarico-dipendenti:

Rispetto al gruppo di controllo, entrambi i gruppi *shuntati* hanno mostrato un significativo aumento dei volumi telesistolico e telediastolico del ventricolo destro.

Anche la pressione sistolica del ventricolo destro è risultata significativamente aumentata in entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale (Fig. 32).

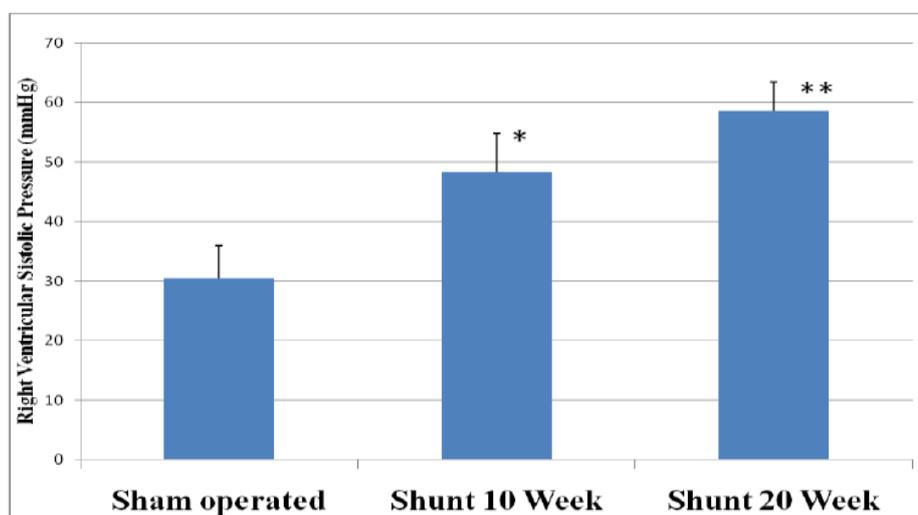


Figura 32. Significativo incremento della pressione sistolica nel ventricolo destro di entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale (Shunt 10 week e Shunt 20 week) rispetto al gruppo di controllo (Sham-operated). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

Il rapporto dP/dt max si è dimostrato significativamente ridotto soltanto nel gruppo *shuntato* a 20 settimane.

### Parametri precarico-indipendenti:

la valutazione emodinamica del ventricolo destro ha evidenziato una generale diminuzione dei parametri ESPVR e *preload recruitable stroke work* (PRSW=SW/EDV) in entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale rispetto al controllo, anche se la significatività statistica è stata raggiunta soltanto nel gruppo *shuntato* a 20 settimane (Fig. 33).

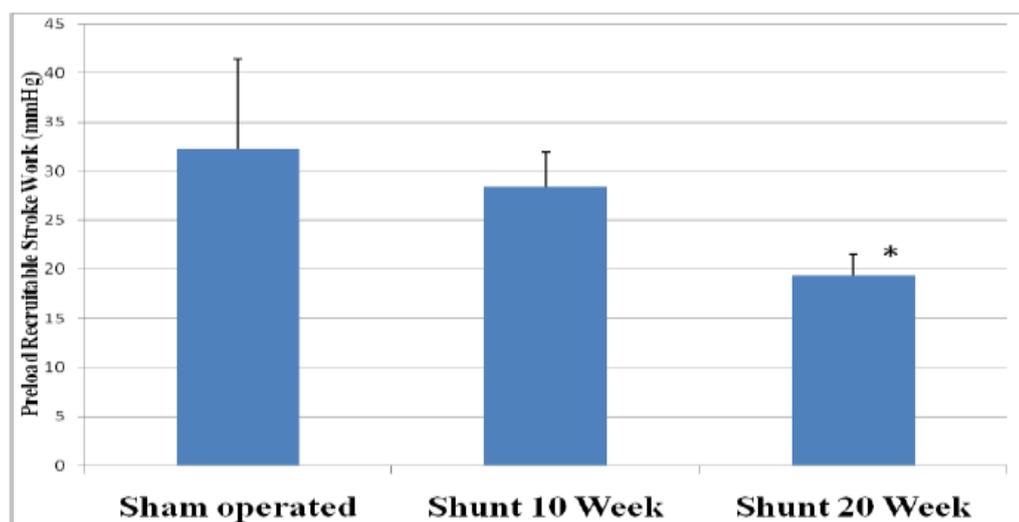


Figura 33. Significativa riduzione del *Preload Recrutable Stroke Work* nel ventricolo destro del gruppo con *shunt* aorto-cavale a 20 settimane (Shunt 20 week) rispetto al gruppo di controllo (Sham-operated). \*,  $p < 0.05$ .

### *Funzione diastolica del ventricolo destro.*

#### Indici di rilasciamento ventricolare:

Il rapporto  $dp/dt \text{ min}$ , parametro di rilasciamento diastolico, si è dimostrato significativamente ridotto in entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale rispetto al controllo, indicando un alterato rilasciamento ventricolare (Fig. 34); negli stessi gruppi, la costante di tempo tau-Weiss è risultata invece significativamente aumentata (Fig. 35).

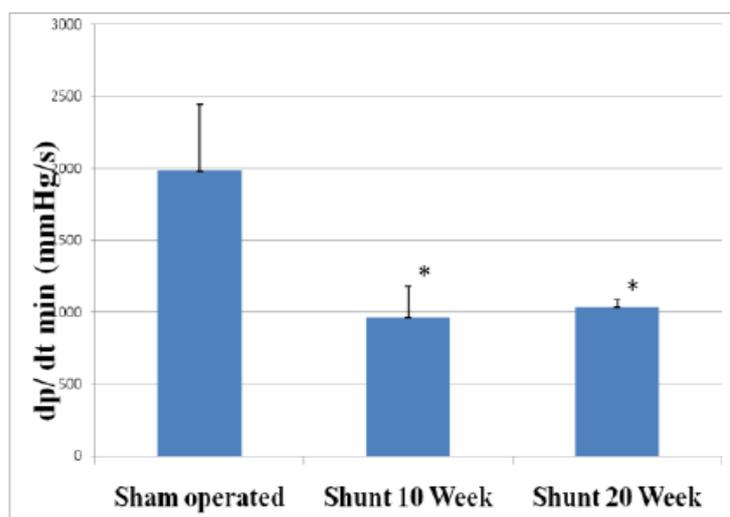


Figura 34. Significativa riduzione del rapporto  $dp/dt \text{ min}$  nel ventricolo destro di entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale (Shunt 10 week e Shunt 20 week) rispetto al gruppo di controllo (Sham-operated). \*,  $p < 0.05$ .

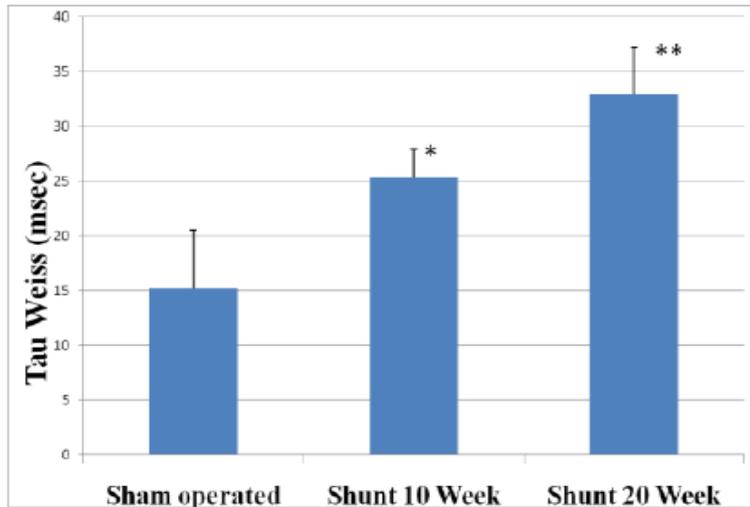


Figura 35. Significativo aumento della costante di tempo Tau-Weiss nel ventricolo destro di entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale (Shunt 10 week e Shunt 20 week) rispetto al gruppo di controllo (Sham-operated). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

Indici di *stiffness* ventricolare destra:

la pressione telediastolica del ventricolo destro (RVEDP) è risultata significativamente aumentata in entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale a 10 e 20 settimane rispetto ai ratti *sham-operated* di controllo (Fig. 36).

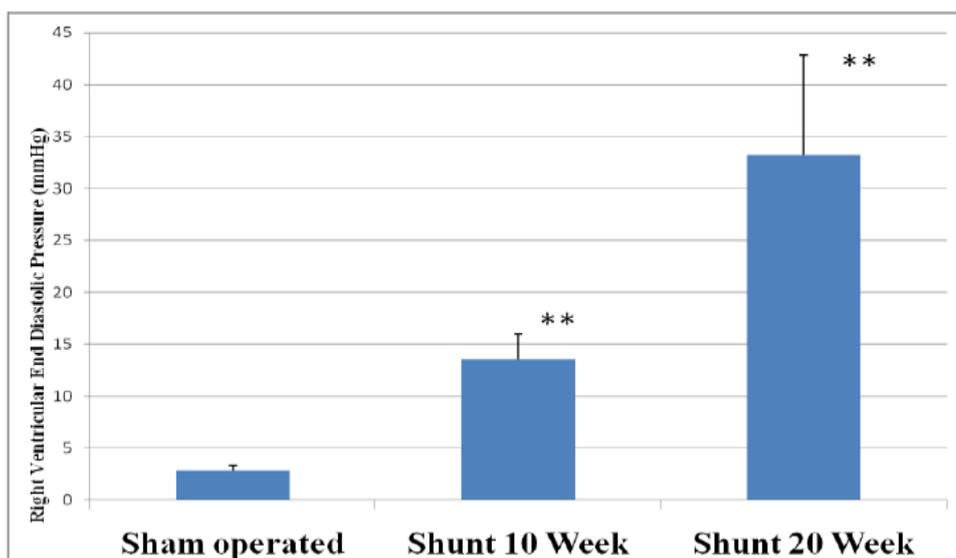


Figura 36. Significativo incremento della pressione telediastolica ventricolare destra in entrambi i gruppi con *shunt* aorto-cavale (Shunt 10 week e Shunt 20 week) rispetto al gruppo di controllo (Sham-operated). \*\*,  $p < 0.01$ .

Una diminuzione significativa della relazione pressione-volume telediastolico (EDPVR) è stata notata in entrambi i gruppi *shuntati* (Fig. 37).

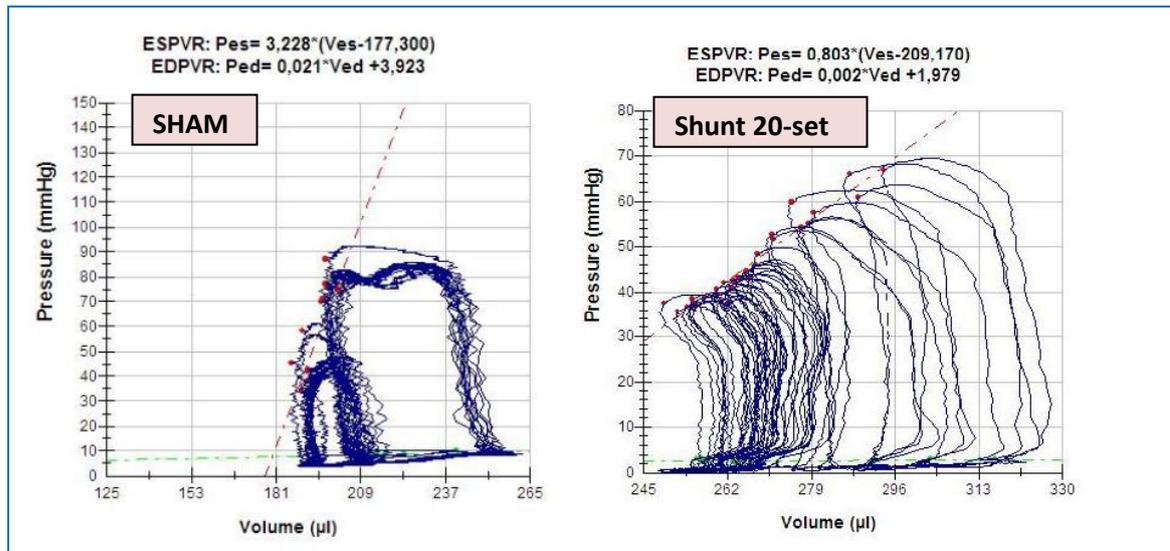


Figura 37. Curve pressione-volume nel ventricolo destro del gruppo con *shunt* aorto-cavale a 20 settimane (Shunt 20-set) rispetto al gruppo di controllo (SHAM)

RV	Sham operated	Shunt 10 Week	Shunt 20 Week
RVSP (mmHg)	30,4 ± 5,6	48,3 ± 6,4*	58,7 ± 47**
RVEDP (mmHg)	2,8 ± 0,5	13,5 ± 2,5**	33,2 ± 9,6 **
dP/dt max (mmHg/s)	1530 ± 120	1895 ± 235	880 ± 85 *
dP/dt min (mmHg/s)	1980 ± 465	960 ± 220 *	1032 ± 56 *
PRSW (mmHg)	32,3 ± 9,1	28,4 ± 3,5	19,4 ± 2,2 *
Tau Weiss (msec)	15,2 ± 5,3	25,3 ± 2,6 *	32,9 ± 4,3**
VES (µl)	221 ± 22,5	282 ± 27*	298,2 ± 31,2*
VED (µl)	241 ± 13,1	310 ± 31*	324,7 ± 27**

Tabella 8. Parametri emodinamici nel ventricolo destro (RV) di ratti *sham-operated* e con *shunt* aorto-cavale a 10 (Shunt 10 week) e 20 settimane (Shunt 20 week). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.

**Pressione arteriosa polmonare ed elastanza arteriosa.**

È stato evidenziato un aumento statisticamente significativo delle pressioni arteriose sistolica (PAS) e diastolica (PAD) a livello dell'arteria polmonare in entrambi i gruppi di ratti *shuntati* a 10 e 20 settimane rispetto agli animali di controllo (Tab. 9, Fig. 38); anche il valore dell'elastanza arteriosa ( $Ea=RVESP/SV$ ) è risultato significativamente aumentato nei due gruppi con *shunt* aorto-cavale (Tab. 9).

PA	Control	S 10 W	S 20 W
PAS (mmHg)	$35 \pm 8$	$64 \pm 7 *$	$102 \pm 14 **$
PAD (mmHg)	$9,4 \pm 2,6$	$16,3 \pm 3$	$54,8 \pm 9,1 **$
Ea (mmHg/ $\mu$ L)	$0,14 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,05 *$	$1,29 \pm 0,2 **$

Tabella 9. Valori dell'elastanza arteriosa (Ea) e della pressione sistolica (PAS) e diastolica (PAD) in arteria polmonare nei gruppi con *shunt* aorto-cavale a 10 (S 10 W) e 20 settimane (S 20 W) rispetto al gruppo di controllo (Control). \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ .

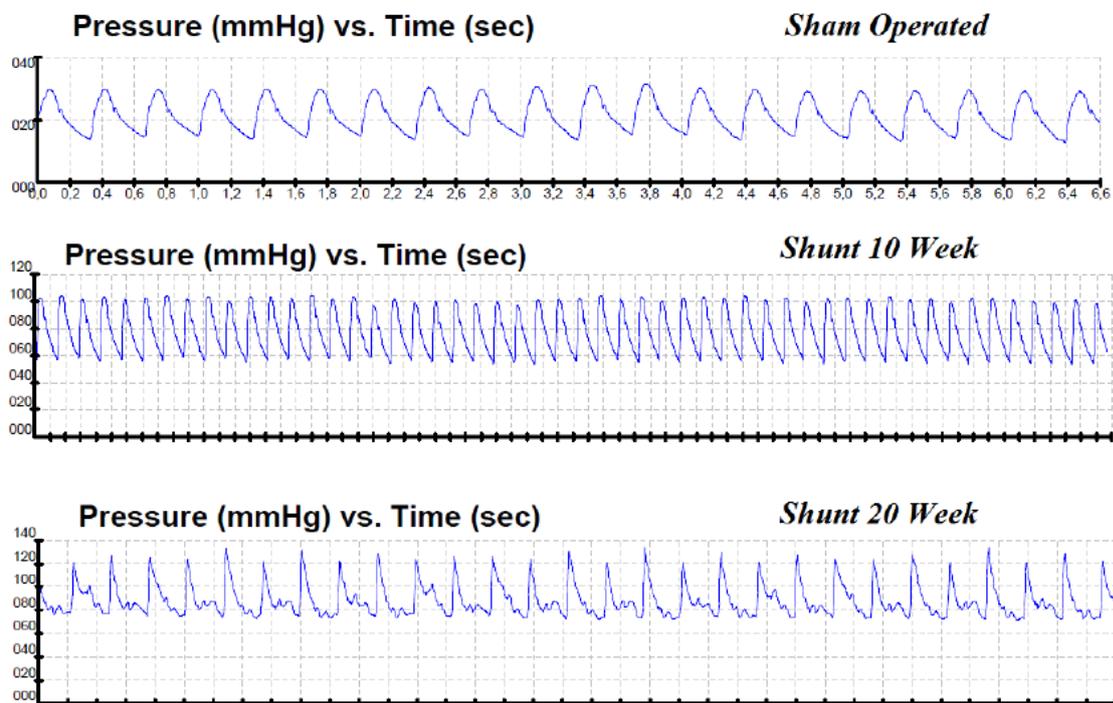


Figura 38. Confronto tra le curve pressorie in arteria polmonare nei gruppi *shuntati* a 10 e 20 settimane rispetto ai controlli *sham-operated*.

## **1.6. TERAPIA FARMACOLOGICA SPECIFICA PER IL TRATTAMENTO DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA POLMONARE.**

Negli ultimi anni la ricerca clinica e sperimentale e, soprattutto, lo sviluppo di modelli animali sempre più “fedeli” al quadro patologico umano, hanno notevolmente contribuito ad un significativo miglioramento delle strategie di trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare (1). Sono stati attualmente approvati otto differenti farmaci con differenti modalità di somministrazione e nuovi farmaci saranno attesi per il prossimo futuro. La terapia farmacologica moderna migliora significativamente lo stato sintomatico del paziente e rallenta il deterioramento clinico con conseguente diminuzione della mortalità e dei ricoveri ospedalieri. Nonostante la relativa efficacia delle strategie terapeutiche correntemente approvate per il trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare, questa condizione clinica continua a rimanere una patologia cronica senza una cura definitiva; i trattamenti medici e interventistici per i casi più avanzati si rivelano inoltre ancora invasivi, con significativi effetti collaterali (1).

La terapia dei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare non può essere semplicemente considerata una “mera prescrizione di farmaci” ma si rivela una strategia particolarmente complessa caratterizzata da una prima valutazione della gravità della patologia, adozione di misure generali e di supporto al paziente, valutazione della reattività vascolare e stima dell'efficacia dei singoli farmaci e delle loro combinazioni (1).

### **1.6.1 Bloccanti dei canali del calcio.**

Il ruolo centrale dell'ipertrofia e iperplasia delle cellule muscolari lisce, nonché della vasocostrizione, nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica, ha determinato l'impiego di tradizionali vasodilatatori, per lo più farmaci bloccanti i canali del calcio, fin dalla metà degli anni '80. Tuttavia, soltanto un piccolo numero di pazienti affetti da ipertensione arteriosa polmonare idiopatica mostra reattività vascolare e risponde quindi positivamente ai bloccanti dei canali del calcio, tra i quali nifedipina, diltiazem e amlodipina sono i più comunemente utilizzati (1). Le dosi giornaliere di questi farmaci, efficaci per il trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica, risultano inoltre particolarmente elevate e possono essere associate alla comparsa di effetti collaterali importanti quali ipotensione sistemica, edema periferico degli arti inferiori, sincope e scompenso ventricolare destro. Nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare associata a patologie del tessuto connettivo risposte vasodilatatorie positive non sempre sono indice di una risposta positiva alla terapia a lungo termine con bloccanti dei canali del calcio e le alte dosi di questi farmaci spesso non vengono ben tollerate (1).

## 1.6.2 Prostanoidi.

La prostaciclina viene principalmente sintetizzata nelle cellule endoteliali e induce potente vasodilatazione di tutto il letto vascolare; questo composto è inoltre il più potente inibitore endogeno dell'aggregazione piastrinica e sembra avere attività citoprotettive e antiproliferative. In alcuni pazienti con ipertensione arteriosa polmonare sono state identificate alterazioni nella regolazione delle vie metaboliche della prostaciclina, per lo più riduzioni dell'espressione della prostaciclina sintasi nelle arterie polmonari e dei suoi metaboliti urinari. L'utilizzo clinico della prostaciclina per il trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare è reso possibile mediante l'impiego di analoghi sintetici (prostanoidi) più stabili che possiedono differenti proprietà farmacocinetiche ma con effetti farmacodinamici qualitativamente simili (1).

L'**Epoprostenolo** è una prostaciclina sintetica con breve emivita (3-5 min), stabile a temperatura ambiente per sole 8 ore; per questo motivo necessita di somministrazione intravenosa continua mediante pompa di infusione e catetere permanente. Questo prostanoido sembra migliorare i sintomi, la capacità di esercizio fisico e i parametri emodinamici dei pazienti affetti da ipertensione arteriosa polmonare idiopatica e ipertensione arteriosa polmonare associata a patologie del tessuto connettivo ed è l'unico farmaco in grado di aumentare la sopravvivenza nella patologia idiopatica. L'efficacia dell'Epoprostenolo sembra inoltre persistere per un periodo di tempo prolungato dopo la terapia con una dose ottimale variabile nei singoli individui e limitata dagli effetti collaterali del farmaco, per lo più vampate di calore, emicrania, diarrea, dolore agli arti inferiori (1).

La particolare modalità di somministrazione dell'Epoprostenolo comporta, tuttavia, tutta una serie di possibili eventi avversi come un malfunzionamento della pompa da infusione, infezione locale a livello del sito di iniezione, ostruzione del catetere venoso centrale e sepsi; tuttavia, la brusca interruzione dell'infusione del farmaco potrebbe indurre, in alcuni pazienti, una rapida progressione e deterioramento dei sintomi dell'ipertensione polmonare, portando talvolta anche alla morte (1).

L'**Iloprost** è un analogo sintetico chimicamente stabile della prostaciclina, disponibile per la somministrazione intravenosa, orale e inalatoria (aerosol); la terapia inalatoria appare particolarmente vantaggiosa per il trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare, in quanto risulta selettiva per la circolazione polmonare. L'inalazione dell'Iloprost sembra migliorare i sintomi, la capacità di esercizio fisico e la resistenza vascolare polmonare nei casi di ipertensione arteriosa polmonare e ipertensione polmonare tromboembolica cronica e viene generalmente ben tollerata; vampate di calore e dolore alla mascella sono gli effetti collaterali più frequenti (1). La somministrazione intravenosa continua di questo farmaco sembra essere efficace similmente all'Epoprostenolo, mentre gli effetti della somministrazione orale non sono ancora stati valutati nell'ipertensione arteriosa polmonare (1).

Il **Treprostinil** è un analogo dell'Epoprostenolo sufficientemente stabile da essere somministrato a temperatura ambiente per via intravenosa o sottocutanea. Similmente agli altri prostanoidi, il Treprostinil sembra migliorare significativamente la capacità di

esercizio, le emodinamiche, la sopravvivenza e i sintomi dei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare ed è associato ad effetti collaterali non particolarmente severi (per lo più dolore al sito di infusione e, in alcuni casi, vampate di calore ed emicrania). Gli effetti della somministrazione intravenosa del Treprostinil sembrano paragonabili a quelli dell'Epoprostenolo soltanto se utilizzato ad una dose 2 o 3 volte più alta (1).

Il **Beraprost** è il primo analogo della prostaciclina chimicamente stabile e oralmente attivo; sfortunatamente, però, migliora la capacità di esercizio soltanto per un periodo limitato di tempo (da 3 a 6 mesi) senza comportare benefici emodinamici. Gli effetti avversi più frequenti sono emicrania, vampate di calore, dolore alla mascella e diarrea (1).

### **1.6.3 Antagonisti del recettore dell'endotelina.**

L'asse endotelinico sembra giocare un ruolo centrale nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare, anche se non è ancora ben chiaro se gli elevati livelli di endotelina-1 nel plasma e nel tessuto polmonare dei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare siano causa o conseguenza di tale patologia. L'endotelina-1 esercita effetti vasocostrittori e pro-mitogeni legandosi a due distinte isoforme recettoriali (A e B) presenti sulle cellule muscolari lisce vascolari polmonari. Il recettore di tipo B, tuttavia, è espresso anche nelle cellule endoteliali e, una volta attivato, induce il rilascio di sostanze vasodilatatrici e antiproliferative, come l'ossido nitrico e la prostaciclina, che potrebbero perciò contrastare gli effetti deleteri dell'endotelina-1. Tuttavia, nonostante queste potenziali differenze isoforma-specifiche nell'attività dei recettori, i farmaci doppi antagonisti di entrambe le isoforme e gli antagonisti selettivi mostrano effetti simili nel trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare (1).

Il **Bosentan** è un doppio antagonista dei recettori A e B dell'endotelina e la prima molecola di questa classe di farmaci ad essere stata sintetizzata; è attivo se somministrato per via orale. Questo farmaco è stato valutato nell'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica, associata a patologie del tessuto connettivo e alla sindrome di Eisenmenger ed ha mostrato significativi miglioramenti nella capacità di esercizio, classe funzionale, emodinamiche, variabili ecocardiografiche e tempo al peggioramento clinico. Il Bosentan è attualmente approvato nel trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica e associata a *shunts* sistemico-polmonari congeniti e a sindrome di Eisenmenger, con lunga permanenza degli effetti nei pazienti adulti con patologia idiopatica (1). Nel 10% circa degli individui in terapia con Bosentan sono stati tuttavia rilevati aumenti dose-dipendenti delle amino transferasi epatiche, reversibili dopo riduzione del dosaggio o interruzione della terapia; per queste ragioni, i pazienti in trattamento con Bosentan dovrebbero essere mensilmente sottoposti a test di funzionalità epatica. Questo farmaco sembra inoltre ridurre i livelli ematici di emoglobina e compromettere la spermatogenesi (1).

L'**Ambrisentan** è un antagonista selettivo per il recettore di tipo A dell'endotelina e sembra migliorare i sintomi, la capacità di esercizio, le emodinamiche e il tempo al peggioramento clinico dei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica e ipertensione arteriosa polmonare associata a patologie del tessuto connettivo e infezione da HIV, effetti della durata di almeno un anno. Rispetto al Bosentan, gli effetti

dell'Ambrisentan sul fegato sono meno rilevanti mentre l'incidenza di edema periferico sembra essere maggiore (1).

#### **1.6.4 Inibitori della fosfodiesterasi di tipo 5.**

L'inibizione della fosfodiesterasi di tipo 5, enzima deputato alla degradazione del GMP ciclico (cGMP), determina vasodilatazione NO/cGMP-mediata. Dal momento che i vasi polmonari contengono elevati livelli di fosfodiesterasi di tipo 5, gli inibitori di questo enzima potrebbero avere effetti clinici benefici nel trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare, esercitando anche effetti antiproliferativi. Tutti e tre i farmaci inibitori della fosfodiesterasi di tipo 5, attualmente utilizzati nella terapia della disfunzione erettile, **Sildenafil**, **Tadalafil** e **Vardenafil**, causano significativa vasodilatazione polmonare e, per questo motivo, possono essere impiegati anche per il trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare (1).

Il **Sildenafil** è un inibitore attivo per via orale, potente e selettivo della fosfodiesterasi di tipo 5 e sembra avere effetti favorevoli sulla capacità di esercizio, sintomi ed emodinamiche nell'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica, ipertensione arteriosa polmonare associata a patologie del tessuto connettivo, patologie cardiache congenite e ipertensione polmonare tromboembolica cronica. Gli effetti collaterali del Sildenafil sono moderati-lievi, per lo più correlati alla vasodilatazione: emicrania, vampate di calore, epistassi (1).

Il **Tadalafil** è un altro inibitore selettivo della fosfodiesterasi di tipo 5, correntemente approvato per il trattamento della disfunzione erettile, con esiti favorevoli sulla capacità di esercizio, sintomi, parametri emodinamici e, a dosi elevate, sul tempo di peggioramento clinico. Il profilo degli effetti collaterali è simile a quello del Sildenafil (1).

#### **1.6.5 Composti chimici sperimentali e strategie mediche alternative.**

Nonostante i considerevoli progressi compiuti nel trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare, le capacità funzionali e la sopravvivenza di questi pazienti continuano a rimanere insoddisfacenti. Per questi motivi, sono attualmente in fase di sperimentazione nuove strategie terapeutiche alternative, specifiche per le molteplici alterazioni patobiologiche caratteristiche di questa condizione clinica, al fine di migliorare ulteriormente i sintomi e la prognosi degli individui. Studi di fase II e di fase III stanno attualmente valutando i seguenti composti: stimolatori NO-indipendenti e attivatori del cGMP, peptide vasoattivo intestinale inalato, agonisti non-prostanoidi del recettore della prostaciclina, doppi antagonisti tissutali del recettore dell'endotelina, inibitori delle tirosin-chinasi (per lo più inibitori del PDGF) e antagonisti della serotonina.

Inibitori della Rho-chinasi, inibitori del recettore del VEGF, inibitori dell'angiopoietina-1 e inibitori dell'elastasi sono attualmente in un precoce stadio di sviluppo.

Strategie di terapia genica sono state testate nei modelli animali mentre la terapia con cellule staminali si è dimostrata efficace nei ratti trattati con monocrotalina ed è

attualmente in fase di valutazione in alcuni studi su pazienti con ipertensione arteriosa polmonare (1).

### **1.6.6 Donatori di ossido nitrico (NO-donors) e albumina nitrosilata.**

Il potente effetto vasodilatatore dell'ossido nitrico (NO) rende le strategie terapeutiche specifiche per questo *pathway* estremamente interessanti nel trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare; tra queste, le più comunemente utilizzate comprendono strategie volte all'aumento del metabolismo enzimatico della L-arginina da parte degli enzimi deputati alla sintesi dell'ossido nitrico (NOS), la somministrazione diretta di ossido nitrico e strategie agenti a valle dell'ossido nitrico, principalmente attraverso l'aumento dei livelli di cGMP, un'importante molecola effettrice coinvolta nel *signaling* dell'NO in grado di indurre vasodilatazione e inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce (83).

Nonostante la potenza e l'elevata selettività come vasodilatatore polmonare, l'ossido nitrico inalato non viene più considerato tra le terapie primarie d'elezione per il trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare anche se continua comunque ad essere utilizzato in alcuni *setting* clinici specifici, come nel trattamento dell'ipertensione polmonare persistente del neonato, e in ambito peri-operatorio (es.: *bypass* cardiopolmonare complicato dalla presenza di ipertensione arteriosa polmonare e dopo trapianto cardiaco).

A causa dell'instabilità e della breve emivita dell'ossido nitrico, un notevole interesse è attualmente rivolto allo sviluppo di addotti di ossido nitrico più stabili e al ruolo di questi nella regolazione del tono vascolare in vivo. A partire da queste considerazioni si è quindi pensato alla possibilità di impiegare peptidi sintetizzati artificialmente al fine di aumentare la biodisponibilità di NO in circolo e quindi sfruttarne gli effetti benefici su vascolarizzazione e coagulazione.

Molti gruppi di ricercatori hanno sintetizzato agenti donatori di ossido nitrico (NO-*donors*) allo scopo di rilasciare l'NO selettivamente nel sito bersaglio; per esempio, i composti NO-*donor* V-PYRRO/NO e acido 2-(acetilossi) benzoico 3-(nitrossimetile) fenil estere possono rilasciare NO nel fegato (84, 85). Tuttavia, i meccanismi di azione di questi NO-*donors* non sono ancora del tutto chiari, ragion per cui non sono ancora stati applicati in campo clinico.

Nella ricerca di un NO-*donor* più sicuro si è quindi prospettata la possibilità di utilizzare una proteina *carrier*, trasportatrice di NO, ovvero una proteina caratterizzata da un'alta efficienza di S-nitrosilazione, un'alta stabilità della forma nitrosilata in circolo e un'alta efficienza di S-transnitrosilazione all'interno delle cellule bisognose di ossido nitrico. In questo senso, l'**albumina sierica umana (HSA-Human Serum Albumin)** ha recentemente assunto un grande rilievo come potenziale candidato al ruolo di agente donatore di ossido nitrico: si tratta infatti della proteina più abbondante nel plasma umano ed ampiamente associata con gli S-nitrosotioili endogeni plasmatici. L'**albumina sierica umana S-nitrosilata (S-NO-HSA, S-nitroso Human Serum Albumin)** è stata per la prima volta sviluppata nel 2002 dal Prof. Seth Hallström nei laboratori dell'*Institute of Physiological*

*Chemistry*, presso l'Università di Graz (86), e risulta essere molto più stabile rispetto agli S-nitrosotioili a basso peso molecolare.

Per la sintesi di questo nuovo NO-*donor*, l'albumina sierica umana è stata inizialmente processata per l'esposizione di un gruppo tiolico libero in posizione Cys-34; prima della nitrosilazione si è proceduto con la riduzione (disassemblamento) dei ponti disolfuro intermolecolari mediante  $\beta$ -mercaptoetanololo e successiva purificazione dell'albumina sierica umana ridotta in cromatografia di gel-permeazione. La reazione di nitrosilazione tiolica è stata quindi effettuata con nitrito di sodio e infine neutralizzata con idrossido di sodio; l'albumina nitrosilata così ottenuta è stata dunque purificata mediante cromatografia di gel-permeazione e liofilizzata (86).

Attraverso un **rilascio graduale di ossido nitrico** l'albumina nitrosilata sembra preservare eNOS dal disaccoppiamento associato alla carenza locale di L-arginina in seguito ad una produzione eccessiva di NO da parte dell'enzima stesso; in questo modo questo NO-*donor* potrebbe prevenire la formazione eNOS-mediata di ROS (per lo più  $O_2^-$  e, conseguentemente, perossinitrito) e la successiva disfunzione endoteliale (86).

Dal momento che l'NO esogeno agisce con un meccanismo di *feedback* negativo sulla produzione stessa di NO da parte di eNOS (inibizione enzimatica da prodotto), l'ossido nitrico rilasciato dall'albumina nitrosilata potrebbe dunque ridurre la sintesi eNOS-mediata dell'NO stesso; in questo modo, la concentrazione locale di L-arginina nell'intorno enzimatico si rivelerebbe sufficiente per minimizzare o, addirittura prevenire, il disaccoppiamento e ridurre la formazione di  $O_2^-$ . L'NO esogeno rilasciato dall'albumina nitrosilata sembra anche agire attivamente come **scavenger di anione superossido** (86).

Diversi ricercatori hanno valutato il ruolo dell'albumina nitrosilata in modelli sperimentali pre-clinici di patologie caratterizzate da carenza di NO biodisponibile: ad esempio, dati di uno studio sugli effetti dell'albumina nitrosilata sul danno miocardico da ischemia/riperfusionamento (86) dimostrano come questo NO-*donor* svolga un'azione essenzialmente benefica nella riduzione del danno principalmente attraverso il mantenimento della funzione di eNOS con prevenzione del disaccoppiamento, stabilizzazione della produzione basale di NO e diminuzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. In questo studio, anche la misurazione del contenuto intracellulare dei fosfati ad alta energia descrive una maggiore preservazione della funzione mitocondriale in seguito all'impiego dell'albumina nitrosilata. Altri studi hanno inoltre dimostrato come l'utilizzo di albumina nitrosilata in condizioni di ischemia cardiaca prolungata migliori significativamente la gittata cardiaca, la funzione diastolica e la perfusione miocardica rispetto a quanto osservato in assenza del farmaco (87). In tutti i contesti patologici studiati l'impiego di albumina nitrosilata si è mostrato in grado di ridurre, o prevenire in parte, il danno endoteliale dovuto al disaccoppiamento di eNOS e l'attivazione dell'isoforma inducibile (iNOS), con conseguente diminuzione della produzione di radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto ed aumento della biodisponibilità dell'ossido nitrico a livello dell'endotelio disfunzionante.

La funzione, importante ed ampiamente riconosciuta, dell'ossido nitrico nella patobiologia dell'ipertensione polmonare rende dunque logico lo studio di un possibile ruolo degli agenti donatori di ossido nitrico in modelli animali pre-clinici di ipertensione

polmonare: la possibilità di utilizzare un *NO-donor* nel trattamento di pazienti affetti da ipertensione polmonare in sostituzione dell'ossido nitrico gassoso somministrato per via inalatoria, semplificherebbe notevolmente la gestione di questi pazienti, eliminando la necessità dell'intubazione e riducendo significativamente i costi.

## **2. SCOPO DELLO STUDIO.**

Nonostante i considerevoli progressi compiuti negli ultimi anni nel *management* sanitario dei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare e nello sviluppo di terapie farmacologiche innovative e sempre più specifiche, questa condizione clinica continua a rimanere devastante, con sintomi progressivamente debilitanti ed alta mortalità nella popolazione affetta (37).

L'obiettivo principale della prima fase di questo studio è stato condurre una valutazione approfondita, sul piano istologico, biochimico e molecolare, del **modello sperimentale di ipertensione polmonare da sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro**, un modello già precedentemente validato dal punto di vista funzionale sia in modo non invasivo, mediante analisi ecocardiografica, risonanza magnetica ed emogas, sia in modo invasivo, con il monitoraggio dei parametri emodinamici. Tale modello mima essenzialmente la condizione di **ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite** (sottogruppo 1.4.4), una condizione clinica particolarmente rilevante in ambito cardiocirurgico dal momento che una significativa proporzione degli individui con un difetto cardiaco congenito sembra sviluppare un quadro di ipertensione arteriosa polmonare (8).

La disponibilità di un modello sperimentale simile, in grado di riprodurre il più fedelmente possibile il quadro strutturale, morfologico, biochimico e molecolare caratteristico dell'ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite, potrebbe risultare particolarmente utile per chiarire alcuni aspetti ancora dubbi relativi a questa condizione patologica. Non è ancora ben chiaro, per esempio, il ruolo eziopatogenetico dell'aumentato flusso ematico polmonare nei soggetti con cardiopatie congenite a *shunt* sinistro-destro e anche le cause della rapida progressione di alcune cardiopatie congenite semplici associate a *shunt* sinistro-destro pre-tricuspidalico (es.: il difetto interatriale), verso quadri severi di ipertensione polmonare (sindrome di Eisenmenger) rimangono tuttora sconosciute.

Nella prima fase dello studio (fase di valutazione, osservazionale e descrittiva), la **valutazione istologica** del modello sperimentale è stata eseguita su sezioni di ventricolo destro e a livello delle arteriole polmonari, al fine di identificare l'eventuale presenza delle tipiche lesioni tissutali caratterizzanti le diverse fasi dell'ipertensione polmonare. Lo scopo principale dell'**indagine biochimica e molecolare** consisteva invece nel fornire una validazione più solida circa la bontà del modello, principalmente attraverso l'analisi di alcune vie di segnale potenzialmente coinvolte nello sviluppo di ipertensione polmonare e nel rimodellamento ventricolare destro da sovraccarico cronico di volume, ed esaminando il contenuto cellulare dei fosfati ad alta energia e i livelli intracellulari di glutatione ossidata, rispettivamente indici di funzionalità mitocondriale (stato energetico cellulare) e stress ossidativo.

Qualora opportunamente validato, il modello animale in questione si potrebbe rivelare di fondamentale importanza anche per lo studio, la sperimentazione e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche sempre più mirate ed efficaci nel trattamento dell'ipertensione polmonare. Conseguentemente, l'obiettivo della seconda fase dello studio è stato quello

di valutare gli effetti sull'ipertensione polmonare e sul rimodellamento del ventricolo destro della somministrazione in acuto di **albumina nitrosilata**, un nuovo agente donatore di ossido nitrico (*NO-donor*) sviluppato per la prima volta dal Prof. Seth Hallström nei laboratori dell'*Institute of Physiological Chemistry*, presso l'Università di Graz. Tali effetti sono stati principalmente valutati in relazione allo stato energetico cellulare, mediante analisi del contenuto dei fosfati ad alta energia, ai livelli di stress ossidativo, mediante determinazione del rapporto glutazione ossidato/glutazione ridotto, e alle vie di segnale considerate nella prima fase di validazione del modello.

### **3. MATERIALI E METODI**

Le procedure chirurgiche per la creazione della fistola aorto-cavale nel modello animale e la somministrazione in acuto di albumina nitrosilata sono state eseguite presso i laboratori del C.I.R.S.A.L (Centro Interdipartimentale di servizio alla Ricerca Sperimentale che utilizza Animali da Laboratorio, Resp. Prof. Leonardo Chelazzi) agli Istituti Biologici, Università degli Studi di Verona.

I preparati istologici di miocardio ventricolare destro e tessuto polmonare sono stati ottenuti ed esaminati presso il Dipartimento di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona (AOUI) (Resp. Dott.ssa Anna Tomezzolli). L'estrazione proteica e l'analisi Western Blot sono state condotte rispettivamente presso il Laboratorio del Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Chimica Biologica, Istituti Biologici, Università degli Studi di Verona (Resp. Dott.ssa Sofia Giovanna Mariotto e Dott.ssa Alessandra Carcereri De Prati) e presso il Laboratorio di Biologia Cellulare e delle malattie linfoproliferative (Resp. Dott.ssa Maria Teresa Scupoli), L.U.R.M. (Laboratorio Universitario di Ricerca Medica), Università degli Studi di Verona.

La valutazione biochimica della funzionalità mitocondriale, mediante analisi del contenuto intracellulare dei fosfati ad alta energia, e la determinazione dei livelli cellulari di stress ossidativo sono state eseguite nei laboratori dell'*Institute of Physiological Chemistry* (Resp. Prof. Seth Hallström), presso l'Università di Graz.

#### **3.1 Animali e disegno sperimentale.**

La stabulazione, la manipolazione e il sacrificio degli animali sono stati eseguiti secondo le normative vigenti (Dichiarazione di Helsinki e linee guida per la cura e l'utilizzo degli animali da laboratorio, *Institute of Laboratory Animal Resources, National Institutes of Health*).

Ratti maschi adulti del ceppo Sprague-Dawley, del peso di 400 ± 50 grammi, sono stati mantenuti in stanze a temperatura ed umidità controllata, con tipico ciclo luce-buio e nutriti con mangime standard e acqua ad libitum.

Lo studio è stato essenzialmente diviso in due fasi: una **prima fase di valutazione del modello**, a carattere prettamente **osservazionale e descrittivo**, e una **seconda fase di valutazione degli effetti del trattamento in acuto con albumina nitrosilata** nel modello animale in esame.

Nella prima fase (fase di valutazione, osservazionale e descrittiva) gli animali sono stati suddivisi in 2 gruppi di 15 (Fig. 39):

- **Gruppo SHAM** (n=15): *sham operation*. Costituisce il gruppo di controllo, ovvero senza la creazione di *shunt* aorto-cavale. Dopo 20 settimane, è stata condotta l'analisi istologica, biochimica e molecolare su campioni di miocardio ventricolare destro e tessuto polmonare;

- **Gruppo SHUNT** (n=15): shunt aorto-cavale. Costituisce il gruppo di analisi, ovvero con la creazione di *shunt* aorto-cavale. Dopo 20 settimane, è stata condotta l'analisi istologica, biochimica e molecolare su campioni di miocardio ventricolare destro e tessuto polmonare.

In questa fase, i ratti con *shunt* aorto-cavale persistente per un periodo complessivo di 20 settimane (gruppo SHUNT), sono stati direttamente confrontati con i ratti *sham-operated* di controllo (gruppo SHAM) e analizzati dal punto di vista istologico (n=5), biochimico e molecolare (n=10).

Nella seconda fase dello studio (fase di trattamento) 20 ratti sottoposti ad intervento di creazione di *shunt* aorto-cavale, dopo un periodo di osservazione della durata di 20 settimane, sono stati randomizzati al trattamento in acuto con albumina sierica umana S-nitrosilata (S-NO-HSA) o albumina sierica umana (HSA), determinando i seguenti gruppi (Fig. 39):

- **Gruppo SHUNT + HSA** (n=10): infusione di HSA. Costituisce il gruppo di controllo; esposizione allo *shunt* aorto-cavale per 20 settimane, quindi infusione continua di albumina sierica umana NON nitrosilata (HSA) (0,3  $\mu$ mol/kg/h) per 60 minuti e analisi biochimica e molecolare su campioni di miocardio ventricolare destro e tessuto polmonare.
- **Gruppo SHUNT + S-NO-HSA** (n=10): infusione di S-NO-HSA. Costituisce il gruppo di trattamento; esposizione allo *shunt* aorto-cavale per 20 settimane, quindi infusione continua di albumina sierica umana nitrosilata (S-NO-HSA) (0,3  $\mu$ mol/kg/h) per 60 minuti e analisi biochimica e molecolare su campioni di miocardio ventricolare destro e tessuto polmonare.

In questa fase sono stati dunque valutati dal punto di vista biochimico e molecolare gli effetti del trattamento in acuto con albumina nitrosilata nei ratti con *shunt* aorto-cavale persistente (20 settimane) (gruppo SHUNT + S-NO-HSA) rispetto agli animali di controllo (gruppo SHUNT + HSA).

L'albumina nitrosilata, inizialmente liofilizzata e conservata a -20°C, è stata dissolta in soluzione fisiologica salina (NaCl 0.9%); anche l'albumina sierica umana NON nitrosilata è stata diluita nella medesima soluzione.

I ratti sono stati inizialmente storditi mediante inalazione dei vapori di etere dietilico e quindi anestetizzati con iniezione intraperitoneale di tiopental sodico (Pentotal®, 40 mg/kg) e adagiati sul tavolo operatorio in posizione supina. Immediatamente dopo la somministrazione del farmaco anestetico si è proceduto con l'intubazione oro-tracheale degli animali per mezzo di un tubicino atraumatico costituito da una cannula venosa di 18 G; i ratti sono stati dunque ventilati meccanicamente mediante respiratore automatico per

roditori (Rodent Servo Ventilator) con una miscela di ossigeno e isofluorano al 1,5% (Forene; Abbot, Baar, Svizzera) per il mantenimento dell'anestesia durante l'intera procedura chirurgica. La frazione di ossigeno inspirato ( $F_{iO_2}$ ) è stata mantenuta al 90%, il volume *tidal* impostato a 15 ml/kg con una frequenza di 80 atti respiratori al minuto.

Durante la creazione della fistola aorto-cavale la temperatura della stanza è stata mantenuta tra i 23 e i 25°C, uno strato di materiale isolante (sughero) è stato posizionato tra il corpo dell'animale e il tavolo operatorio e una lampada a raggi infrarossi è stata posizionata accanto alla lampada scialitica allo scopo di mantenere l'omeotermia degli animali.

Prima di procedere con l'operazione chirurgica, la superficie addominale è stata rasata e disinfettata con clorexidina.

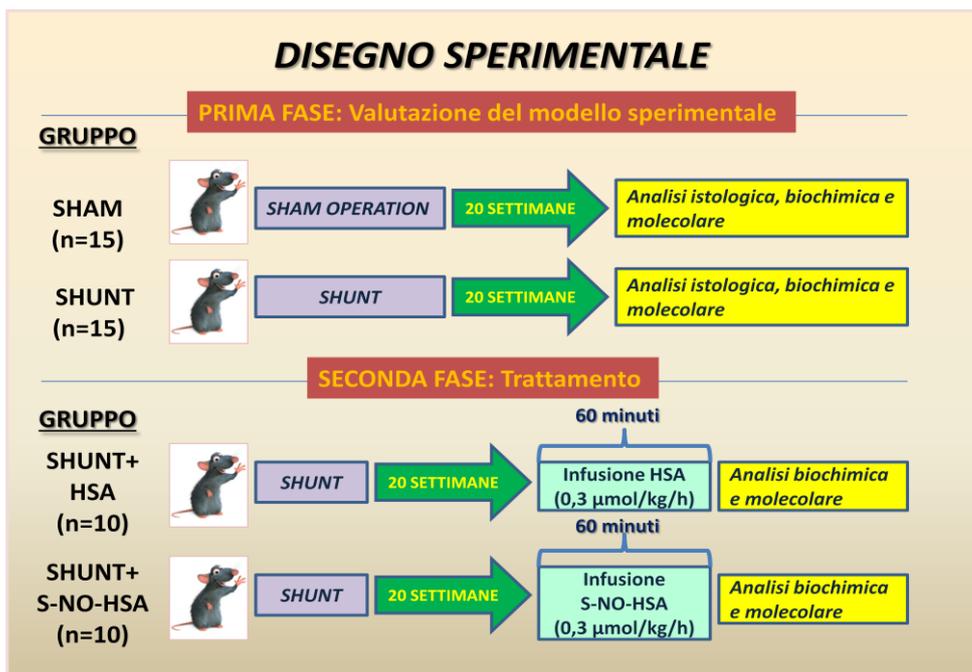


Figura 39. Disegno sperimentale.

### 3.2 Creazione della fistola aorto-cavale.

Lo *shunt* aorto-cavale è stato creato nei ratti anestetizzati, intubati e posti supini sul tavolo operatorio.

Dopo incisione sulla linea mediana addominale, l'aorta addominale discendente, immediatamente al di sotto delle arterie renali, è stata esposta ed isolata dai tessuti circostanti e tale tratto dell'aorta addominale è stato quindi circondato con un filo di sutura tipo TICRON 3-0; si è proceduto quindi con l'esposizione della porzione sub-renale dell'aorta addominale e della porzione addominale della vena cava inferiore. Nel punto in cui l'aorta e la vena cava condividono la stessa fascia è stata quindi creata una borsa di tabacco (Fig. 40) sulla parete aortica per mezzo di un filo di sutura tipo 8-0 in

polipropilene; a questo punto, per limitare il sanguinamento, l'aorta è stata temporaneamente occlusa con l'utilizzo del filo di Ticon precedentemente posizionato.



**Figura 40. Esposizione della porzione sotto-renale dell'aorta addominale e della porzione addominale della vena cava inferiore e creazione della borsa di tabacco nel punto di condivisione della stessa fascia.**

La fistola aorto-cavale è stata dunque creata con l'ausilio di un angiocatetere 20 G, inserito attraverso la borsa di tabacco per passare lentamente la parete anteriore e posteriore dell'aorta fino a raggiungere il punto di giunzione con la vena cava inferiore e penetrando la parete di quest'ultima (Fig. 41); a questo punto, la borsa di tabacco è stata stretta e legata mentre l'angiocatetere veniva ritirato (Fig. 42).



**Figura 41. Creazione della fistola aorto-cavale con l'ausilio di un angiocatetere 20G inserito attraverso la borsa di tabacco per passare lentamente la parete anteriore e posteriore dell'aorta fino al raggiungimento del punto di giunzione con la vena cava e penetrando infine la parete di quest'ultima.**



**Figura 42. Stringimento e legatura della borsa di tabacco con contemporanea rimozione dell'angiocattetere prima del rilascio del filo occlusivo di Ticon.**

Dopo la rimozione del filo occlusivo di Ticon, la distensione e la pulsazione della vena cava inferiore, nonché il mescolamento del sangue venoso con il sangue arterioso, visibili anche ad occhio nudo, confermavano la buona riuscita della procedura chirurgica (Fig. 43).



**Figura 43. Rimozione del filo occlusivo di Ticon: la distensione e la pulsazione della vena cava e la mescolanza del sangue venoso con il sangue arterioso confermano la buona riuscita della procedura chirurgica.**

Al termine dell'operazione, l'addome degli animali è stato quindi richiuso con l'utilizzo di una sutura continua 4-0; questa procedura chirurgica è stata applicata per i ratti del gruppo SHUNT e per quelli successivamente trattati con albumina sierica umana NON nitrosilata (gruppo SHUNT +HSA) o nitrosilata (gruppo SHUNT+S-NO-HSA); negli animali del gruppo SHAM, invece, la puntura dell'aorta e la creazione della fistola aorto-cavale non sono state eseguite (*sham operation*).

Dopo un periodo di osservazione della durata complessiva di 20 settimane, gli animali dei gruppi SHUNT+HSA e SHUNT+S-NO-HSA sono stati trattati rispettivamente con albumina NON nitrosilata e nitrosilata, in infusione continua per 60 minuti. Al termine

del trattamento il ventricolo destro e i polmoni sono stati rapidamente espianati dagli animali di tutti i gruppi ed appropriatamente conservati per le analisi successive.

### **3.3 Allestimento dei preparati istologici.**

I **polmoni** degli animali (n = 5 per gruppo, gruppi SHAM e SHUNT) sono stati delicatamente excisi ed immediatamente fissati in paraformaldeide (PFA) al 4%, in rapporto volumetrico di 20:1 con il pezzo, per la preservazione della morfologia cellulare e dell'architettura tissutale attraverso l'arresto dei processi autolitici e degradativi conseguenti alla mancanza di irrorazione sanguigna. I campioni biotici fissati sono stati successivamente posizionati in opportune biocassette da inclusione e quindi processati per l'inclusione in paraffina attraverso una prima fase di disidratazione con concentrazioni scalari ascendenti di alcol etilico (da 70% a 100%) per la completa rimozione dell'acqua tissutale, una seconda fase di diafanizzazione per la sostituzione dell'etanolo con xilolo, un solvente della paraffina, e una fase finale di permeazione con paraffina liquida, alla temperatura di 56°C. Al termine della processazione, si è quindi proceduto con l'inclusione in paraffina dei campioni tissutali per l'ottenimento di blocchetti di paraffina solida, pronti per il taglio al microtomo. Le sezioni tissutali ottenute, spesse 4-6 µm, sono state fatte aderire alla superficie superiore di un vetrino portaoggetto per uso istologico, delle dimensioni di 7,5 x 2,5 cm e spessore di 1-1,2 mm e successivamente sottoposte a "sparaffinatura" per l'eliminazione completa della paraffina e reidratazione delle sezioni. In questa fase, i vetrini con le sezioni sono stati dunque immersi in una serie di vaschette contenenti prima xilolo, per rimuovere la paraffina, poi alcoli a diversa concentrazione, per rimuovere lo xilolo, e, infine, acqua.

Si è proceduto dunque con la colorazione istologica con ematossilina-eosina, una colorazione di tipo acido-base: l'ematossilina, basica, una volta ossidata ad emateina, consente la visualizzazione dei nuclei cellulari che appaiono di un colore blu intenso; l'eosina è invece un colorante debolmente acido che si lega alle proteine del citoplasma o della matrice extracellulare colorandole in rosa. Le sezioni colorate sono state infine sottoposte ad ulteriore disidratazione e diafanizzazione mediante passaggi consecutivi in vaschette contenenti serie crescenti di alcol, 75%, 85%, 95% e 100% e, quindi, xilolo.

Si è proceduto infine con il montaggio dei vetrini portaoggetto colorati con un opportuno mezzo di montaggio e vetrini coprioggetto estremamente sottili.

L'analisi in microscopia ottica dei preparati istologici così ottenuti ha reso possibile la valutazione delle diverse lesioni tissutali presenti nelle arteriole polmonari e caratterizzanti le diverse fasi di progressione istologica dell'ipertensione polmonare; in particolare è stata valutata la presenza di **ipertrofia della tonaca media vascolare**, tipica della fase precoce della patologia polmonare, e la presenza di **lesioni plessiformi**, caratteristiche della fase più tardiva ed irreversibile.

### **3.4 Processamento e conservazione dei campioni biotipici tissutali.**

20 settimane dopo l'operazione chirurgica, il **ventricolo destro** e i **polmoni** di ogni animale (n = 10 per gruppo; gruppi SHAM, SHUNT, SHUNT+HSA e SHUNT+S-NO-HSA) sono stati delicatamente excisi e brevemente lavati dal sangue residuo con soluzione fisiologica salina (NaCl 0.9%) pre-raffreddata a 4°C; ogni campione tissutale è stato quindi rapidamente diviso in tre parti, destinate alle analisi successive (Western blot, determinazione del contenuto cellulare dei fosfati ad alta energia e valutazione dello stato di ossidazione del glutatione come stima indiretta dei livelli intracellulari di stress ossidativo). I tessuti così processati sono stati poi immediatamente immersi in azoto liquido per il congelamento rapido (*snap-freezing*) e conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

### **3.5 Preparazione degli estratti proteici tissutali.**

Per l'analisi dei livelli di fosforilazione di **ERK1/2**, **Akt**, e **cTnI** e delle rispettive proteine totali nei campioni di **ventricolo destro**, gli estratti proteici totali sono stati ottenuti "pestellando" 30 mg di tessuto ventricolare destro sui vapori di azoto liquido, con l'utilizzo di un mortaio e di un pestello in ceramica, fino all'ottenimento di una polvere rosata, fine e sottile, omogenea e priva di granuli. La polvere tissutale così ottenuta è stata trasferita in eppendorf con 400 µl di Buffer di lisi (Buffer D) pre-raffreddato in ghiaccio, contenente: HEPES 20 mM (pH 7.7), NaCl 420 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, IGEPAL-CA 630 1%, glicerolo 20%, un *cocktail* di inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) e un *cocktail* di inibitori delle fosfatasi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Per l'analisi dell'espressione/attivazione delle proteine **eNOS** e **iNOS** nel **ventricolo destro** e la determinazione dei livelli di fosforilazione di **ERK 1/2**, **Akt** e delle rispettive proteine totali, nonché del contenuto proteico di **eNOS** e **iNOS** nelle **biopsie polmonari**, sono stati rispettivamente polverizzati 60 mg di tessuto ventricolare destro e tessuto polmonare, sui vapori di azoto liquido. Per l'isolamento delle frazioni proteiche citosoliche, la polvere tissutale ottenuta è stata risospesa in 200 µl di Buffer di lisi (Buffer H) pre-raffreddato in ghiaccio contenente: HEPES 50 mM (pH 7.4-7.7), EDTA 1 mM, un *cocktail* di inibitori delle proteasi (Roche Diagnostics) e un *cocktail* di inibitori delle fosfatasi (Sigma-Aldrich).

I tessuti polverizzati sono stati dunque omogenizzati nei rispettivi Buffer di lisi con un omogenizzatore ultra-turrax T25 (IKA, Milano, Italia), alternando brevi periodi di attiva omogenizzazione (15 secondi) a periodi più lunghi di permanenza in ghiaccio (1 minuto); le membrane e i detriti cellulari più grossolani sono stati infine rimossi mediante centrifugazione degli omogenati a 25000 g per 30 minuti at 4°C.

La concentrazione delle proteine, totali o citosoliche, contenute nei surnatanti è stata successivamente determinata secondo il metodo Bradford (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) e alla stessa quantità di proteine (in µg) per ogni campione è stato aggiunto un volume appropriato di *Loading Buffer* (o *Sample Buffer*) (Tris-HCl 0.0625M,

pH 6.8, SDS 2%, glicerolo 8%). I campioni proteici così preparati, contenenti la medesima quantità di proteine totali o citosoliche, sono stati dunque pre-riscaldati a 95-100°C per 5 minuti, per favorire la denaturazione delle proteine, brevemente centrifugati alla massima velocità e infine conservati a -20°C fino al momento dell'analisi Western blot.

I surnatanti residui sono invece stati sottoposti a *snap-freezing* in azoto liquido e conservati a -80°C.

### **3.6 Analisi Western blot.**

Dopo l'aggiunta dell'appropriato volume di  $\beta$ -mercaptoetanolo e Blu di bromofenolo alle percentuali finali di 5% e 0.002% rispettivamente, gli estratti proteici, totali o citosolici, di ventricolo destro e polmone (20-50  $\mu$ g proteine/lane) e l'opportuno marcatore di peso molecolare (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) sono stati risolti in funzione del peso molecolare mediante elettroforesi SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) in condizioni denaturanti, in gel di poliacrilammide al 7.5%, 10% o 12%, sotto l'effetto di un campo elettrico mantenuto ad amperaggio costante: 15 mA fino all'entrata delle proteine nel gel di corsa, quindi 25 mA per tutta la durata della corsa elettroforetica.

Le proteine così separate sono state quindi trasferite su membrane di PVDF (*PolyVinylidene DiFluoride*) (Millipore, Billerica, MA, USA) mediante *elettroblotting* a voltaggio costante (70 V per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente), utilizzando un tampone di trasferimento (*Transfer Buffer*) contenente: Tris 25 mM, glicina 190 mM e 2-propanolo (isopropanolo) 10% (pH 8.3).

Le membrane sono state successivamente immerse in *Blocking Solution* (*Tris-Buffered Saline* (TBS) contenente Tween-20 0.1% e BSA (*Bovine Serum Albumin*) 2.5% o 5%) per 45 minuti a temperatura ambiente, in agitazione, per la saturazione dei siti aspecifici, quindi incubate a 4°C per 12 ore (*overnight*), in leggera agitazione, con i seguenti anticorpi primari:

- **Anticorpo anti-phospho-ERK 1/2:**  
residui fosforilati: **Thr202/Tyr204**;  
diluizioni: 1:8500 (ventricolo destro); 1:10000 (polmone)  
(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- **Anticorpo anti-ERK 1/2 totale:**  
diluizione: 1:4500 (ventricolo destro e polmone)  
(Cell Signaling Technology)
- **Anticorpo anti-phospho-Akt:**  
residuo fosforilato: **Ser473**;  
diluizione: 1:10000 (ventricolo destro e polmone)

(Cell Signaling Technology)

- **Anticorpo anti-Akt totale:**  
diluizioni: 1:3500 (ventricolo destro); 1:5000 (polmone)  
(Cell Signaling Technology)
- **Anticorpo anti-phospho-cTnI:**  
residui fosforilati: **Ser23/24**;  
diluizione: 1:4000 (ventricolo destro);  
(Cell Signaling Technology)
- **Anticorpo anti-cTnI totale:**  
diluizione: 1:4000 (ventricolo destro);  
(Cell Signaling Technology)
- **Anticorpo anti-eNOS:**  
diluizioni: 1:3000 (ventricolo destro); 1:5000 (polmone);  
(BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)
- **Anticorpo anti-iNOS:**  
diluizione: 1:200 (ventricolo destro e polmone);  
(abcam, Cambridge, UK)
- **Anticorpo anti-beta-actina:**  
diluizioni: 1:3000 (ventricolo destro); 1:150000 (polmone);  
(Cell Signaling Technology)
- **Anticorpo anti-GAPDH:**  
diluizione: 1:3000 (ventricolo destro);  
(Cell Signaling Technology)

Il giorno seguente le membrane sono state incubate con gli appropriati anticorpi secondari, anti-*rabbit* o anti-*mouse* IgG, coniugati con la perossidasi di rafano (HRP-*HorseRadish Peroxidase*) (Amersham Biosciences, GE Healthcare Piscataway, NJ, USA), per 1 ora e 30 minuti in leggera agitazione a temperatura ambiente.

Le bande corrispondenti alle proteine di interesse sono state visualizzate mediante chemiluminescenza (ECL- *Enhanced ChemiLuminescence*, *LiteAblot® PLUS reagent*, Euroclone, Milano, Italia) ed esposizione delle membrane a lastre per radiografia (Kodak, Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA). Dopo scansione ed acquisizione digitale delle lastre fotografiche impressionate dal segnale di chemiluminescenza, le densità relative delle singole bande di interesse sono state stimate con l'utilizzo di un *software* particolare, **ImageJ**, versione 1.44 (NIH, National Institutes of Health) per l'assegnazione di valori numerici precisi utilizzabili nella successiva quantificazione e analisi statistica. Al fine di identificare la presenza di eventuali variazioni nei livelli di fosforilazione delle

proteine ERK 1/2, Akt e cTnI negli estratti proteici tissutali dei ratti con lo *shunt* aortocavale (gruppo SHUNT) rispetto agli animali *sham-operated* di controllo (gruppo SHAM) e agli animali trattati con albumina nitrosilata (gruppo S-NO-HSA), i valori densitometrici relativi alle singole proteine di interesse, fosforilate e totali, sono stati innanzitutto normalizzati sui corrispondenti valori ottenuti per le proteine *housekeeping* beta-actina o GAPDH, annullando così la variabilità sperimentale legata al caricamento dei campioni nel gel elettroforetico. Le densità delle bande relative alle singole proteine fosforilate (phospho-ERK 1/2, phospho-Akt e phospho-cTnI) sono state quindi rapportate alle densità delle bande relative alle proteine totali corrispondenti (ERK 1/2, Akt e cTnI, rispettivamente) e le medie dei rapporti risultanti (phospho-ERK 1/2\ERK 1/2, phospho-Akt\Akt e phospho-cTnI\cTnI), espresse in unità arbitrarie (a.u.), sono state infine confrontate tra i diversi gruppi (SHAM vs SHUNT e SHUNT vs S-NO-HSA).

L'analisi delle eventuali variazioni nei livelli di espressione/attivazione delle proteine eNOS e iNOS tra i diversi gruppi (SHAM vs SHUNT e SHUNT vs S-NO-HSA), è stata eseguita normalizzando i valori densitometrici delle bande relative alle proteine di interesse sui valori ottenuti per le proteine costitutivamente espresse (beta-actina o GAPDH) e confrontando tra loro le medie, espresse in unità arbitrarie (a.u.) dei rapporti risultanti (eNOS/beta-actina o GAPDH, iNOS/beta-actina o GAPDH).

### **3.7 Determinazione del glutatione ossidato e ridotto.**

L'analisi per la determinazione dei livelli di glutatione ossidato (GSSG) e ridotto (GSH) è stata eseguita presso i Laboratori dell'*Institute of Physiological Chemistry* (Resp. Prof. Seth Hallström), all'Università di Graz, secondo un metodo precedentemente descritto da Lakritz e collaboratori (88). Tale metodo consente di determinare con elevata accuratezza e precisione il glutatione ridotto e ossidato in campioni biologici contenenti da 50 a 1000 µg di proteine; anche la sensibilità di questa metodica risulta particolarmente alta (1 pmol per GSH and 2 pmol per GSSG su colonna).

Per ogni gruppo di studio considerato, campioni biotici di miocardio ventricolare destro e tessuto polmonare sono stati ottenuti dagli animali con l'ausilio di una pinza preraffreddata e rapidamente trasferiti in azoto liquido per il congelamento rapido (*snap-freezing*), quindi conservati a -80°C. Al momento dell'analisi biochimica i campioni sono stati polverizzati in azoto liquido, quindi dissolti in acido metansolfonico tamponato con DTPA (acido dietilentriamminopentacetico) e centrifugati. I surnatanti ottenuti sono stati infine diluiti con la fase mobile e successivamente iniettati in colonna cromatografica per l'analisi in HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*).

I campioni (10 - 20 µl) sono stati dunque analizzati mediante cromatografia liquida ad alta pressione/performance su una colonna cromatografica di tipo Spherisorb S3ODS-2 (3 µm, 125 mm lunghezza x 4 mm diametro) con l'utilizzo di un iniettore Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA), una pompa HPLC PU-980 (Jasco, MD, USA), un regolatore di flusso modello DPI (Shodex, NY, USA) e un detector elettrochimico ESA 5100A Coulochem (Thermo Scientific, CA, USA) costituito da una cella di resistenza alle pressioni elevate

(*guard cell*, 5020, potenziale: 0.4 V) e una cella analitica 5011 (potenziale primo elettrodo: da 0.7 a 0.79 V, gain 1, per glutatione ridotto [GSH]; potenziale del secondo elettrodo: da 0.9 a 1.2 V, gain 10, per glutatione ossidato [GSSG]) (86).

I segnali elettrochimici rilevati dal detector sono stati convertiti e trasmessi con interfaccia analogica ad un personal computer AGC mentre il *software* System Gold ha reso possibile l'acquisizione e l'analisi dei dati.

I campioni sono stati eluiti con una fase mobile costituita da: sodio acetato 0.1 mol/L, sodio diidrogeno fosfato 0.1 mol/L, SDS 400 mg/L (pH 2.0), and acetonitrile 2.5% (vol/vol). Le appropriate curve di calibrazione sono state sempre calcolate; il limite di detezione del GSSG è stato di 20 pmol (86).

### **3.8 Determinazione dello stato energetico tissutale: fosfati ad alta energia.**

L'analisi per la determinazione del contenuto tissutale dei fosfati ad alta energia è stata eseguita presso i Laboratori dell'*Institute of Physiological Chemistry* (Resp. Prof. Seth Hallström), all'Università di Graz.

Per ogni gruppo di studio considerato, campioni biotici di miocardio ventricolare destro e tessuto polmonare sono stati ottenuti dagli animali con l'ausilio di una pinza pre-raffreddata e rapidamente trasferiti in azoto liquido per il congelamento rapido (*snap-freezing*), quindi conservati a -80°C.

Al momento dell'analisi biochimica, i tessuti congelati (50-100 mg) sono stati omogenizzati con un micro-omogenizzatore e deproteinizzati in 400 µl di acido perclorico 0.4 mol/L. Dopo centrifugazione (12.000 g), un'aliquota dell'estratto acido (150 µl) per ogni campione è stata neutralizzata con 15-20 µl di carbonato di potassio 2 mol/L, mantenuto a 4°C e i surnatanti ottenuti dopo centrifugazione sono stati utilizzati per l'analisi HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) con un volume di iniezione pari a 20 µl.

I pellet degli estratti acidi sono stati invece risospesi in 1 ml di idrossido di sodio 0.1 mol/L e ulteriormente diluiti 1:10 con soluzione fisiologica salina (NaCl 0.9%) per la determinazione della concentrazione proteica mediante *BCA Protein Assay* (Pierce; Pierce Biotechnology, IL, USA).

I fosfati ad alta energia (ATP, ADP, AMP e fosfocreatina soltanto per i campioni di ventricolo destro) sono stati misurati mediante analisi HPLC su colonna Hypersil ODS (5µm; 250 x 4 mm diametro), utilizzando un campionatore automatico L-2200, due pompe L-2130 HTA e un rivelatore a serie di diodi L-2450, tutti componenti forniti dalla ditta VWR Hitachi (VWR, Vienna, Austria). I segnali rilevati dal detector (assorbanza tra 214 e 254 nm) sono stati registrati e i dati infine acquisiti ed analizzati con il *software* EZchrom Elite (VWR).

La formula seguente ha consentito il calcolo del carico energetico (*EC-Energy Charge*):

$$EC = (ATP + 0.5 ADP)/(AMP + ADP + ATP).$$

Le concentrazioni di ATP, ADP, AMP e fosfocreatina sono espresse in nanomoli per milligrammo di proteina (nmol/mg).

### **3.9 Analisi statistica.**

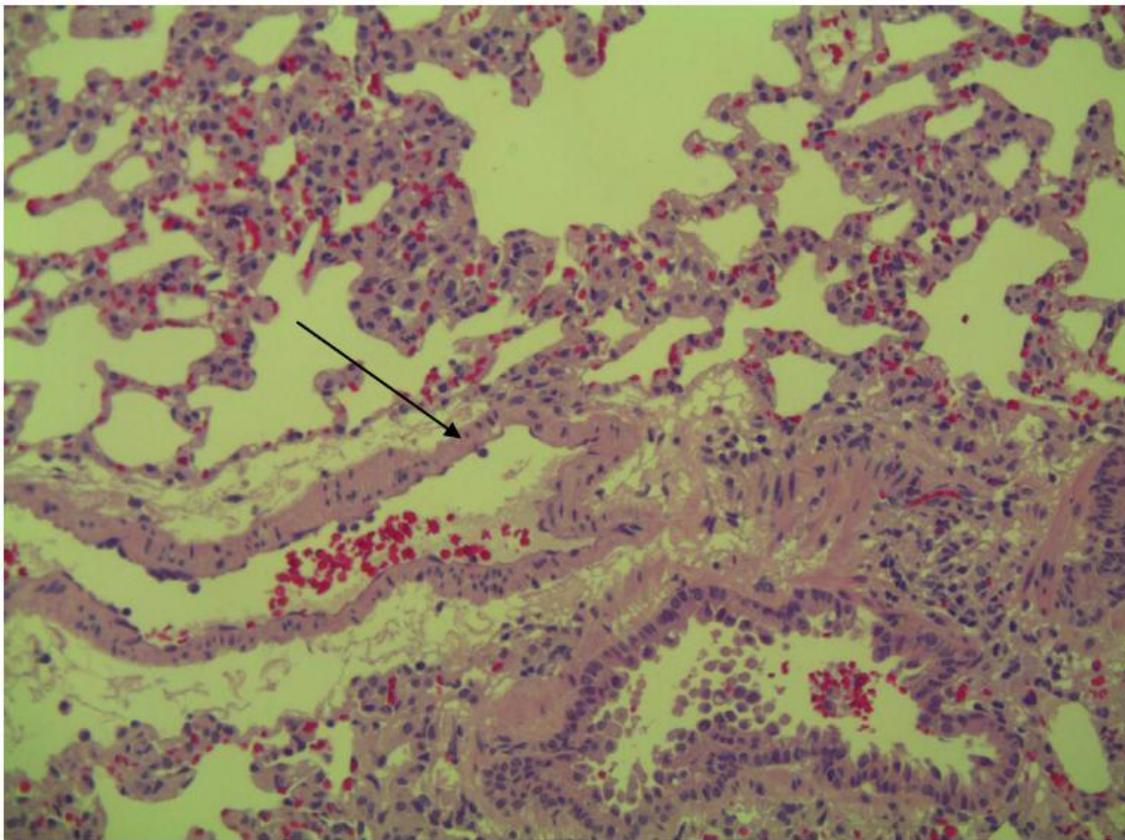
I dati sono stati raccolti e tabulati su foglio di calcolo Excel (Microsoft Office 2007) e l'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il *software* GraphPad (Prism v 5.03). Si è proceduto dapprima al calcolo della media e dell'errore standard della media (SEM) e quindi alla valutazione della significatività statistica, definita per  $p < 0.05$ , nella comparazione tra i gruppi. Quest'ultima è stata determinata mediante test della varianza ANOVA con correzione di Bonferroni quando sussistevano comparazioni multiple. I grafici sono stati ottenuti mediante il *software* GraphPad (Prism v 5.03).

## **4. RISULTATI**

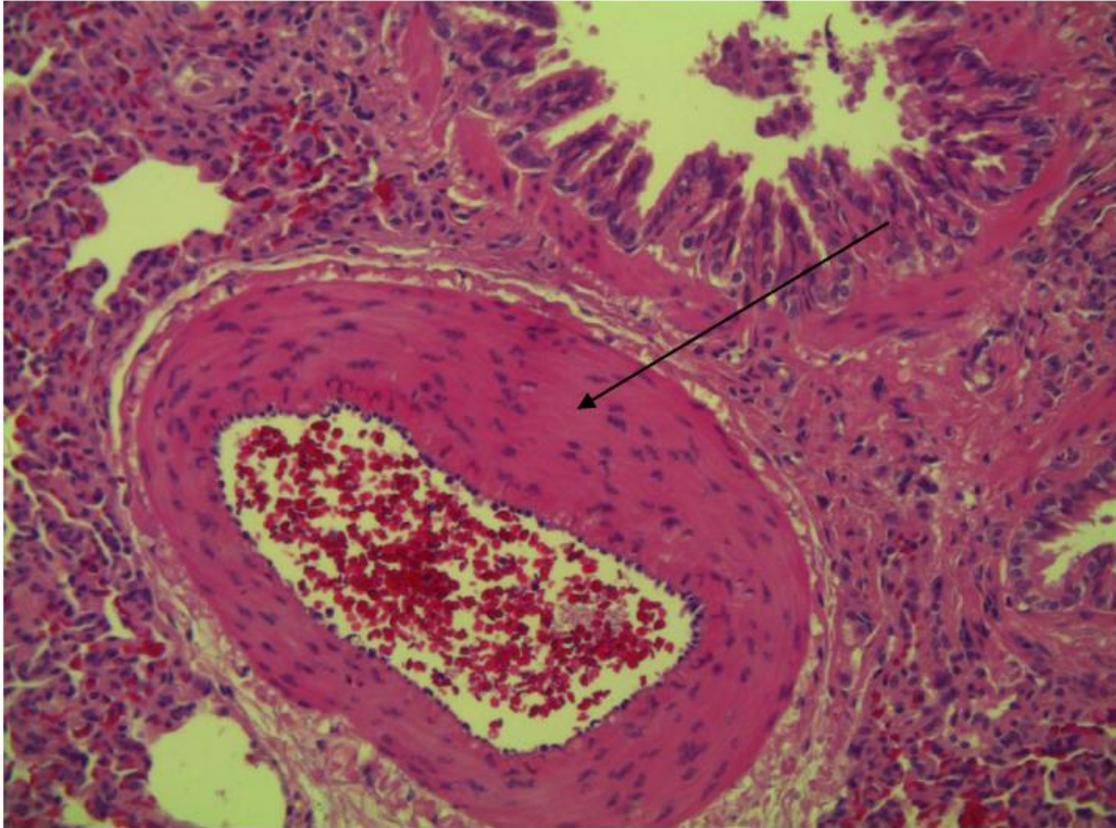
### **4.1 Valutazione istologica del modello sperimentale.**

L'analisi istologica ha evidenziato la presenza di alcune lesioni tissutali caratteristiche della fase precoce e reversibile dell'ipertensione polmonare in tutti i polmoni dei ratti *shuntati* a 20 settimane rispetto ai controlli (Fig. 44); tra queste lesioni, particolarmente visibile è risultata l'ipertrofia della tonaca media (Figg. 45 e 46).

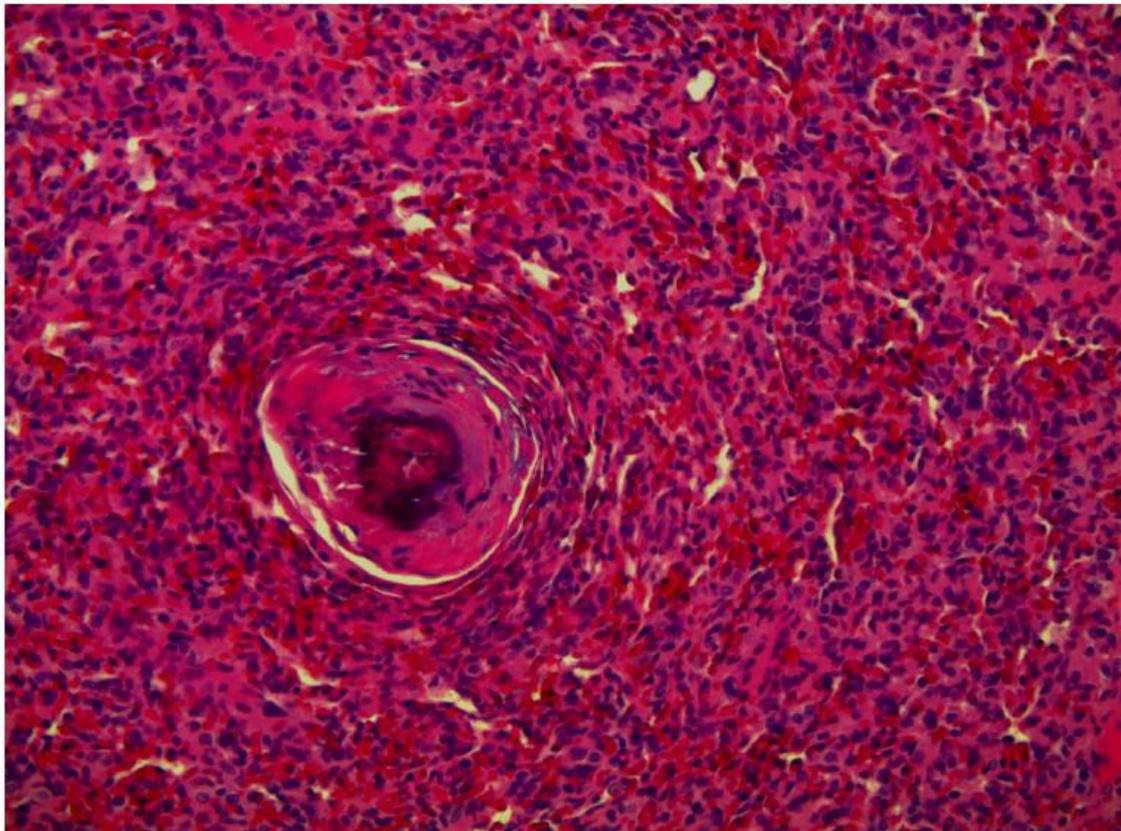
In alcuni preparati istologici è stata inoltre notata la presenza di obliterazione ed occlusione delle piccole arteriole con congestione capillare (Fig 46), indicando una progressione verso la fase tardiva della patologia; lesioni plessiformi caratteristiche di questa fase non sono tuttavia state osservate.



**Figura 44.** Polmone di ratto *sham-operated*. La freccia indica lo spessore normale della parete delle piccole arteriole.



**Figura 45.** Marcata ipertrofia della tonaca media nel polmone di ratto *shuntato* a 20 settimane.



**Figura 46.** Marcatissima ipertrofia della tonaca media in alcuni animali *shuntati* a 20 settimane, iniziale obliterazione ed occlusione delle piccole arteriole, marcata congestione capillare.

## 4.2 Analisi Western blot nel ventricolo destro: SHAM vs SHUNT (prima fase).

L'analisi Western blot, eseguita su campioni di ventricolo destro di ratti *sham-operated* (gruppo SHAM) e ratti sottoposti a *shunt* aorto-cavale (gruppo SHUNT) a distanza di 20 settimane dall'operazione, ha rivelato un incremento statisticamente significativo ( $p < 0.001$ ) dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel gruppo SHUNT rispetto al gruppo di controllo (Fig. 47).

I dati ottenuti dall'analisi di Akt hanno evidenziato una significativa riduzione ( $p < 0.05$ ) della fosforilazione (Fig. 48) nel ventricolo destro dei ratti con persistenza cronica della fistola aorto-cavale (SHUNT) rispetto alla condizione di controllo.

I livelli di fosforilazione della troponina I cardiaca (cTnI) sono invece risultati significativamente aumentati nel gruppo SHUNT ( $p < 0.01$ ) (Fig. 49).

La figura 50 mostra come non siano state rilevate differenze significative tra i due gruppi relativamente ai livelli di espressione/attivazione di eNOS nel ventricolo destro dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica, mentre una significativa *down-regolazione* ( $p < 0.05$ ) dell'espressione di iNOS è stata rivelata dall'analisi Western blot nel ventricolo destro dei ratti con *shunt* aorto-cavale (gruppo SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (gruppo SHAM) (Fig. 51).

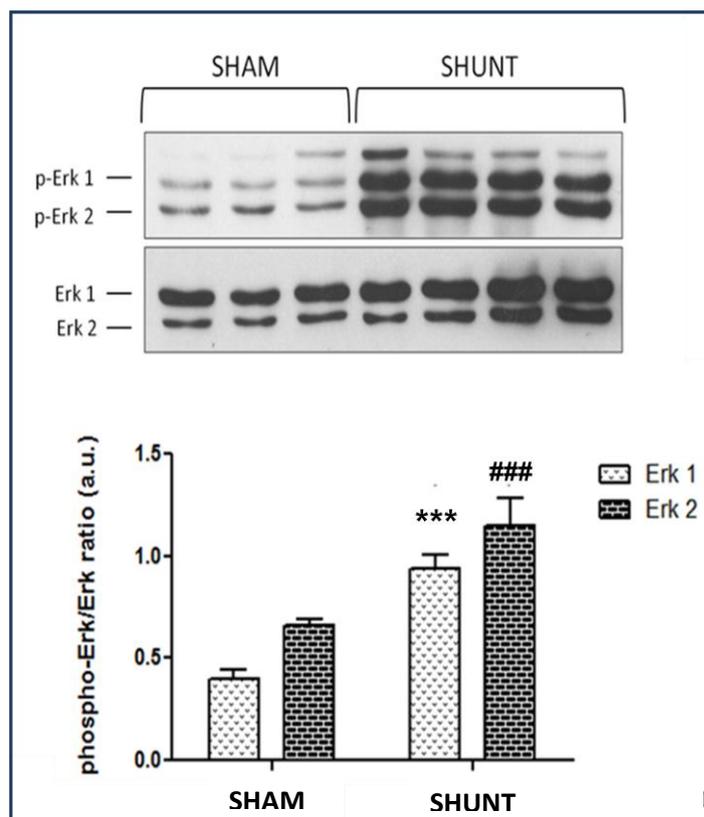


Figura 47. Analisi Western blot: significativo incremento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel ventricolo destro di ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM), dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. **Pannello superiore:** blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. **Pannello inferiore:** grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti ( $n=10$ /gruppo). I livelli di fosforilazione di ERK1/2 sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alle proteine fosforilate (p-Erk1 e p-Erk2) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (Erk 1 e Erk2). Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di espressione della beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ###,  $p < 0.001$ .

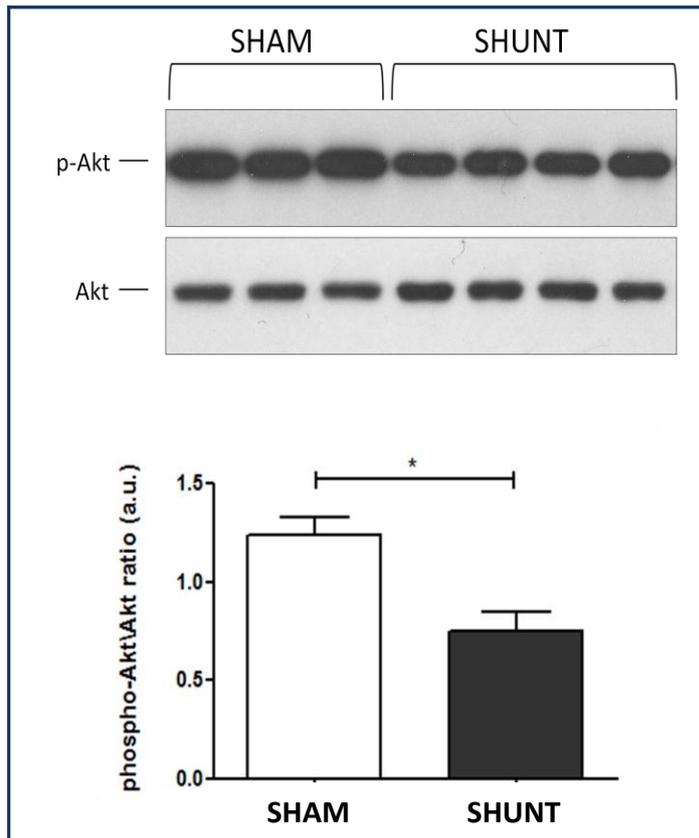


Figura 48. Analisi Western blot: significativa riduzione dei livelli di fosforilazione di Akt nel ventricolo destro di ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I livelli di fosforilazione di Akt sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alla proteina fosforilata (p-Akt) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (Akt). Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di espressione della proteina *housekeeping* beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*,  $p < 0.05$ .

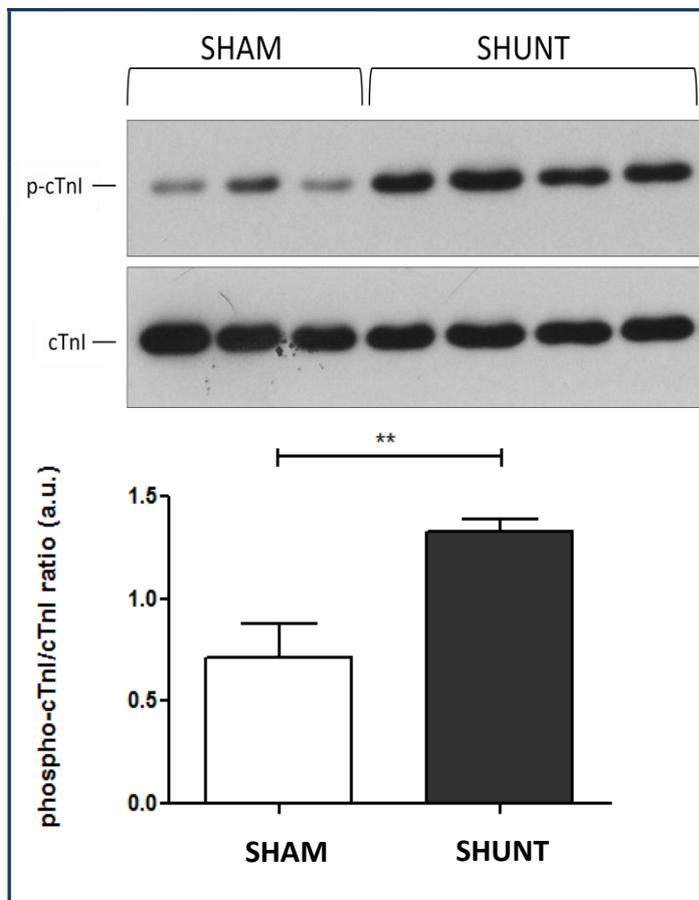


Figura 49. Analisi Western blot: significativo incremento dei livelli di fosforilazione di cTnI nel ventricolo destro di ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I livelli di fosforilazione di cTnI sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alla proteina fosforilata (p-cTnI) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (cTnI). Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di espressione della proteina *housekeeping* beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*\*,  $p < 0.01$ .

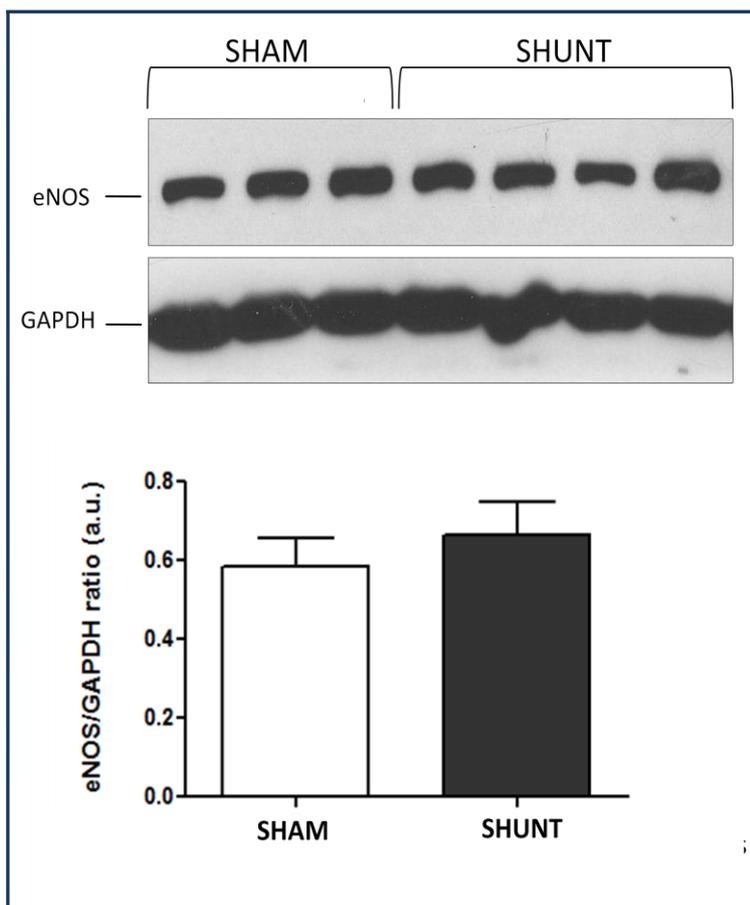


Figura 50. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di espressione/attivazione di eNOS è stata evidenziata nel ventricolo destro dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. **Pannello superiore:** blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. **Pannello inferiore:** grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione/attivazione di eNOS sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di espressione della proteina *housekeeping* GAPDH, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

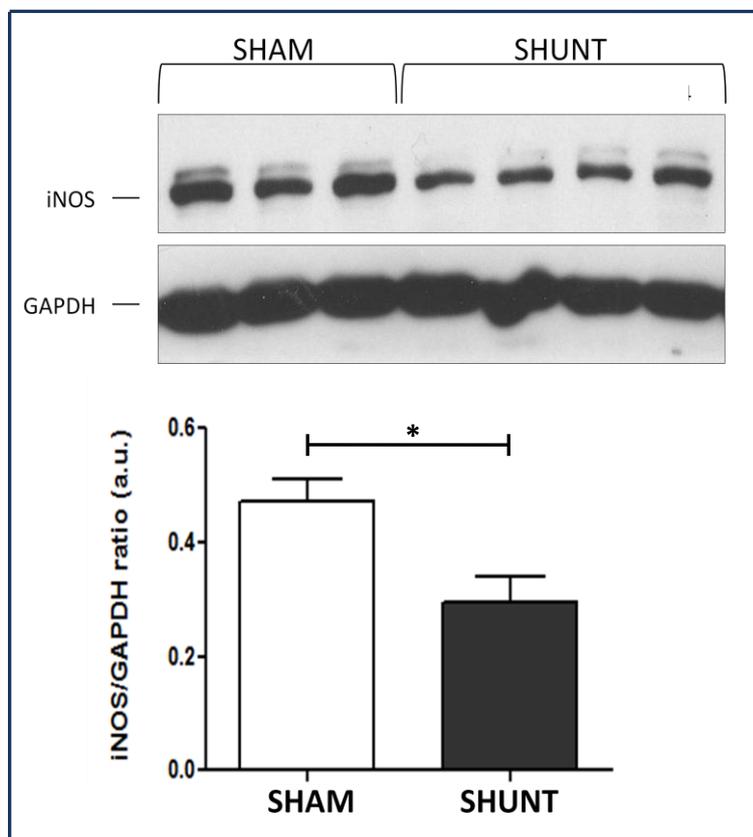


Figura 51. Analisi Western blot: significativa *down*-regolazione dei livelli di espressione di iNOS nel ventricolo destro dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. **Pannello superiore:** blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. **Pannello inferiore:** grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione di iNOS sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di espressione della proteina *housekeeping* GAPDH, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*, p<0.05.

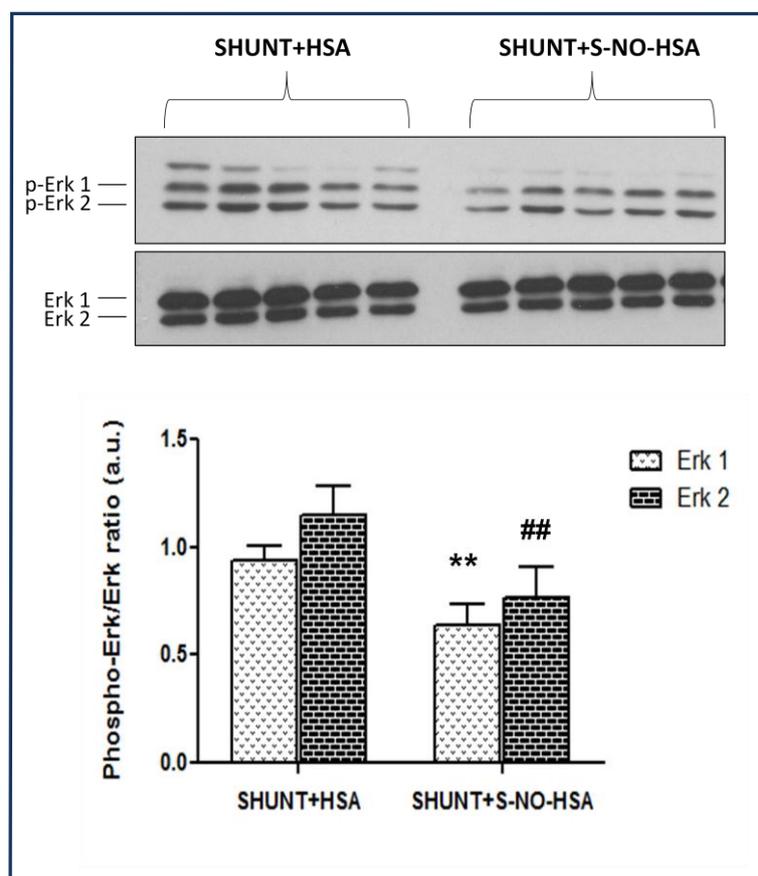
### 4.3 Analisi Western blot nel ventricolo destro: SHUNT+HSA vs SHUNT+S-NO-HSA (seconda fase).

Nella seconda fase dello studio, l'analisi Western blot, eseguita su campioni di miocardio ventricolare destro dopo trattamento con albumina sierica umana S-nitrosilata (gruppo SHUNT+S-NO-HSA), ha rivelato una significativa riduzione ( $p < 0.01$ ) dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 rispetto al gruppo di controllo (SHUNT+HSA) (Fig 52).

Non sono state invece evidenziate variazioni statisticamente significative in relazione allo stato di fosforilazione di Akt tra i due gruppi (Fig. 53), mentre una significativa diminuzione ( $p < 0.01$ ) della fosforilazione della troponina I cardiaca (cTnI) è stata mostrata nel ventricolo destro dei ratti del gruppo SHUNT+S-NO-HSA rispetto agli animali del gruppo SHUNT+HSA (Fig. 54).

Nessuna alterazione statisticamente significativa dei livelli di espressione/attivazione di eNOS nel ventricolo destro è stata dimostrata in seguito al trattamento in acuto con albumina sierica umana S-nitrosilata (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) rispetto alla somministrazione di albumina sierica umana (gruppo di controllo) (Fig 55).

L'espressione di iNOS è invece risultata significativamente *up*-regolata ( $p < 0.05$ ) nel ventricolo destro degli animali del gruppo SHUNT+S-NO-HSA rispetto al gruppo di controllo (Fig. 56).



**Figura 52. Analisi Western blot: significativa riduzione dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel ventricolo destro di ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. Pannello superiore: blots rappresentativi di 5 esperimenti indipendenti per entrambi i gruppi. Pannello inferiore: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I livelli di fosforilazione di ERK1/2 sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alle proteine fosforilate (p-Erk1 e p-Erk2) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (Erk 1 e Erk2). Tutti i dati sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di espressione della beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*\*,  $p < 0.01$ ; ##,  $p < 0.01$ .**

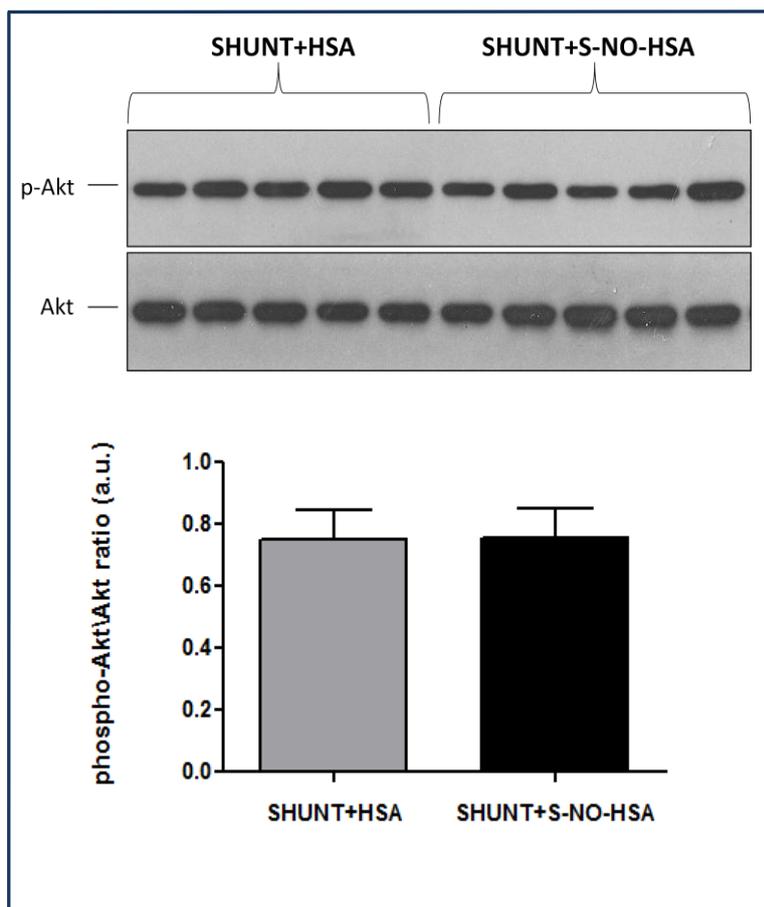


Figura 53. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di fosforilazione di Akt è stata evidenziata nel ventricolo destro dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 5 esperimenti indipendenti per entrambi i gruppi. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I livelli di fosforilazione di Akt sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alla proteina fosforilata (p-Akt) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (Akt). Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di espressione della beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

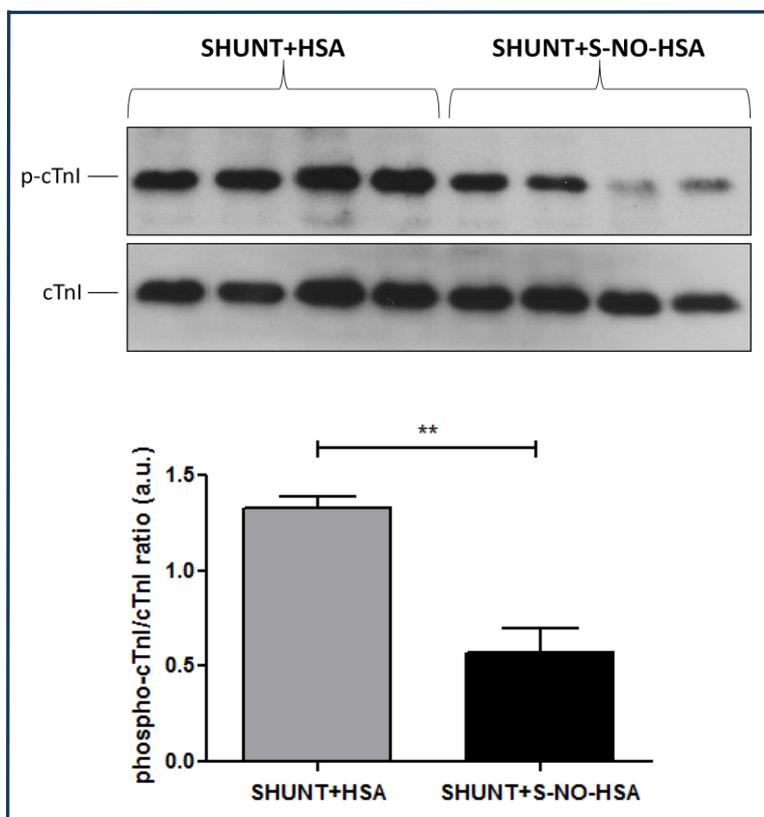
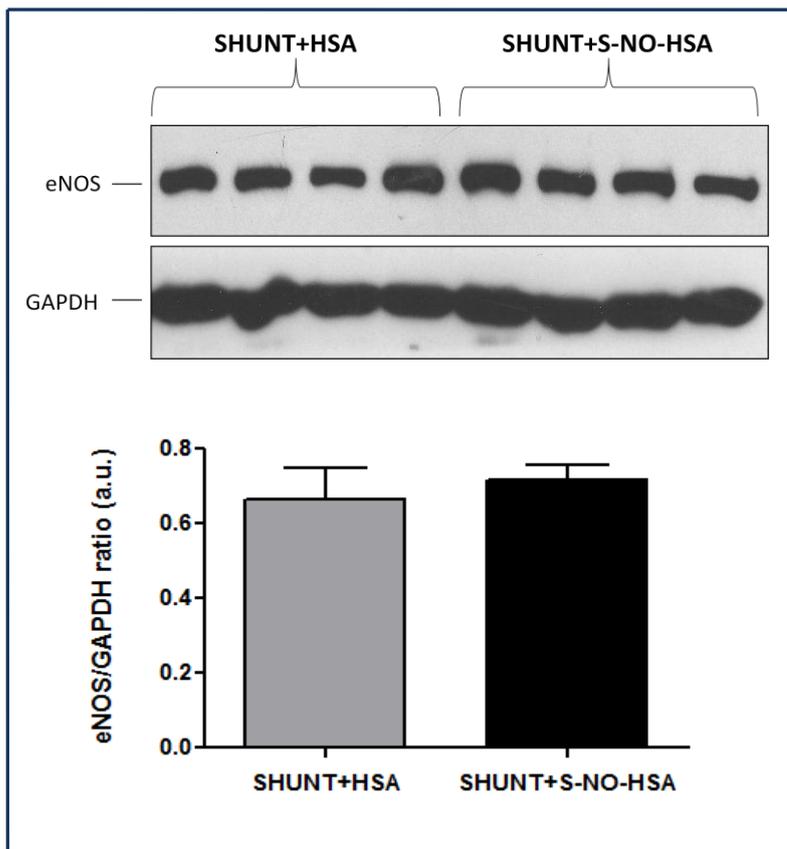


Figura 54. Analisi Western blot: significativa riduzione dei livelli di fosforilazione di cTnI nel ventricolo destro dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti per entrambi i gruppi. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I livelli di fosforilazione di cTnI sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alla proteina fosforilata (p-cTnI) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (cTnI). Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di espressione della beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e

rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*\*, p<0.01



rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

Figura 55. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di espressione/attivazione di eNOS è stata evidenziata nel ventricolo destro dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti per entrambi i gruppi. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione/attivazione di eNOS sono stati normalizzati sui corrispondenti valori di espressione della proteina *housekeeping* GAPDH, espressi in unità arbitrarie

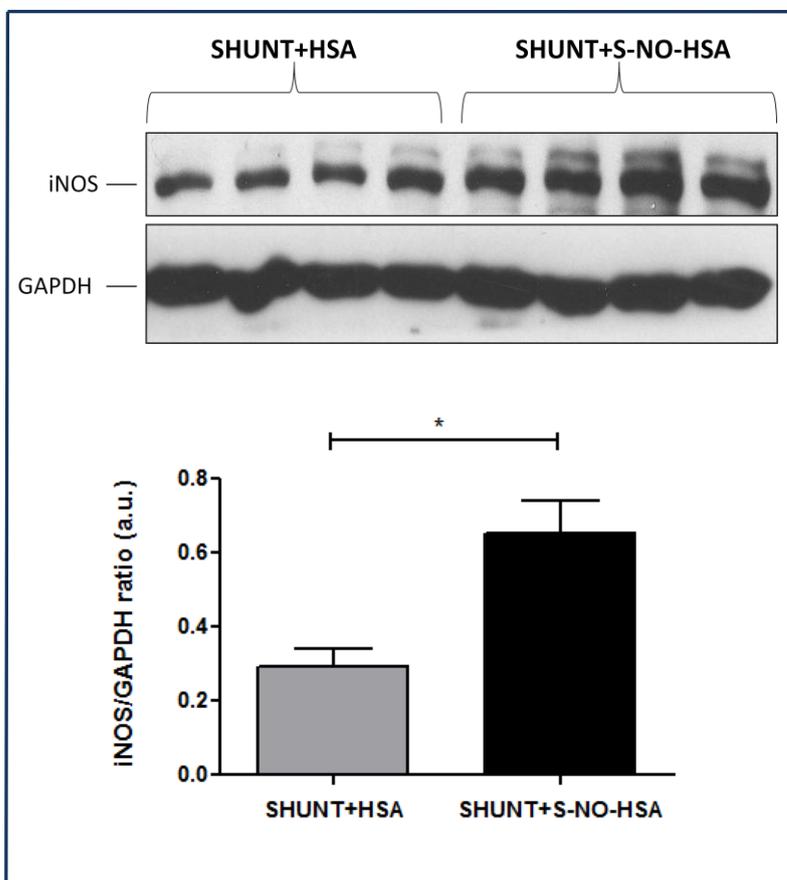


Figura 56. Analisi Western blot: significativa *up*-regolazione dei livelli di espressione di iNOS nel ventricolo destro dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti per ciascun gruppo. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione di iNOS sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di espressione della proteina *housekeeping* GAPDH espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*, p<0.05.

#### 4.4 Analisi Western blot nel tessuto polmonare: SHAM vs SHUNT (prima fase).

I ratti esposti allo *shunt* aorto-cavale per 20 settimane (gruppo SHUNT) hanno mostrato un significativo incremento ( $p < 0.01$ ) dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel tessuto polmonare rispetto agli animali *sham-operated* di controllo (gruppo SHAM) (Fig. 57).

Non sono state invece evidenziate variazioni statisticamente significative nei polmoni dei ratti del gruppo SHUNT rispetto al gruppo di controllo relativamente allo stato di fosforilazione di Akt e ai livelli di espressione/attivazione di eNOS, nonostante in entrambi i casi risulti visibile una leggera tendenza all'aumento negli animali con la fistola aorto-cavale (Fig. 58 e 59 rispettivamente).

L'analisi Western blot ha infine messo in evidenza un significativo incremento dei livelli di espressione di iNOS nel tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale (gruppo SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated*, a distanza di 20 settimane dalla procedura chirurgica (Fig. 60).

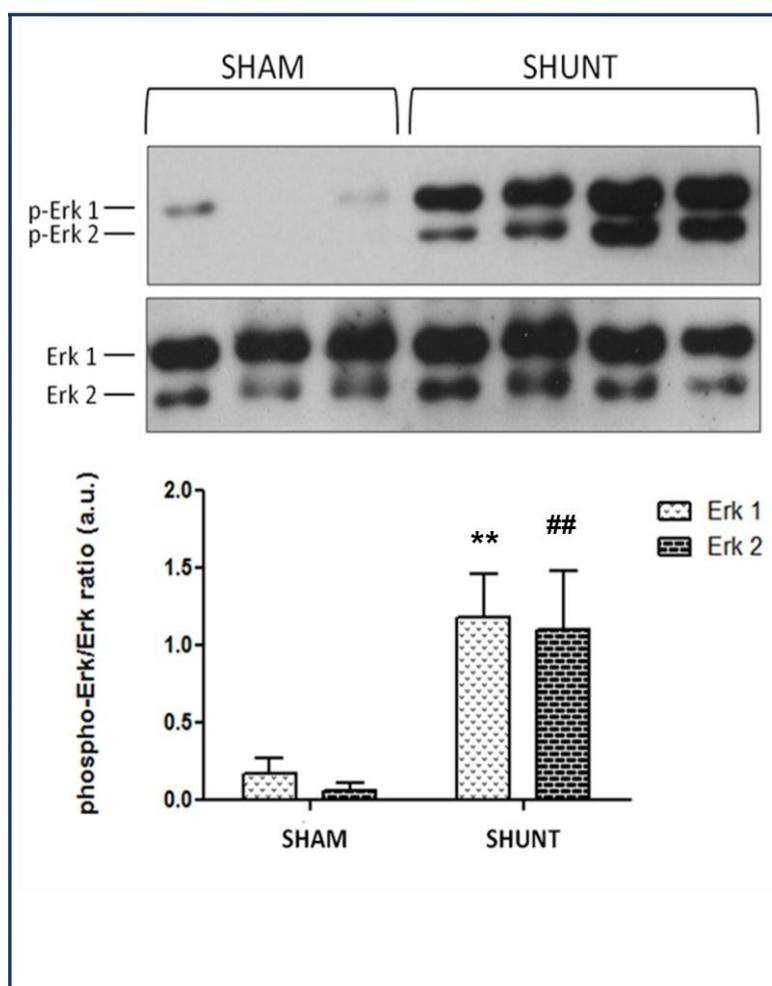


Figura 57. Analisi Western blot: significativo incremento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti ( $n=10$ /gruppo). I livelli di fosforilazione di ERK1/2 sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alle proteine fosforilate (p-Erk1 e p-Erk2) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (Erk 1 e Erk2). Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di espressione della beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*\*,  $p < 0.01$ ; ##,  $p < 0.01$ .

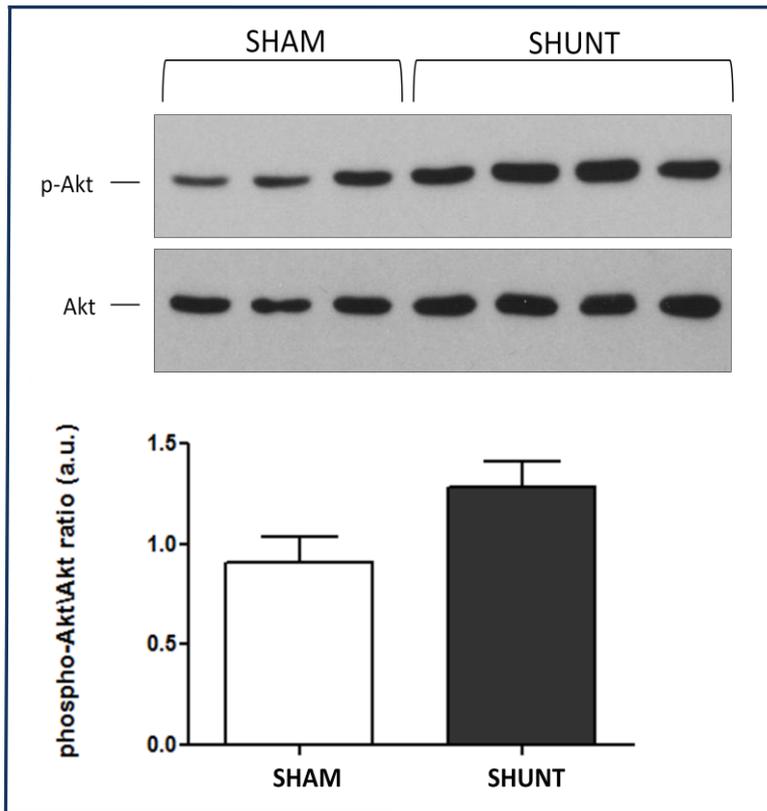


Figura 58. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di fosforilazione di Akt è stata evidenziata nei polmoni dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica; risulta comunque visibile una lieve, anche se non significativa, tendenza all'aumento nel gruppo SHUNT. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I livelli di fosforilazione di Akt sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alla proteina fosforilata (p-Akt) e le intensità delle bande proteiche

totali corrispondenti (Akt). Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

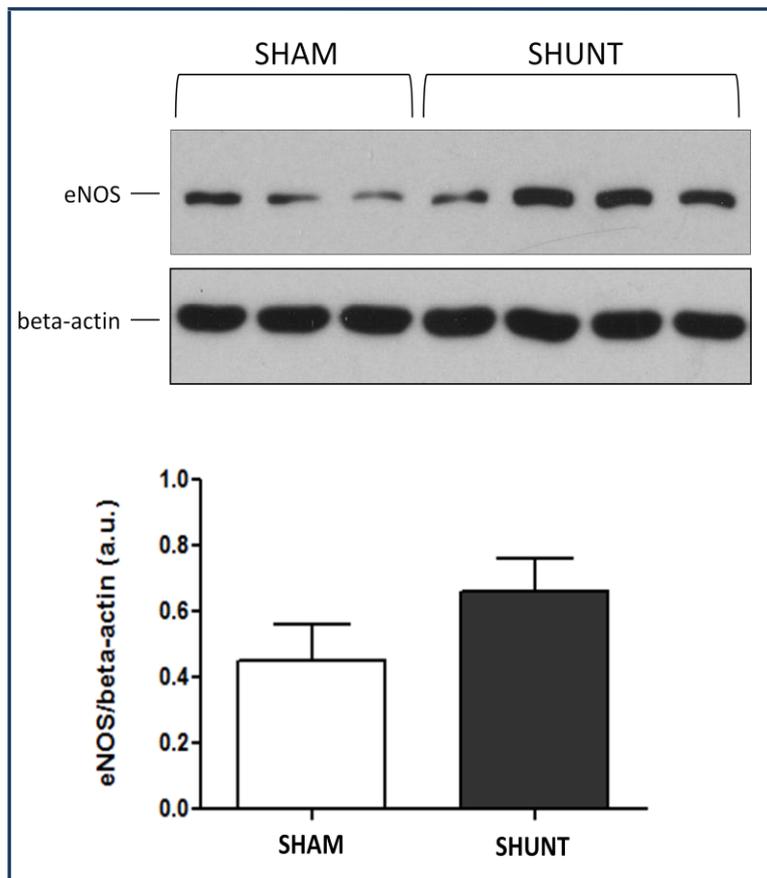


Figura 59. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di espressione/attivazione di eNOS è stata evidenziata nel tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. Risulta comunque visibile una lieve, anche se non significativa, tendenza all'aumento nel gruppo SHUNT. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione/attivazione di eNOS sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di espressione della proteina *housekeeping* beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come

medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

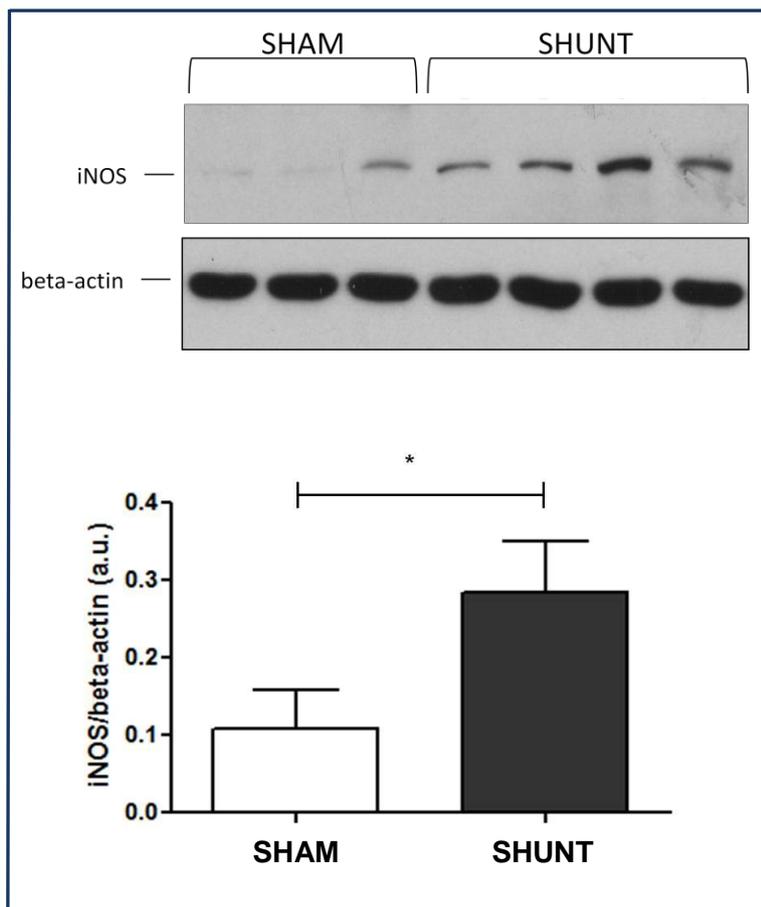
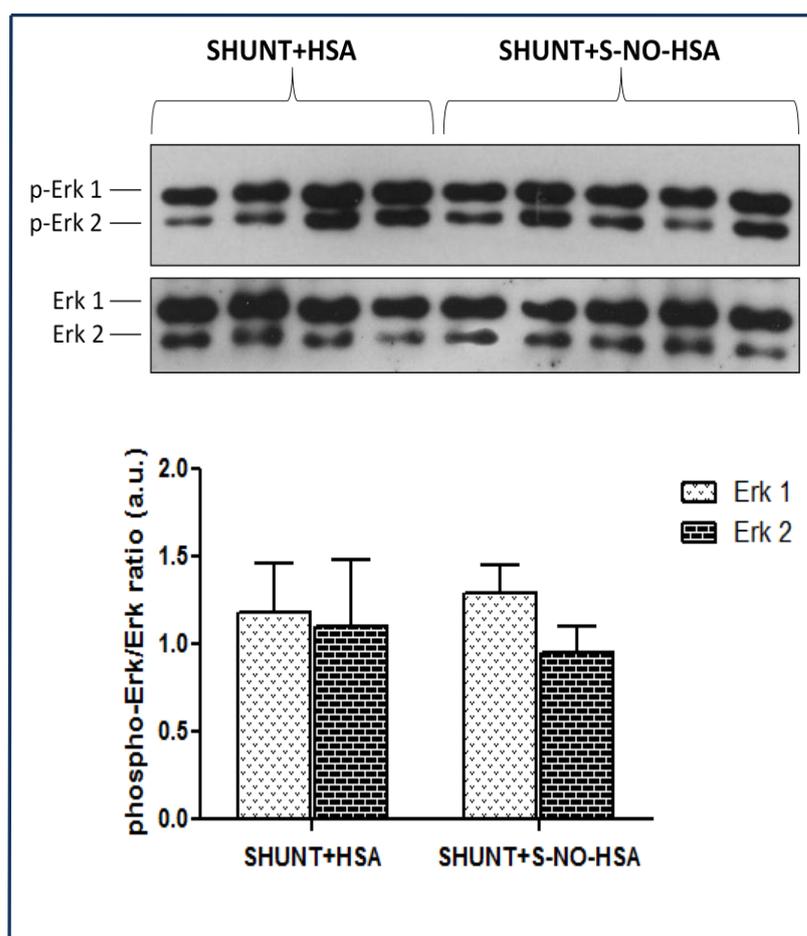


Figura 60. Analisi Western blot: significativo incremento dei livelli di espressione di iNOS nei polmoni dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* (SHAM) dopo 20 settimane dall'operazione chirurgica. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti per il gruppo SHAM e 4 per il gruppo SHUNT. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione di iNOS sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di espressione della proteina *housekeeping* beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*,  $p < 0.05$ .

#### 4.5 Analisi Western blot nel tessuto polmonare: SHUNT+HSA vs SHUNT+S-NO-HSA (seconda fase).

Nella seconda fase dello studio, l'analisi Western blot su tessuto polmonare di ratti esposti a *shunt* aorto-cavale per 20 settimane non ha evidenziato variazioni statisticamente significative dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 e Akt tra i gruppi di studio considerati (SHUNT+HSA e SHUNT+S-NO-HSA; fig. 61 e 62 rispettivamente). Anche l'espressione/attivazione polmonare di eNOS non risulta significativamente variata in seguito alla somministrazione di albumina sierica umana S-nitrosilata (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) rispetto al gruppo di controllo (gruppo SHUNT+HSA) (Fig. 63). I ratti trattati con albumina sierica umana S-nitrosilata, dopo 20 settimane dalla creazione della fistola aorto-cavale (gruppo SHUNT+S-NO-HSA), hanno invece mostrato un significativo incremento ( $p < 0.05$ ) dei livelli di espressione di iNOS nel tessuto polmonare rispetto agli animali di controllo trattati con albumina sierica umana (gruppo SHUNT+HSA) (Fig. 64).



**Figura 61. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 è stata evidenziata nel tessuto polmonare dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. Pannello superiore: blots rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti per il gruppo SHUNT+HSA e 5 per il gruppo SHUNT+S-NO-HSA. Pannello inferiore: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti ( $n=10$ /gruppo). I livelli di fosforilazione di ERK1/2 sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alle proteine fosforilate (p-Erk1 e p-Erk2) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (Erk 1 e Erk2).**

Tutti i dati sono stati normalizzati ai relativi valori di espressione della beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

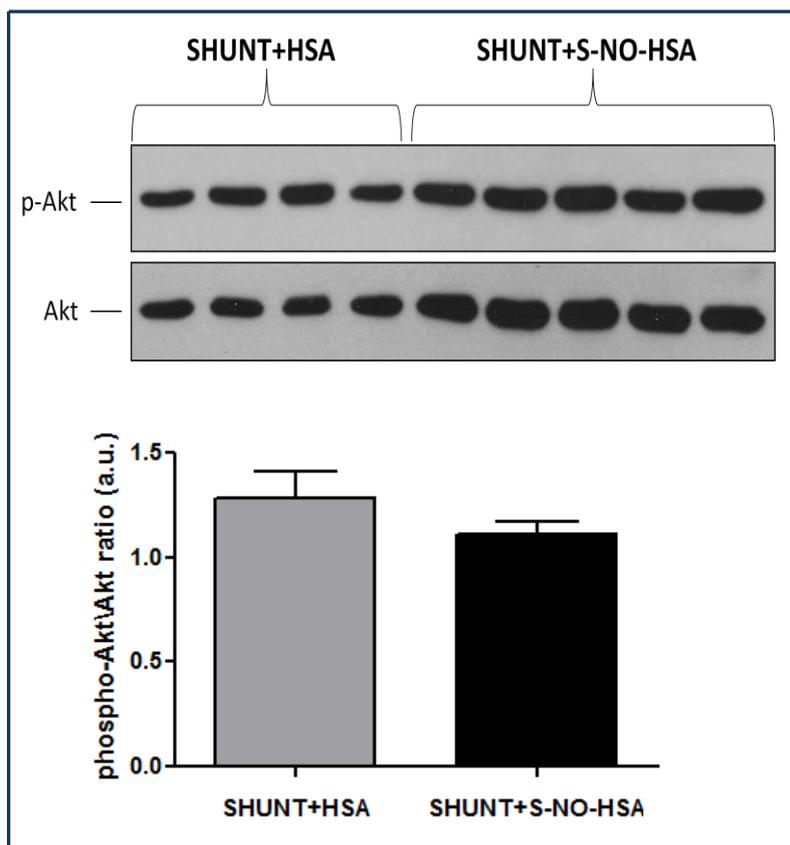


Figura 62. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di fosforilazione di Akt è stata evidenziata nei polmoni dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti per il gruppo SHUNT+HSA e 5 per il gruppo SHUNT+S-NO-HSA. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I livelli di fosforilazione di Akt sono stati stimati come rapporti densitometrici tra le intensità delle bande relative alla proteina fosforilata (p-Akt) e le intensità delle bande proteiche totali corrispondenti (Akt). Tutti i dati sono stati

normalizzati ai relativi valori di espressione della beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

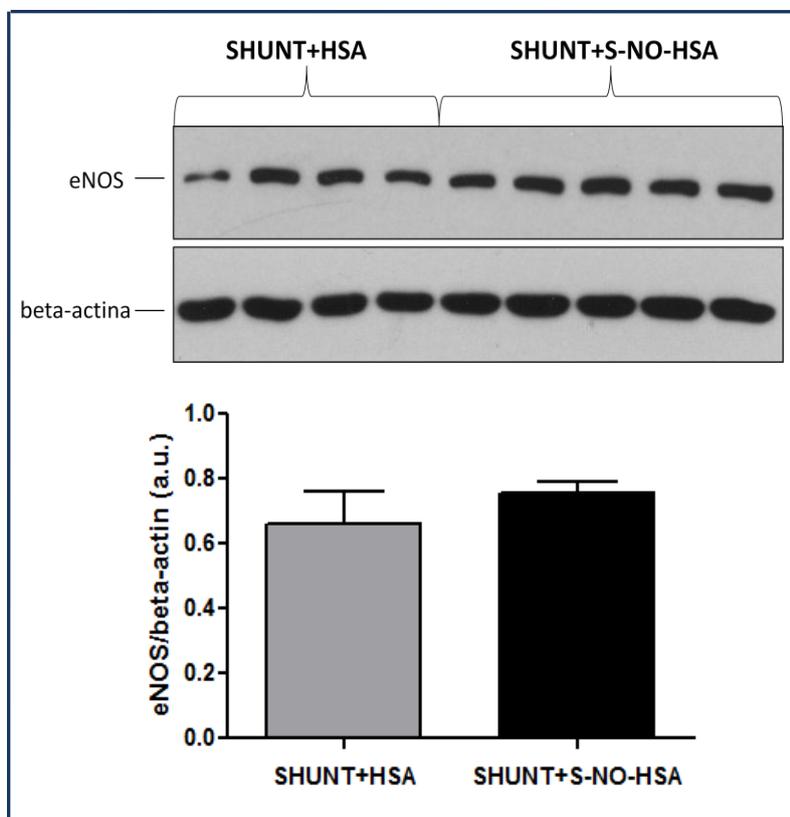
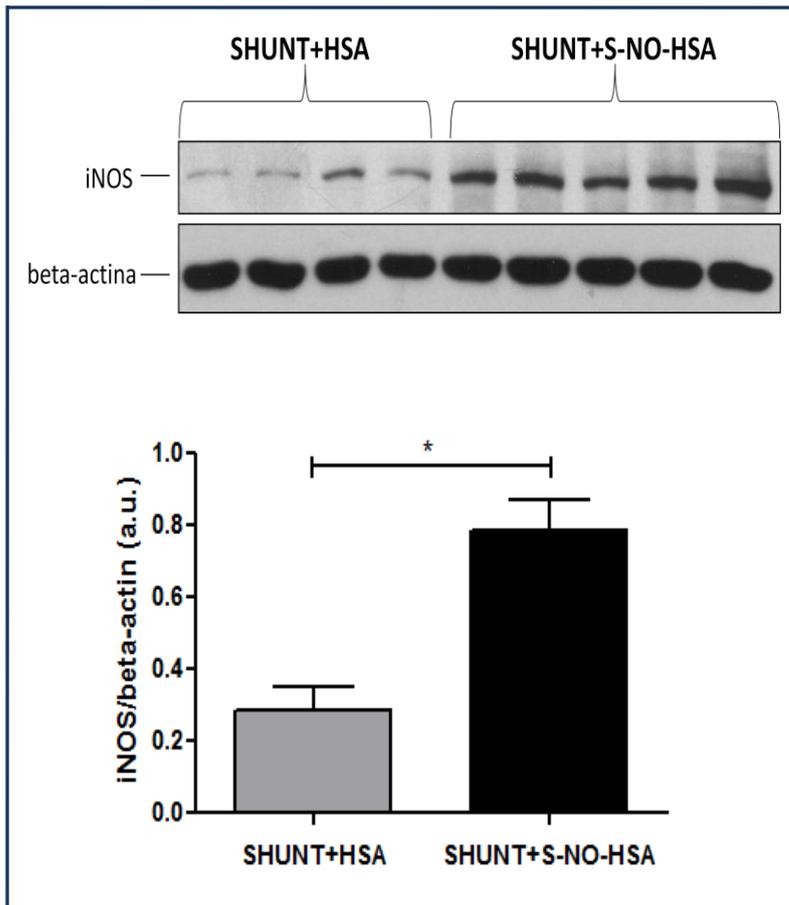


Figura 63. Analisi Western blot: nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di espressione/attivazione di eNOS è stata evidenziata nel tessuto polmonare dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. *Pannello superiore*: blots rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti per il gruppo SHUNT+HSA e 5 per il gruppo SHUNT+S-NO-HSA. *Pannello inferiore*: grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione/attivazione di eNOS sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di

espressione della proteina *housekeeping* beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).



**Figura 64.** Analisi Western blot: significativo incremento dei livelli di espressione di iNOS nei polmoni dei ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. *Pannello superiore:* blots rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti per il gruppo SHUNT+HSA e 5 per il gruppo SHUNT+S-NO-HSA. *Pannello inferiore:* grafico a barre rappresentativo di tutti gli esperimenti (n=10/gruppo). I valori densitometrici relativi ai livelli di espressione di iNOS sono stati normalizzati ai corrispondenti valori di espressione della proteina *housekeeping* beta-actina, espressi in unità arbitrarie (a.u.) e rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).  $p < 0.05$ .

#### 4.6 Analisi dello stato del glutazione nel ventricolo destro.

Per la determinazione del rapporto glutazione ossidato (GSSG) / glutazione ridotto (GSH), il GSSG è stato calcolato in relazione al numero di equivalenti di GSH misurati in ogni campione di ventricolo destro e tessuto polmonare considerati nello studio; tale rapporto è stato quindi rappresentato come valore percentuale di GSSG espresso in relazione al GSH.

Nella prima fase dello studio è stato osservato un significativo incremento ( $p < 0.05$ ) del rapporto GSSG/GSH (%GSSG) nel ventricolo destro degli animali del gruppo SHUNT rispetto al gruppo di controllo SHAM (5.26 vs 1.54 rispettivamente), 20 settimane dopo l'esecuzione della fistola aorto-cavale (Fig. 65).

Nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli percentuali di GSSG è stata invece rilevata nel miocardio ventricolare destro dopo trattamento con albumina nitrosilata (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) rispetto agli animali non trattati (gruppo SHUNT+HSA) (Fig. 66).

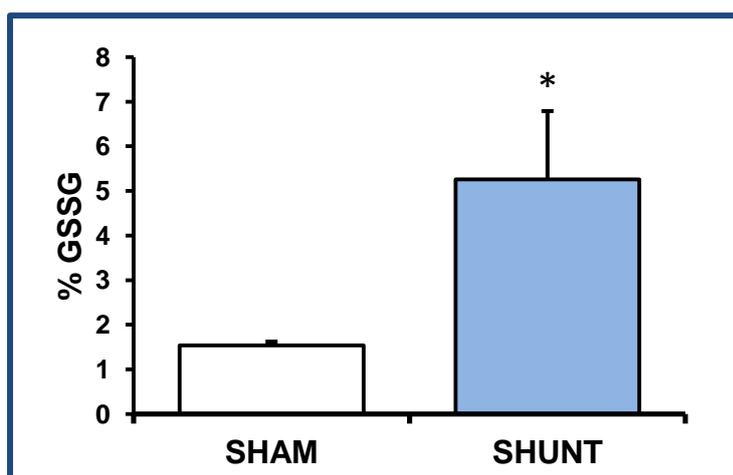


Figura 65. Significativo incremento dei livelli di glutazione ossidato (%GSSG) nel ventricolo destro dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti di controllo (SHAM) a 20 settimane dall'operazione. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo (n=10/gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*,  $p < 0.05$ .

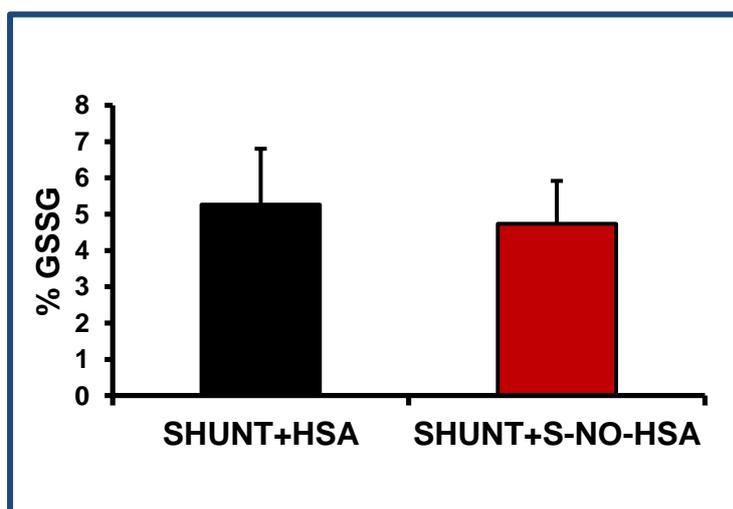


Figura 66. Assenza di variazioni statisticamente significative dei livelli di glutazione ossidato (%GSSG) nel ventricolo destro degli animali trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo (n=10/gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

#### 4.7 Analisi dello stato del glutatione nel tessuto polmonare.

Nella prima fase dello studio, l'analisi HPLC degli estratti polmonari dei ratti *sham-operated* (gruppo SHAM) e dei ratti con *shunt* aorto-cavale (gruppo SHUNT), eseguita a distanza di 20 settimane dall'operazione, ha rivelato un incremento statisticamente significativo ( $p < 0.01$ ) del rapporto GSSG/GSH (espresso come %GSSG) negli animali del gruppo SHUNT rispetto al gruppo di controllo (16.3 vs 8.3 rispettivamente) (Fig. 67). I campioni di tessuto polmonare degli animali del gruppo SHUNT+S-NO-HSA hanno mostrato una significativa riduzione ( $p < 0.01$ ) dei livelli di GSSG rispetto agli animali di controllo (gruppo SHUNT+HSA) (9.34 vs 16.3 rispettivamente) (Fig. 68).

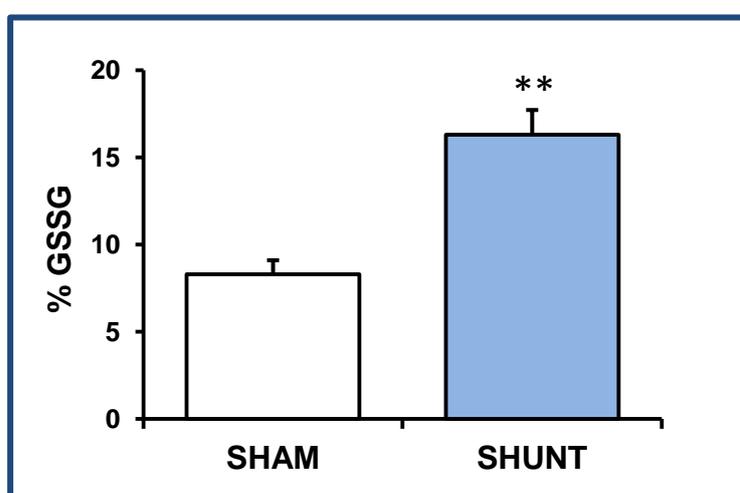


Figura 67. Significativo incremento dei livelli di glutatione ossidato (%GSSG) nel tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti di controllo (SHAM) a 20 settimane dall'operazione. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo ( $n=10$ /gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*\*,  $p < 0.01$ .

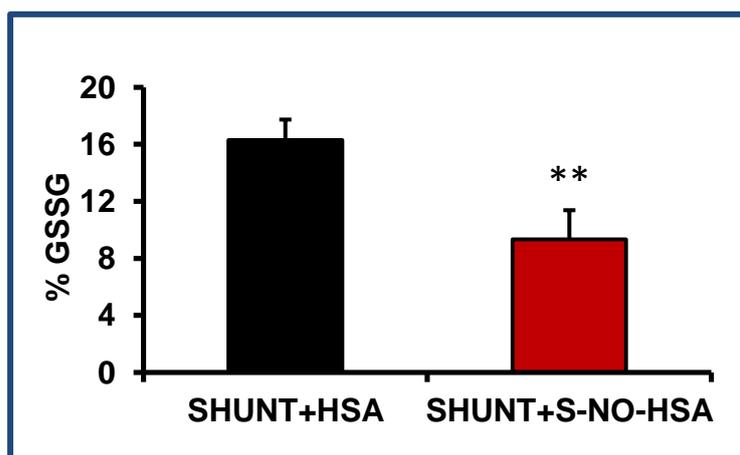


Figura 68. Significativa diminuzione dei livelli di glutatione ossidato (%GSSG) nel tessuto polmonare degli animali del gruppo SHUNT+S-NO-HSA rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo ( $n=10$ /gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*\*,  $p < 0.01$ .

#### 4.8 Determinazione dello stato energetico tissutale: fosfati ad alta energia nel ventricolo destro.

Nella prima fase dello studio, l'analisi HPLC per la determinazione del contenuto intracellulare dei fosfati ad alta energia ha mostrato una significativa diminuzione ( $p < 0.05$ ) dei livelli di ATP nel miocardio ventricolare destro dei ratti con *shunt* aortocavale persistente per 20 settimane (gruppo SHUNT) rispetto al controllo (gruppo SHAM); la stessa variazione, anche se ai limiti della significatività statistica, è stata rilevata per PCr, mentre nessuna variazione si è dimostrata per AMP e ADP (Fig. 69).

Nella seconda fase dello studio, il trattamento in acuto con albumina S-nitrosilata nel gruppo SHUNT+S-NO-HSA ha mostrato una generale tendenza alla preservazione della funzione mitocondriale dei cardiomiociti ventricolari rispetto ai ratti non trattati (gruppo SHUNT+HSA), anche se non sono state evidenziate differenze statisticamente significative dei livelli di PCr, AMP, ADP e ATP tra i 2 gruppi (Fig. 70).

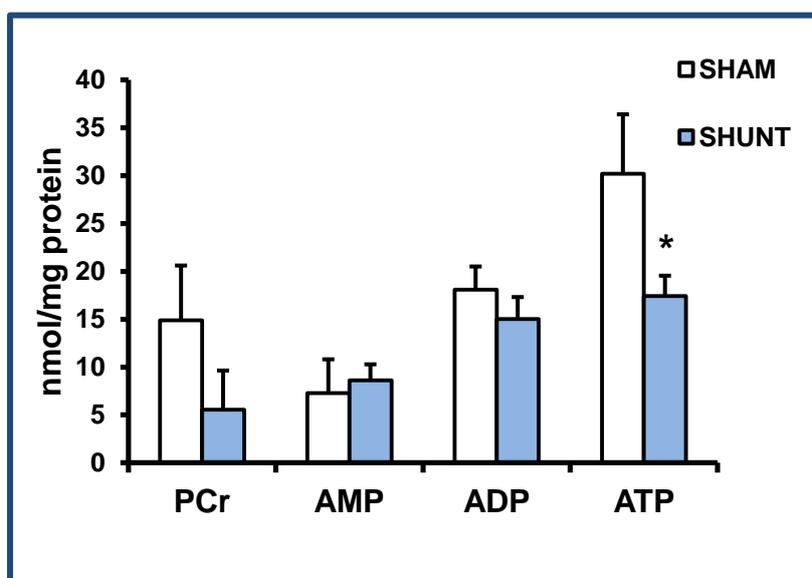


Figura 69. Fosfati ad alta energia nel ventricolo destro di ratti con *shunt* aortocavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* di controllo (SHAM) a distanza di 20 settimane dall'operazione. Significativa diminuzione dei livelli di ATP nel gruppo SHUNT rispetto al gruppo SHAM. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo ( $n=10$ /gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*,  $p < 0.05$ .

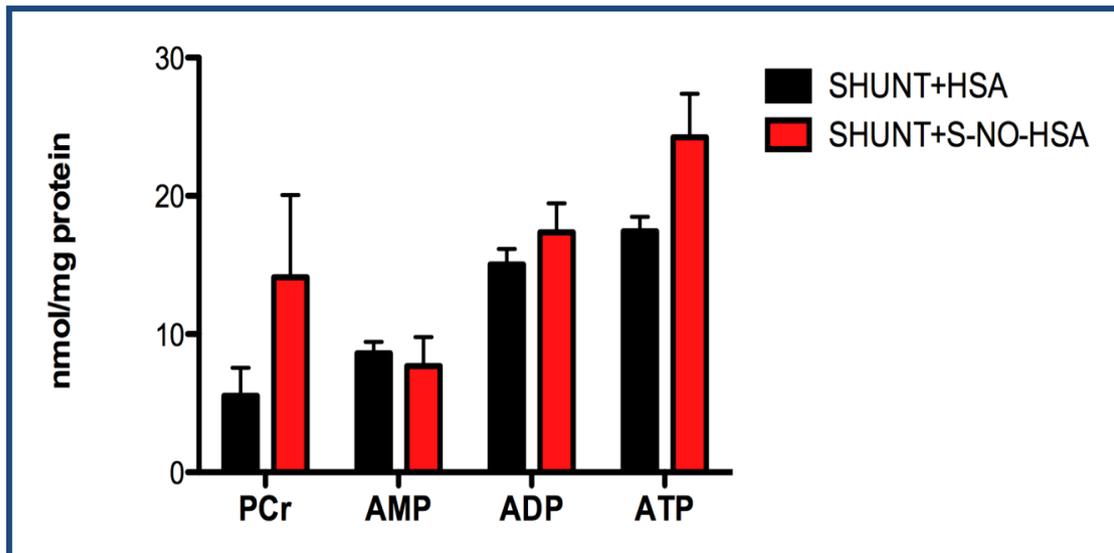
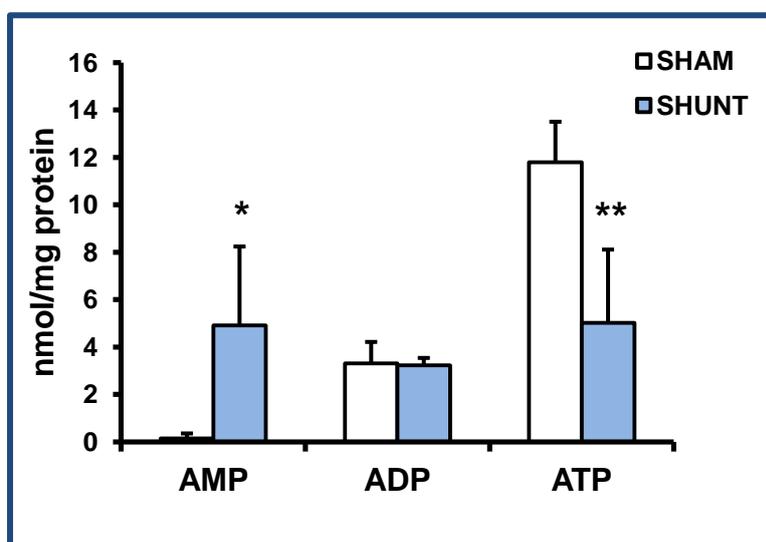


Figura 70. Fosfati ad alta energia nel ventricolo destro di ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo trattati con HSA (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. Tendenza alla preservazione dei livelli di PCr e ATP nel gruppo SHUNT+S-NO-HSA rispetto al gruppo SHUNT+HSA ma senza variazioni statisticamente significative. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo (n=10/gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).

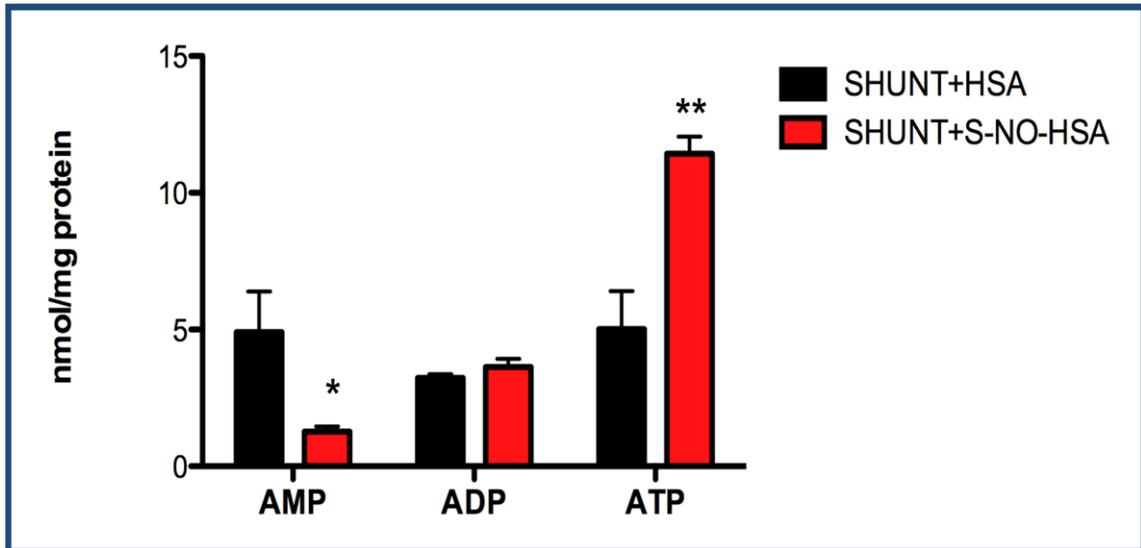
#### **4.9 Determinazione dello stato energetico tissutale: fosfati ad alta energia nel tessuto polmonare.**

I dati ottenuti dall'analisi HPLC per la determinazione del contenuto intracellulare dei fosfati ad alta energia hanno evidenziato una significativa compromissione della funzione mitocondriale nel tessuto polmonare degli animali con *shunt* aorto-cavale persistente per un periodo di 20 settimane (gruppo SHUNT) rispetto agli animali *sham-operated* di controllo (gruppo SHAM). I livelli di AMP sono infatti risultati significativamente più alti ( $p<0.05$ ) nei polmoni dei ratti SHUNT rispetto al gruppo di controllo, mentre il contenuto di ATP è stato significativamente ridotto dalla presenza della fistola aorto-cavale ( $p<0.01$ ) (Fig. 71).

Come mostrato dall'analisi HPLC eseguita su campioni di tessuto polmonare, la somministrazione acuta di albumina sierica umana S-nitrosilata nei ratti esposti allo *shunt* aorto-cavale per 20 settimane (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) sembra garantire una significativa preservazione dello stato energetico cellulare rispetto ai ratti di controllo non trattati (gruppo SHUNT+HSA) (Fig. 72): in seguito al trattamento con albumina sierica umana S-nitrosilata, i livelli di AMP e ATP risultano infatti significativamente migliorati rispetto al gruppo di controllo ( $p<0.05$  e  $p<0.01$  rispettivamente), con valori approssimativamente simili a quelli misurati nel gruppo SHAM (Fig. 71).



**Figura 71.** Fosfati ad alta energia nel tessuto polmonare di ratti con *shunt* aorto-cavale (SHUNT) rispetto ai ratti *sham-operated* di controllo (SHAM) a distanza di 20 settimane dall'operazione. Variazioni significative dei livelli tissutali di AMP e ATP nel gruppo SHUNT rispetto al gruppo SHAM. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo ( $n=10$ /gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media). \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ .



**Figura 72.** Fosfati ad alta energia nel tessuto polmonare di ratti trattati con S-NO-HSA (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo trattati con HSA (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. Variazioni significative dei livelli tissutali di AMP e ATP nel gruppo SHUNT+S-NO-HSA rispetto al gruppo SHUNT+HSA. Grafico a barre rappresentativo di 10 esperimenti indipendenti per gruppo (n=10/gruppo). I dati ottenuti sono rappresentati come medie  $\pm$  SEM (errore standard della media).  
 \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## **5. DISCUSSIONE**

L'importanza del ruolo giocato dal ventricolo destro nel corretto funzionamento cardiaco venne per la prima volta riconosciuta da Harvey nel 1616; nel 1943, tuttavia, Starr e collaboratori osservarono come, nei loro esperimenti sui cani, la "pressione venosa" non aumentava in seguito ad elettroablazione della parete libera del ventricolo destro che descrissero quindi come un "semplice condotto passivo".

Attualmente la disfunzione ventricolare destra è ormai riconosciuta come un fattore predittivo indipendente dell'*outcome* dei pazienti con disfunzione ventricolare sinistra, embolia polmonare nonché dei pazienti trapiantati o affetti da ipertensione polmonare.

Negli ultimi anni, quindi, numerosi ricercatori hanno iniziato ad allestire vari modelli sperimentali che consentissero lo studio del ventricolo destro in differenti contesti patologici, al fine di meglio definire e caratterizzare le alterazioni morfologico-strutturali del ventricolo destro e i meccanismi bio-molecolari coinvolti in tali contesti.

Dato l'importante coinvolgimento del ventricolo destro nell'ipertensione polmonare, in quanto sottoposto ad un notevole sovraccarico di pressione, la maggior parte degli studi sperimentali condotti fino ad oggi ha previsto l'impiego di modelli animali con sovraccarico di pressione del ventricolo destro secondario all'iniziale induzione di ipertensione polmonare; tra questi, il modello di bendaggio dell'arteria polmonare e i modelli di ipertensione polmonare indotta da sostanze tossiche, quali la monocrotalina, risultano tra i più comunemente utilizzati. Diversi studi sperimentali sono stati invece eseguiti con lo scopo di caratterizzare il comportamento del ventricolo destro in risposta ad un sovraccarico acuto o cronico di pressione, mentre relativamente poco è noto circa le risposte ventricolari destre al sovraccarico cronico di volume, una condizione tipica di diversi contesti clinico-patologici rientranti nella quotidiana pratica clinica del cardiocirurgo, come l'insufficienza polmonare che segue al trattamento chirurgico della tetralogia di Fallot, l'insufficienza tricuspidalica e le cardiopatie congenite con *shunt* sinistro-destro pre-tricuspidalico. La maggior parte di tali studi sono stati fino ad ora eseguiti su animali di grossa taglia e con risultati contrastanti sotto alcuni punti di vista.

Nel 1990 Garcia descrisse un metodo relativamente semplice per la creazione di uno *shunt* aorto-cavale nei ratti; fino ad allora modelli sperimentali simili venivano realizzati per lo più su animali di grandi dimensioni con l'utilizzo di complicate tecniche microchirurgiche e la mortalità era particolarmente elevata.

Il modello di Garcia è stato inizialmente descritto come modello di scompenso cardiaco subacuto in quanto presupponeva la creazione di uno *shunt* aorto-cavale relativamente grosso in ratti di poco più di 200 gr di peso, con conseguente sovraccarico massivo di volume del ventricolo destro ed insufficienza cardiaca nell'arco di 4 settimane. Successivamente, alcuni ricercatori hanno preso in considerazione tale modello come un modello di iperafflusso polmonare con possibile ipertensione polmonare secondaria, mimando la fisiopatologia degli *shunt* sinistro-destro pre-tricuspidalici; le conclusioni tratte da tali ricercatori risultavano tuttavia contrastanti circa l'efficacia del modello come modello effettivo di ipertensione polmonare, una condizione clinica che continua a

rimanere devastante, con sintomi progressivamente debilitanti ed alta mortalità nella popolazione affetta (37).

### **5.1 Prima fase: valutazione istologica, biochimica e molecolare del modello sperimentale di ipertensione polmonare da sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro.**

Data l'assenza di valutazioni adeguate del modello di Garcia come un modello di sovraccarico di volume del ventricolo destro e, conseguentemente, come possibile modello di ipertensione polmonare secondaria, l'obiettivo principale della prima fase di questo studio è stato valutare tale modello da un punto di vista istologico, biochimico e molecolare, tenendo conto di una validazione funzionale di tipo non invasivo (analisi ecocardiografica ed emogas) e invasivo (monitoraggio dei parametri emodinamici) condotta in una fase preliminare. Tale modello riproduce essenzialmente la condizione di **ipertensione arteriosa polmonare associata a cardiopatie congenite** (sottogruppo 1.4.4), una condizione clinica particolarmente rilevante in ambito cardiocirurgico dal momento che una significativa proporzione degli individui con un difetto cardiaco congenito sembra sviluppare un quadro di ipertensione arteriosa polmonare (8).

Rispetto al modello proposto inizialmente da Garcia, la procedura chirurgica adottata per la creazione di questo modello ha previsto l'introduzione di alcune importanti modifiche al fine di prevenire una disfunzione ventricolare destra precoce: mentre nel modello originale venivano utilizzati ratti di peso attorno ai 200 gr e la fistola aorto-cavale veniva creata con un angiocatetere di 16 gauge, per questo studio sono stati impiegati animali di peso maggiore (350 gr in media) e un angiocatetere di dimensioni minori (20 gauge). Queste modificazioni hanno dunque consentito la creazione di uno *shunt* sinistro-destro più piccolo, di minore entità, che ha consentito comunque al ventricolo destro ed al circolo polmonare di essere esposti ad un sovraccarico di volume per lunghi periodi senza uno sviluppo precoce di disfunzione ventricolare destra.

Oltre alla valutazione istologica, nella prima fase dello studio (fase di valutazione, osservazionale e descrittiva), le **indagini biochimiche e molecolari** si sono rivelate particolarmente utili per la valutazione dell'efficacia del modello sperimentale, principalmente attraverso l'analisi di alcune vie di segnale note per essere implicate nello sviluppo di ipertensione polmonare e di rimodellamento ventricolare destro. A ciò è stata aggiunta la valutazione del contenuto cellulare dei fosfati ad alta energia e i livelli intracellulari di glutazione ossidato, rispettivamente indici di funzionalità mitocondriale (stato energetico cellulare) e stress ossidativo.

#### ***Valutazione istologica.***

La valutazione istologica del tessuto polmonare ha mostrato lo sviluppo di lesioni caratteristiche delle fasi precoce e tardiva dell'ipertensione polmonare nei ratti *shuntati* a 20 settimane. Per quanto riguarda la fase tardiva, sono stati per lo più evidenziati segni di

occlusione progressiva e fibrosa delle piccole arterie polmonari le quali sono tuttavia risultate prive di lesioni plessiformi, espressione della fase più grave e irreversibile della patologia. Un'ulteriore esposizione del circolo polmonare all'iperafflusso ematico potrebbe essere richiesta per indurre la comparsa di tutte le alterazioni istologiche caratteristiche della fase tardiva e irreversibile dell'ipertensione polmonare.

### ***Effetti dello shunt aorto-cavale sulla fosforilazione di ERK1/2.***

I dati ottenuti dall'analisi Western blot hanno mostrato un significativo incremento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel ventricolo destro e nel tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale.

In condizioni fisiologiche, le protein chinasi ERK1/2 partecipano alla regolazione di una larga varietà di processi cellulari, quali: **adesione, progressione del ciclo cellulare, migrazione, sopravvivenza cellulare, differenziamento, metabolismo, proliferazione e trascrizione genica** (52).

Alterazioni del *pathway* di queste MAP-chinasi sono state riscontrate in una moltitudine di condizioni patologiche; in particolare sembra che un'eccessiva *up*-regolazione della cascata di *signaling* Ras-Raf-MEK-ERK correli con lo sviluppo di ipertrofia (adattativa e "maladattativa") di cellule muscolari lisce vascolari e cardiomiociti osservata in condizioni di *stretch* cellulare da sovraccarico emodinamico (47, 48, 49, 50). È ormai ampiamente dimostrato come il *pathway* di *signaling* delle MAP-chinasi ERK1/2 (Fig. 11) venga attivato in un'ampia varietà di tipi cellulari per lo più in risposta a stimoli mitogeni ma anche da citochine e stress di varia natura; il meccanismo di attivazione di ERK1/2 in risposta a fattori di crescita è stato ben caratterizzato e studi sempre più numerosi riportano l'attivazione diretta di queste chinasi in seguito a *stretch* meccanico in cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vascolari e cardiomiociti (47).

Il *remodeling* delle arteriole polmonari, seguito dal *remodeling* della parete ventricolare destra in condizioni di sovraccarico emodinamico prolungato, rappresenta la principale caratteristica patologica associata all'ipertensione arteriosa polmonare; alcuni studi hanno recentemente correlato il *remodeling* dei vasi polmonari al *signaling* delle MAP-chinasi dimostrando come specifici agenti farmacologici normalmente utilizzati nel trattamento dell'ipertensione polmonare, come ad esempio l'inibitore della PDE5 Sildenafil, siano in grado di attenuare tale rimodellamento proprio attraverso l'utilizzo dei *pathways* di *signaling* delle MAPKs e, in particolare, attraverso la riduzione della fosforilazione di ERK1/2 (89). Murray e collaboratori hanno inoltre dimostrato l'esistenza di una netta corrispondenza tra l'aumentata espressione della PDEgamma e l'incremento dell'attivazione di ERK1/2 nelle arterie polmonari dei ratti considerati nello studio (90).

Relativamente ai livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel tessuto polmonare di ratti con ipertensione polmonare, i risultati ottenuti in questo studio si sono rivelati conformi a quanto già riportato in letteratura: nel nostro modello sperimentale, il significativo aumento della fosforilazione di queste chinasi nei polmoni degli animali con *shunt* aorto-cavale persistente risulta decisamente in linea con l'ipotesi più volte proposta di un potenziale coinvolgimento del *signaling-pathway* di ERK nel *remodeling* vascolare polmonare. L'elevato *shear stress* delle pareti arteriolari polmonari risultante dal sovraccarico emodinamico prolungato sembra indurre attivazione e infiammazione

endoteliale con rilascio di fattori di crescita e conseguente incremento dei *targets* a valle delle MAPKs. In questo contesto, dunque, l'incremento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 potrebbe essere il risultato dell'attivazione e infiammazione dell'endotelio vascolare polmonare in condizioni di stress biomeccanico persistente; con un meccanismo di amplificazione a *feedback* positivo, il progressivo aumento dello *shear stress* dei vasi polmonari, inizialmente generato dal sovraccarico di volume, quindi dall'aumento delle pressioni arteriolari, continuerebbe ad attivare le chinasi aggravando ulteriormente l'entità del *remodeling* vascolare. In questa condizione infatti l'attivazione di ERK1/2 indurrebbe una **marcata proliferazione** delle cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari determinando un progressivo restringimento del *lumen* delle arterie polmonari di resistenza con conseguente incremento delle resistenze vascolari polmonari e del carico emodinamico. Il caratteristico ispessimento di tutti e tre gli strati della parete vasale, osservato in condizioni di *remodeling* vascolare polmonare, sembra infatti essere principalmente dovuto alla **crescita cellulare ipertrofica e/o iperplastica** del tipo cellulare predominante all'interno di ogni *layer* (fibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule endoteliali) (46).

Numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento delle MAPKs nello sviluppo di ipertrofia cardiaca in risposta ad un'ampia varietà di stimoli extracellulari; in particolare, il ruolo di ERK1/2 nel processo ipertrofico è stato valutato in diversi modelli sperimentali, anche se la maggior parte dei dati disponibili rappresenta la risultante di vari esperimenti *in vitro* eseguiti su diversi tipi di colture cellulari. È necessario inoltre considerare che, qualora sottoposto a fattori di stress di varia natura, come accade nella maggior parte delle patologie cardiache umane e nei modelli sperimentali di scompenso cardiaco, il miocardio risulta generalmente interessato da processi fibrotici più o meno estesi che possono alterare l'effettiva relazione tra ipertrofia cardiaca e i vari indici biochimici considerati (91). In questo senso, la creazione di una fistola aorto-cavale nei ratti costituisce un buon modello di ipertrofia ventricolare e scompenso cardiaco da sovraccarico di volume cronico, senza generazione di fibrosi, in grado quindi di fornire preziose informazioni riguardanti le alterazioni delle MAP-chinasi nel cuore.

Considerato l'esiguo numero di dati disponibili circa lo status delle MAPKs nel ventricolo destro di ratti sottoposti a *shunt* aorto-cavale persistente, con il presente studio è stato possibile valutare il potenziale coinvolgimento del *signaling* intracellulare di ERK1/2 nell'ipertrofia e scompenso cardiaco da sovraccarico di volume cronico del ventricolo destro e ipertensione polmonare persistente.

È stato dimostrato come i ratti con fistola aorto-cavale persistente per 4 settimane presentino un quadro reversibile di ipertrofia cardiaca che, a distanza di 16 settimane, si traduce in una condizione irreversibile di scompenso cardiaco con incapacità di mantenimento delle funzioni sistolica e diastolica e compromissione della *performance* cardiaca, congestione circolatoria, edema, effusione pleurica e ascite (91).

In linea con quanto riportato in altri lavori sperimentali, i risultati descritti in questo studio hanno mostrato un significativo aumento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nel ventricolo destro degli animali a 20 settimane dallo *shunt*; un simile incremento dell'attività di ERK1/2 è stato mostrato essere coinvolto nello sviluppo di ipertrofia cardiaca in altri modelli sperimentali (92).

Dal momento che alcuni studiosi sostengono un possibile coinvolgimento di ERK1/2 anche nello sviluppo di apoptosi (93), meccanismi di trasduzione del segnale mediati da queste chinasi potrebbero dunque contribuire allo sviluppo di scompenso cardiaco dovuto al sovraccarico di volume; in questo contesto, infatti, è stata dimostrata l'occorrenza di apoptosi dei cardiomiociti nei cuori scompensati a distanza di 16 settimane dallo *shunt* aorto-cavale (63).

***Effetti dello shunt aorto-cavale sulla fosforilazione di Akt, espressione/attivazione di eNOS e stress ossidativo.***

L'analisi Western blot ha mostrato una significativa riduzione dei livelli di fosforilazione di Akt nel ventricolo destro dei ratti con *shunt* aorto-cavale, mentre nessuna variazione statisticamente significativa è stata evidenziata nel tessuto polmonare. I livelli di espressione/attivazione di eNOS non sono invece risultati significativamente alterati rispetto al controllo in nessuno dei due tessuti considerati, mentre la persistenza dello *shunt* ha contribuito all'incremento significativo del contenuto di glutatione ossidato rispetto agli animali di controllo.

Akt è attualmente una delle chinasi più ampiamente caratterizzate e i suoi numerosissimi substrati sono coinvolti in molteplici funzioni cellulari differenti come **crescita**, **sopravvivenza**, **proliferazione**, **metabolismo**, **uptake di glucosio**, **espressione genica** e **comunicazione cellula-cellula** mediante induzione della produzione di fattori paracrini e autocrini (60). In condizioni fisiologiche questa chinasi può essere attivata in risposta ad un'ampia varietà di stimoli *upstream* che comprendono per lo più ormoni, fattori di crescita, citochine, farmaci/piccole molecole e nutrienti.

Dati controversi si riscontrano in letteratura circa gli effetti dello stress biomeccanico sullo stato di fosforilazione/attivazione di Akt: alcuni studi dimostrano infatti come il sovraccarico di volume e pressione indotto, ad esempio, dalla creazione di uno *shunt* aorto-cavale, possa determinare un significativo incremento dei livelli di fosforilazione di Akt nei cardiomiociti e nelle cellule delle pareti vascolari, principalmente mediante stimolazione delle integrine cellulari ("sensori meccanici") (60). Da altri lavori sperimentali emerge invece come lo scompenso cardiaco, risultante dal sovraccarico cronico di volume, sia caratterizzato da un iniziale, precoce aumento dell'attività di Akt nei cardiomiociti (ipertrofia adattativa) (62) cui farebbe seguito una significativa diminuzione della fosforilazione di questa chinasi che potrebbe dunque contribuire all'insorgenza di scompenso, osservato nell'ipertensione arteriosa polmonare avanzata (63); in questo contesto, la riduzione dell'attività di Akt sembrerebbe dunque associata all'insufficienza cardiaca.

Numerosi ricercatori hanno dimostrato l'occorrenza di apoptosi dei cardiomiociti in condizioni di scompenso cardiaco, a prescindere dalla causa determinante (es: infarto miocardico, sovraccarico di pressione,...); in queste condizioni sembra che i mitocondri diano inizio alla cascata apoptotica attraverso il rilascio di varie proteine pro-apoptotiche tra cui il citocromo c (94), con conseguente attivazione delle caspasi 3, 8 e 9 e morte cellulare apoptotica. Questa via intrinseca per l'apoptosi sembra essere uno dei principali meccanismi responsabili della morte cellulare cardiaca conseguente a differenti *triggers* fisiopatologici (63). In questo contesto, la serina/treonina protein-chinasi **Akt** è

attualmente considerata **una delle principali chinasi pro-sopravvivenza**, in quanto mediatore dell'attivazione di proteine anti-apoptotiche (es: Bcl-2) e dell'inibizione di *target* pro-apoptotici; è stato recentemente suggerito come il ruolo di Akt nella sopravvivenza cellulare possa essere mediato attraverso l'attivazione di un *pathway* anti-apoptotico che direttamente antagonizza l'apoptosi diretta dai mitocondri (via intrinseca) (63).

Sebbene molti studi abbiano dimostrato lo sviluppo di scompenso cardiaco in seguito al sovraccarico di volume nei ratti con *shunt* arterio-venoso a distanza di 12-16 settimane dall'operazione (95, 96, 97), molto poco è noto circa la presenza di apoptosi in questo tipo di cuori scompensati. In uno studio eseguito sui maiali, è stato evidenziato come l'ipertrofia cardiaca indotta dal sovraccarico di volume per 24-96 ore risulti associata ad un certo grado di apoptosi conseguente allo stress ossidativo; tuttavia, in questo modello sperimentale non è stato esaminato lo status apoptotico dei cardiomiociti durante lo scompenso cardiaco. In aggiunta, in un altro lavoro sperimentale il sovraccarico di volume generato su modello murino e mantenuto per 8 settimane, ha rivelato l'occorrenza di apoptosi endoteliale in seguito all'attivazione della metalloproteinasi di matrice 9.

Data la scarsità di informazioni disponibili circa lo sviluppo di apoptosi nello scompenso cardiaco da sovraccarico di volume, uno degli scopi del presente studio è stato ottenere una stima indiretta dell'indice apoptotico dei cardiomiociti nei cuori scompensati dei ratti con *shunt* aorto-cavale per 20 settimane, attraverso l'analisi dei livelli di attivazione della chinasi pro-sopravvivenza Akt.

Nel nostro modello sperimentale, la significativa diminuzione della fosforilazione di Akt nel ventricolo destro dei ratti *shuntati* rispetto al controllo si è rivelata in linea con quanto descritto da Dent e collaboratori in un modello simile di *shunt* aorto-cavale per 16 settimane, in cui il *signaling* pro-sopravvivenza Akt-Bcl-2 risultava significativamente *down-regolato* (63). In accordo con quanto precedentemente riportato è dunque possibile ipotizzare che una simile riduzione dei livelli di fosforilazione di Akt nel ventricolo destro scompensato possa essere indice di un certo grado di apoptosi dei cardiomiociti a seguito di una depressione delle vie anti-apoptotiche. L'attivazione costitutiva di Akt è stata infatti dimostrata essere sufficiente per bloccare la morte cellulare indotta da una varietà di stimoli apoptotici, mentre da altri recenti studi è emerso che Akt potrebbe inibire l'attivazione della glicogeno sintasi chinasi  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) e promuovere l'attivazione di Bcl-2 che si legherebbe a canali anionici voltaggio-dipendenti nella membrana mitocondriale esterna impedendo il rilascio del citocromo c. È stato inoltre mostrato che l'attivazione di GSK- $3\beta$  è significativamente più alta nel cuore sottoposto a sovraccarico di volume rispetto alla condizione *sham* (98). Tutti questi dati indicano chiaramente la possibile occorrenza di morte cellulare apoptotica mitocondrio-diretta dei cardiomiociti nel cuore scompensato in seguito alla *down-regolazione* del *signaling* pro-sopravvivenza Akt-dipendente. Da considerare comunque il fatto che, oltre alla depressione dei *pathways* di sopravvivenza cellulare, anche l'attivazione delle vie di morte potrebbe giocare un importante ruolo nello sviluppo di apoptosi nei cuori soggetti a sovraccarico cronico di volume (63).

Ulteriori studi con l'impiego di tecniche più specifiche come il TUNEL *assay*, saggi ELISA per proteine pro-apoptotiche e attivazione delle caspasi effettrici, o analisi

immunoistochimiche, dovrebbero essere eseguiti per dimostrare in modo diretto e specifico la presenza di morte cellulare apoptotica nel miocardio scompensato degli animali *shuntati* a 20 settimane.

Alcuni studi condotti sui vasi polmonari hanno dimostrato come alterazioni del flusso sanguigno con conseguenti alterazioni dello *shear stress*, siano in grado di indurre la fosforilazione di Akt nelle cellule endoteliali dell'intima attraverso l'attivazione di particolari integrine, indicando l'importanza di questo *signal transduction pathway* nello sviluppo di quelle profonde alterazioni morfologiche e funzionali dell'endotelio vascolare indotte dallo *shear stress* in condizioni di sovraccarico emodinamico e ipertensione polmonare (64, 65). Un ruolo del *signaling* di Akt è stato evidenziato anche nella regolazione della contrattilità, crescita e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (66); l'incremento dei livelli di fosforilazione di Akt nei vasi sanguigni potrebbe dunque contribuire all'iperplasia/ipertrofia mediale, *remodelling* vascolare e altre caratteristiche patologiche tipiche dell'ipertensione polmonare (66).

Nel presente studio non sono state tuttavia evidenziate variazioni significative dei livelli di fosforilazione di Akt nel tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale; tale evidenza potrebbe suggerire il coinvolgimento di molteplici meccanismi molecolari nel rimodellamento tissutale, distinti a seconda del tipo cellulare e del tipo di *trigger* alla base. Considerando quanto riportato in letteratura, si potrebbe ipotizzare un ruolo predominante di Akt nei cardiomiociti come chinasi pro-sopravvivenza nell'inibizione delle vie apoptotiche a fronte di una funzione principalmente legata al mantenimento dell'omeostasi endoteliale nei vasi polmonari. In linea con questa ipotesi appaiono dunque i risultati ottenuti nel nostro studio: la significativa diminuzione dei livelli di fosforilazione di Akt, osservata nel ventricolo destro degli animali *shuntati*, non è stata "corrisposta" dall'espressione della ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), per la quale non sono state rivelate variazioni significative, conformemente al ruolo principale svolto da Akt nei cardiomiociti come chinasi pro-sopravvivenza. Nel tessuto polmonare, invece, l'assenza di alterazioni significative nella fosforilazione di Akt, parallelamente alla mancata variazione dell'espressione di eNOS, potrebbero supportare l'ipotesi del coinvolgimento del *signaling* Akt-eNOS nel mantenimento dell'omeostasi endoteliale.

Il coinvolgimento del *pathway* di trasduzione del segnale Akt-eNOS nell'ipertensione polmonare è stato recentemente dimostrato da Yang e collaboratori (99) e la regolazione di tale *signaling* potrebbe essere quindi importante nel trattamento di tale patologia, come è emerso da un altro recente studio in cui gli effetti benefici della rosuvastatina nella prevenzione del rimodellamento vascolare polmonare, dello sviluppo di ipertensione polmonare e della disfunzione ventricolare destra nei ratti trattati con monocrotalina, sembrano essere mediati proprio dalla modulazione dell'asse Akt-eNOS (100). È attualmente noto come, nelle cellule endoteliali e in altre cellule, Akt sia in grado di catalizzare la fosforilazione di eNOS in Ser1177, con conseguente attivazione dell'enzima e rilascio di ossido nitrico seguito da vasodilatazione, *remodeling* vascolare e angiogenesi.

A differenza di quanto da noi evidenziato, Pei e collaboratori (100) hanno mostrato livelli drasticamente ridotti di fosforilazione ed espressione di Akt ed eNOS nei polmoni dei

ratti con ipertensione polmonare indotta da monocrotalina, mentre la somministrazione di rosuvastatina riportava la fosforilazione e l'espressione di questi due enzimi ai livelli basali del gruppo di controllo. Questa discrepanza nei dati potrebbe essere dovuta alle differenti condizioni sperimentali adottate nei due studi; la monocrotalina, in quanto sostanza chimica, potrebbe infatti interagire con altre molecole perturbando gli equilibri cellulari ed alterando alcune vie di segnalazione, rischiando così di mascherare i veri effetti dell'ipertensione polmonare sui *targets* molecolari considerati. Da questo punto di vista, il modello del sovraccarico di volume adottato nel nostro studio potrebbe dunque risultare più prossimo alla condizione clinica, riproducendo in modo più verosimile le alterazioni cellulari effettive indotte dal sovraccarico emodinamico e dall'ipertensione polmonare.

Nel presente studio, il ventricolo destro e il tessuto polmonare degli animali con *shunt* aorto-cavale sono caratterizzati da un significativo incremento del rapporto glutazione ossidato/glutazione ridotto (espresso come % di glutazione ossidato), indicando un aumentato stress ossidativo in condizioni di sovraccarico di volume e ipertensione polmonare. Tale dato potrebbe trovare spiegazione in relazione allo stato funzionale della eNOS nei tessuti degli animali *shuntati*: nonostante i livelli di espressione rimangano sostanzialmente invariati rispetto al controllo, l'enzima potrebbe essere disfunzionale, generando specie reattive dell'ossigeno (ROS) anziché ossido nitrico.

Dalla clinica è noto come pazienti con fattori di rischio cardiovascolare, patologie vascolari e ipertensione arteriosa polmonare, presentino un endotelio disfunzionante, con scarsa capacità di generare quantità adeguate di ossido nitrico bioattivo e conseguente compromissione delle capacità vasodilatatorie NO-mediate. La disfunzione endoteliale sembra essere uno degli eventi più precoci nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare e risulta caratterizzata da ridotti livelli di vasodilatatori (per lo più NO e prostaciclina), aumento degli agenti vasocontrittori (es: endotelina-1) e della produzione di ROS. Tra i numerosi sistemi enzimatici cellulari potenzialmente coinvolti nella generazione di ROS, il disaccoppiamento di eNOS (*eNOS uncoupling*) sembra giocare un ruolo particolarmente importante (101); vari ricercatori hanno infatti dimostrato come l'enzima disaccoppiato presenti modificazioni sostanziali nella struttura quaternaria (da omodimerica a monomeric) responsabili della conversione da enzima deputato alla sintesi di NO ad un enzima in grado di generare  $O_2^-$  (68, 69). Altri studi condotti con l'impiego di inibitori specifici hanno inoltre suggerito come la formazione eNOS-mediata di  $O_2^-$  e la successiva generazione di  $H_2O_2$  potrebbe rappresentare un importante meccanismo alla base della disfunzione endoteliale (102); il ruolo dell'anione superossido nelle varie forme di ipertensione arteriosa polmonare è ormai ampiamente riconosciuto (103, 104). I meccanismi attualmente noti per essere implicati nel disaccoppiamento di eNOS includono l'ossidazione della tetraidrobiopterina ( $BH_4$ ), cofattore critico per l'enzima, deplezione della L-arginina, accumulo delle metilarginine endogene e S-glutathionilazione; anche il perossinitrito ( $ONOO^-$ ), un componente altamente citotossico prodotto dalla reazione tra NO e  $O_2^-$ , può portare al disaccoppiamento della riduzione dell'ossigeno dalla generazione di NO nella eNOS. Il disaccoppiamento di eNOS come fonte di anione superossido è stato precedentemente identificato da Jerkic e collaboratori nei polmoni di topi  $Alk1^{+/-}$  (105) mentre in un altro studio il ruolo della disfunzione

enzimatica nella patogenesi dell'ipertensione polmonare è stato confermato dall'assenza di *remodelling* vascolare polmonare e ipertensione polmonare in seguito alla delezione del gene per eNOS nei topi *knockout* per la caveolina-1 (106).

Per quanto concerne il presente studio, ulteriori esperimenti volti a saggiare direttamente l'attività enzimatica di eNOS sono tuttavia necessari al fine di fornire informazioni precise sull'effettiva presenza dell'*uncoupling* dell'enzima nel ventricolo destro e tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale.

Nel nostro modello, dunque, lo stress ossidativo generato dall'enzima disfunzionante ridurrebbe la biodisponibilità di NO nel sistema cardiovascolare e nell'endotelio polmonare, con vasocostrizione dei capillari e aumento della pressione sanguigna caratteristiche dell'ipertensione polmonare; i radicali liberi in eccesso agirebbero quindi su numerosi componenti cellulari portando a inattivazione enzimatica, danno al DNA, perossidazione lipidica e danno alle membrane con conseguente morte cellulare da danno ossidativo.

È noto inoltre che le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto mediano l'ossidazione diretta del glutatione ridotto, potente *scavenger* naturale dei radicali liberi con forti proprietà antiossidanti, con conseguente aumento della concentrazione cellulare di glutatione ossidato, secondo una reazione catalizzata dall'enzima glutatione perossidasi:



laddove 2GSH rappresentano 2 molecole di L-glutatione ridotto e ROOH il perossido. Dalla reazione si produce acqua, alcol (ROH) e una molecola di glutatione disolfuro (GSSG, glutatione ossidato). Nell'organismo, la riconversione della forma ossidata in forma ridotta avviene ininterrottamente ad opera dell'enzima glutatione reduttasi.

Per questo motivo il rapporto GSSG/GSH viene generalmente considerato un indice indiretto dei livelli di stress ossidativo cellulare; il glutatione ridotto è infatti indispensabile per la rimozione dei radicali liberi.

I dati ottenuti dalla misurazione del rapporto GSSG/GSH nel ventricolo destro e nel tessuto polmonare dimostrano un aumentato stress ossidativo a cui verosimilmente contribuisce il già citato *uncoupling* di eNOS.

### ***Effetti dello shunt aorto-cavale sull'espressione di iNOS.***

L'analisi Western blot ha evidenziato un significativo incremento dei livelli di espressione di iNOS nei polmoni dei ratti con *shunt* aorto-cavale. Opposta invece è risultata la situazione nel ventricolo destro in cui la presenza dello *shunt* sembra aver contribuito ad una significativa *down*-regolazione dell'espressione enzimatica. È ormai ampiamente riconosciuto come, a differenza delle isoforme costitutive eNOS e nNOS, l'isoforma inducibile della ossido nitrico sintasi (iNOS) non venga fisiologicamente espressa nelle cellule; in alcune condizioni fisiopatologiche come l'infiammazione, si può tuttavia assistere ad un'induzione locale e transiente dell'enzima che diventa l'isoforma predominante. NF-kB e STAT1, due importanti fattori di trascrizione spesso attivati nei processi infiammatori, sembrano giocare un ruolo centrale nella biosintesi del messaggero. Nel tessuto polmonare l'espressione dell'isoforma inducibile è stata rivelata

nelle cellule endoteliali microvascolari, fibroblasti, cellule muscolari lisce vascolari e nelle cellule degli infiltrati infiammatori (71).

Alla luce di quanto già emerso dai dati di numerosi lavori sperimentali, la significativa *up*-regolazione, osservata nel presente studio, dei livelli di espressione di iNOS nei polmoni degli animali con *shunt* aorto-cavale potrebbe dunque essere il risultato di un quadro infiammatorio importante a carico dei vasi polmonari, tipico di una condizione avanzata di ipertensione polmonare. Dati clinici e anatomo-patologici mostrano infatti come nelle fasi più avanzate della patologia si possa sviluppare un quadro di arterite necrotizzante, caratterizzato da una completa necrosi fibrinoide della muscolatura liscia delle arterie muscolari polmonari e dalla presenza di un consistente infiltrato infiammatorio in tutta l'area circostante le fibrocellule muscolari lisce necrotiche; tale tessuto di granulazione può essere sottile, occupando soltanto un piccolo arco di muscolatura, oppure può talvolta sostituire più di un terzo della media e addirittura l'intero vaso in circostanze eccezionali (22).

In un simile quadro infiammatorio, il rilascio di alcune citochine pro-infiammatorie, come ad esempio IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , da parte delle cellule del sistema immunitario, potrebbe quindi indurre l'espressione della iNOS nei vasi polmonari con conseguente produzione massiva di ossido nitrico (nell'ordine delle  $\mu$ moli). Gli alti livelli di NO prodotti in questo modo dalle cellule attivate (per lo più macrofagi, neutrofili e altre cellule non immunitarie) possono recare danno alle cellule vicine: è noto infatti che, in condizioni patologiche, l'espressione di iNOS "sfugge" al suo fine meccanismo di regolazione e l'abbondante quantità di NO, prodotta in modo sregolato nello spazio e nel tempo, può indurre quindi gravi danni infiammatori a tessuti e organi.

Nel nostro modello sperimentale, l'NO prodotto in abbondanza dall'induzione di iNOS nel tessuto polmonare dei ratti *shuntati* potrebbe dunque reagire con l'anione superossido ( $O_2^-$ ) generato dal disaccoppiamento di eNOS con conseguente formazione di perossinitriti ( $ONOO^-$ ) altamente tossici e ulteriore aumento dello stress ossidativo e della percentuale di glutatione ossidato.

Nonostante le informazioni disponibili, il ruolo esatto di iNOS nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa polmonare rimane comunque ancora da chiarire.

Oltre al suo ruolo come agente vasodilatatore endotelio-derivato, neurotrasmettitore e immunomodulatore, l'NO sembra inoltre modulare la funzione cardiaca, per lo più con effetti inotropi negativi o positivi (a seconda della concentrazione) e mediante attenuazione delle risposte  $\beta$ -adrenergiche (107). È attualmente dimostrato come alterazioni nella biosintesi dell'NO giochino un ruolo importante nella patogenesi e progressione dello scompenso cardiaco, nonostante i dati sull'espressione e funzione delle diverse isoforme della NOS in queste condizioni patologiche continuino a rimanere controversi (108). Il ruolo di iNOS nella patogenesi dello scompenso cardiaco non è ancora stato chiarito: mentre alcuni autori hanno osservato l'espressione dell'isoforma inducibile soltanto nei cuori settici ma non negli altri tipi di insufficienza cardiaca (109, 110), altri hanno dimostrato l'espressione e l'attività di iNOS in varie forme di scompenso cardiaco (111, 112). Altri lavori sperimentali inoltre sostengono l'ipotesi che un'eccessiva produzione di NO contribuisca alla condizione di iporesponsività  $\beta$ -

adrenergica osservata nei pazienti con scompenso cardiaco (113, 114), mentre altri risultano discordi (115).

Nel nostro studio, la persistenza dello *shunt* aorto-cavale ha contribuito ad una significativa *down*-regolazione dell'espressione ventricolare destra di iNOS rispetto alle condizioni basali; un risultato apparentemente in contrasto con quanto precedentemente riportato da Gealekman e collaboratori in un modello sperimentale simile (108): tali ricercatori dimostrarono infatti che, nei ratti con insufficienza cardiaca compensata e scompensata, indotta dalla creazione di una fistola aorto-cavale, i livelli di espressione e l'attività di iNOS erano significativamente aumentati nei cardiomiociti degli animali *shuntati* rispetto al controllo. Sebbene un'alterata attività dell'NO sia stata precedentemente implicata nella patogenesi delle anomalie emodinamiche renali osservate nei ratti con fistola aorto-cavale (116), poche informazioni sono disponibili circa il contributo del sistema dell'ossido nitrico alla compromissione della funzione miocardica in questo modello.

Contrariamente a quanto riportato dal gruppo di Gealekman e da altri ricercatori (111, 112), ma più in linea con i nostri risultati, Stein e collaboratori (110) hanno riportato bassi livelli di espressione di iNOS nei cuori scompensati di pazienti con cardiomiopatia dilatativa, ischemica idiopatica o post-miocardite; similmente, il gruppo di Khadour (117) non ha evidenziato induzione dell'espressione, né attività, di iNOS nel miocardio di ratti e cani con insufficienza cardiaca. Rimangono sconosciute le ragioni alla base di questi dati conflittuali anche se potrebbero riflettere la diversità delle cause di scompenso cardiaco e/o dei modelli sperimentali impiegati nei diversi studi.

A supporto dei nostri dati potrebbe essere la considerazione del fatto che lo scompenso cardiaco indotto da sovraccarico di volume non è considerato di origine infiammatoria, anche se è stata dimostrata una marcata *up*-regolazione dell'espressione della chemochina MCP1 nel miocardio dei ratti con fistola aorto-cavale (118).

Considerando quanto già riportato in letteratura circa i possibili effetti dell'*overespressione* di iNOS e della produzione massiva di NO sulla funzione miocardica, è possibile ipotizzare che la marcata *down*-regolazione dell'isoforma inducibile osservata nel nostro modello sperimentale rappresenti l'espressione di uno o più meccanismi compensatori che si innescano nei cardiomiociti in seguito alla persistenza cronica del sovraccarico di volume. I topi *knockout* per iNOS mostrano infatti un minor grado di disfunzione cardiaca dopo infarto al miocardio rispetto ai controlli *wild-type* (119, 120), mentre, in un altro studio, Gealekman e collaboratori hanno evidenziato una marcata depressione della contrattilità ventricolare e della risposta  $\beta$ -adrenergica nei ratti con insufficienza cardiaca con significativo miglioramento in seguito all'inibizione selettiva di iNOS (108). Conformemente alla nozione, più volte riportata in letteratura, secondo la quale l'eccessiva produzione di NO contribuirebbe alla depressione delle risposte  $\beta$ -adrenergiche nei cuori scompensati, la consistente diminuzione dei livelli proteici di iNOS nel nostro modello sperimentale potrebbe dunque essere il risultato dell'attivazione di processi di repressione dell'espressione genica (trascrizionali, post-trascrizionali..) come un "tentativo" di preservazione della funzione contrattile messo in atto dai cardiomiociti. A differenza di quanto osservato nel tessuto polmonare, in cui potrebbero essere coinvolti meccanismi molecolari differenti, il ventricolo destro

potrebbe quindi “reagire” al sovraccarico emodinamico prolungato diminuendo i livelli di NO attraverso la *down*-regolazione dell’espressione di iNOS e aumentando così la responsività ai recettori  $\beta$ -adrenergici al fine di compensare e preservare il più possibile la funzione contrattile. Ulteriori studi sono comunque richiesti per valutare lo stato di attivazione di iNOS in un modello acuto di sovraccarico di volume, a distanza di poche ore/giorni dalla creazione dello *shunt*.

### ***Effetti dello shunt aorto-cavale sulla fosforilazione della Troponina I cardiaca e sulla funzione mitocondriale.***

I dati ottenuti dall’analisi Western blot hanno mostrato un significativo incremento dei livelli di fosforilazione della troponina I cardiaca (cTnI) e una consistente diminuzione dei livelli di ATP nel ventricolo destro di ratti con *shunt* aorto-cavale.

Anche il tessuto polmonare ha mostrato una significativa compromissione dello stato energetico cellulare, evidenziando un incremento dei livelli di AMP a spese di un marcato declino dell’ATP in presenza di *shunt* aorto-cavale.

È attualmente ben noto come le dinamiche funzionali della troponina C cardiaca (cTnC) non siano regolate soltanto dal *binding* del  $\text{Ca}^{2+}$  ma anche dalla trasduzione di questo segnale ad opera della troponina I (cTnI) e della troponina T (cTnT) cardiache (121). La fosforilazione di queste proteine sarcomeriche gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell’intensità e delle dinamiche sistoliche e diastoliche del muscolo cardiaco con meccanismi  $\text{Ca}^{2+}$ -indipendenti, al fine di sostenere le domande fisiologiche (121). In particolare, la fosforilazione della cTnI ai residui di serina 23/24 costituisce un meccanismo fisiologico ben noto responsabile della riduzione della sensibilità dei miofilamenti al  $\text{Ca}^{2+}$  dopo stimolazione  $\beta$ -adrenergica e attivazione della protein-chinasi A (PKA) (122).

È ormai certo che durante la sistole aumenta la concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico con successivo *binding* ai miofilamenti e inizio della contrazione. L’incremento dei livelli citosolici di  $\text{Ca}^{2+}$  costituisce un meccanismo di potenziamento della forza contrattile del sarcomero; tuttavia, anche la regolazione della modalità di risposta al  $\text{Ca}^{2+}$  da parte del sarcomero risulta importante in questo senso. La capacità della cTnI di regolare e modulare la funzione cardiaca sotto stimolazione del *signaling* adrenergico è stata ben documentata (127); è noto infatti che la cTnI è caratterizzata da un’estensione N-terminale di 30 aminoacidi, tra cui i residui di serina 23/24 possono essere soggetti a fosforilazione PKA-mediata per ridurre la sensibilità dei sarcomeri al  $\text{Ca}^{2+}$  e incrementare le cinetiche di formazione dei *cross-bridges*.

Precedenti studi (123, 124, 125) hanno dimostrato che variazioni nello status di fosforilazione della cTnI sembrano essere alla base della disfunzione cardiaca contrattile osservata in diverse condizioni fisiopatologiche quali ad esempio il danno da ischemia/riperfusion, l’ipertrofia, la sepsi e lo scompenso cardiaco. Alla luce di questi risultati, molti ricercatori ritengono pertanto che la condizione fisiologica sia il risultato di un equilibrio omeostatico dei livelli di fosforilazione delle proteine sarcomeriche, mentre gli stati patologici riflettano una perturbazione di questa omeostasi con una distribuzione “maladattativa” di queste fosforilazioni (126).

Nel presente studio, il significativo incremento dei livelli di fosforilazione della cTnI ai residui Ser23/24, osservato nel ventricolo destro dei ratti *shuntati* a 20 settimane rispetto al gruppo di controllo, risulta conforme a quanto recentemente riportato da Han e collaboratori (122), i quali dimostrarono che il riscaldamento dei ratti mantenuti in ipotermia stabile per 1 h e 30 min aumentava significativamente la fosforilazione PKA-mediata e totale della cTnI nei muscolo papillare del ventricolo sinistro e diminuiva la sensibilità al dei miofilamenti e la forza contrattile del tessuto muscolare cardiaco. Nel nostro modello sperimentale, il marcato incremento dello stato di fosforilazione PKA-mediata della cTnI ai siti Ser23/24 in seguito al sovraccarico di volume cronico, potrebbe dunque giocare un ruolo importante nella progressione dello scompenso ventricolare attraverso una significativa riduzione della sensibilità dei miofilamenti al  $Ca^{2+}$  con conseguente disfunzione contrattile dei cardiomiociti. Dal momento che alterazioni nello status di fosforilazione della cTnI sembrano essere il risultato di un alterato equilibrio tra attività chinasiche e fosfatasiche, la persistenza dello *shunt* aorto-cavale potrebbe dunque perturbare questo delicato equilibrio alterando la sensibilità al  $Ca^{2+}$  e la contrattilità miocardica. Interessante, a questo punto, sarebbe comprendere l'esatto meccanismo alla base degli effetti del sovraccarico emodinamico prolungato sulla stimolazione  $\beta$ -adrenergica e conseguente induzione PKA-mediata della fosforilazione della cTnI.

In aggiunta a quanto emerso dai risultati ecocardiografici ed emodinamici ottenuti nella fase preliminare dello studio, la depressione della contrattilità cardiaca dei ratti con *shunt* aorto-cavale persistente è stata ulteriormente dimostrata dalla marcata riduzione dei livelli di ATP e fosfocreatina (PCr), indici di funzionalità mitocondriale e, conseguentemente, dello stato energetico cellulare.

Le alterazioni del metabolismo energetico dei cardiomiociti sembrano giocare un ruolo significativo nella progressione dello scompenso cardiaco in condizioni di sovraccarico di pressione e/o volume; la maggior parte degli studi clinici e sperimentali indica infatti come il miocardio ipertrofico e scompensato risulti caratterizzato da alterazioni del metabolismo energetico, in particolare alterazioni del contenuto dei fosfati ad alta energia e della funzione mitocondriale, nonché da un'aumentata dipendenza dal glucosio come fonte energetica primaria. Queste alterazioni metaboliche potrebbero riflettere un incremento della domanda energetica del muscolo cardiaco o una compromissione della capacità di generare sufficienti quantità di ATP. Secondo tali considerazioni, dal momento che i mitocondri costituiscono i siti principali di rigenerazione dell'ATP, riduzioni della biodisponibilità di ossigeno o difetti della funzione mitocondriale potrebbero essere responsabili delle alterazioni energetiche osservate nel nostro modello sperimentale a livello del ventricolo destro (128). È ormai noto come la continua re-sintesi dell'ATP attraverso la fosforilazione ossidativa mitocondriale sia fondamentale per il mantenimento del meccanismo di contrazione; la generazione di fosfocreatina (PCr) è importante per il rilascio dell'ATP dai mitocondri. Conformemente ai nostri risultati, numerosi studi clinici e pre-clinici hanno evidenziato un marcato declino nel contenuto della fosfocreatina in combinazione con un'altrettanto consistente riduzione dei livelli di ATP nei cuori ipertrofici e scompensati, indicando una significativa compromissione del metabolismo energetico (129). Similmente a quanto da noi riportato, inoltre, questi studi mostravano un ridotto rapporto PCr/ATP, importante indice di riserva energetica

cellulare, la cui diminuzione risulta strettamente correlata con l'entità dello scompenso e potrebbe rivelarsi particolarmente utile ai fini prognostici. La riduzione del contenuto dei fosfati ad alta energia potrebbe inoltre riflettere una compromissione della funzione mitocondriale: riduzioni dei livelli proteici tissutali e dell'attività di alcuni complessi della catena respiratoria (dall'I al IV) sono stati precedentemente riportati in modelli animali di scompenso cardiaco e nei cuori umani insufficienti (129, 130). Tuttavia, un altro studio ha riportato come nei mitocondri isolati da cuori sottoposti a sovraccarico di volume i complessi III e IV non mostrino variazioni suggerendo quindi un'inalterata attività della catena respiratoria in queste condizioni fisiopatologiche (131). Alla luce di tutte queste evidenze si potrebbe dunque ipotizzare che le anomalie nella fosforilazione ossidativa mitocondriale si manifestino tardivamente nel nostro modello di scompenso cardiaco dovuto a sovraccarico cronico di volume.

Similmente a quanto da noi evidenziato nel ventricolo destro, la significativa riduzione del contenuto cellulare dei fosfati ad alta energia osservata nel tessuto polmonare dei ratti *shuntati*, potrebbe essere indice di disfunzione mitocondriale e danno cellulare.

È attualmente noto il ruolo giocato dalle specie reattive dell'ossigeno nell'induzione del danno ai mitocondri attraverso "l'attacco" al DNA e alle proteine mitocondriali con conseguente compromissione delle capacità aerobiche cellulari (128). Si potrebbe dunque pensare che l'aumentata produzione di ROS nei tessuti dei ratti *shuntati*, indicata nel nostro modello dall'incremento della percentuale di GSSG, possa significativamente contribuire alla disfunzione della catena respiratoria, con conseguente diminuzione del contenuto cellulare dei fosfati ad alta energia.

## **5.2 Seconda fase: effetti biochimici e molecolari dell'albumina nitrosilata sull'ipertensione polmonare da sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro.**

Nella seconda fase dello studio sono stati valutati gli effetti biochimici e molecolari dell'albumina nitrosilata nel modello di ipertensione polmonare da sovraccarico di volume cronico del ventricolo destro.

Dato il ruolo importante giocato dalla ridotta biodisponibilità dell'ossido nitrico nella patogenesi dell'ipertensione polmonare ed essendo l'ossido nitrico già utilizzato nel trattamento di tale patologia, è stato ipotizzato che l'utilizzo dell'albumina nitrosilata potesse aumentare la biodisponibilità di tale molecola determinando un miglioramento dell'ipertensione polmonare indotta nel nostro modello.

Sulla base dei dati emodinamici ottenuti in una fase preliminare dello studio, i quali mostravano un significativo miglioramento della *performance* ventricolare e una marcata diminuzione della pressione arteriosa polmonare e dell'elastanza arteriosa nei ratti trattati con albumina nitrosilata, lo scopo principale di questa seconda fase consisteva quindi nel tentativo di validare ulteriormente tali dati con il supporto delle indagini biochimica e molecolare.

### ***Effetti dell'albumina nitrosilata nel ventricolo destro dei ratti con shunt aorto-cavale.***

L'analisi Western blot eseguita sui campioni di ventricolo destro ha mostrato una significativa riduzione dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 nei ratti trattati con albumina nitrosilata in infusione continua per un'ora (gruppo SHUNT+S-NO-HSA) rispetto ai ratti di controllo (SHUNT+HSA), dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. Una marcata riduzione dei livelli di fosforilazione di cTnI è stata inoltre osservata nel ventricolo destro dei ratti trattati.

Questi dati sembrerebbero dunque indicare un sostanziale effetto migliorativo dell'albumina nitrosilata sulla *performance* cardiaca costituendo così un ulteriore supporto ai risultati emodinamici precedentemente ottenuti. In questo contesto, l'albumina nitrosilata, in quanto NO-*donor*, potrebbe agire indirettamente sul miocardio ventricolare attraverso il rilascio dell'ossido nitrico a livello del circolo polmonare: l'aumentata concentrazione di ossido nitrico potrebbe infatti indurre vasodilatazione delle arteriole polmonari con conseguente diminuzione delle resistenze vascolari polmonari e della pressione sanguigna. In questa condizione, il marcato calo del post-carico del ventricolo destro potrebbe dunque innescare un meccanismo di *feedback* negativo, riducendo i livelli di fosforilazione di ERK1/2 e della cTnI, con conseguente diminuzione della crescita ipertrofica dei cardiomiociti e aumento della sensibilità dei miofilamenti contrattili al  $Ca^{2+}$ . In questo modo, dunque, la somministrazione acuta di albumina nitrosilata potrebbe incrementare la funzione cardiaca nei ratti *shuntati down*-regolando indirettamente i *pathways* molecolari ipertrofici e contrattili, attivati dal sovraccarico di volume, attraverso la riduzione del post-carico. Nel ventricolo destro, dunque, il *signaling* di ERK1/2 e il ruolo della cTnI nel processo contrattile dei cardiomiociti potrebbero rappresentare alcuni meccanismi molecolari coinvolti negli effetti migliorativi dell'albumina nitrosilata sulla *performance* cardiaca, anche se ulteriori studi saranno necessari per la valutazione di altri possibili "attori" eventualmente implicati.

L'azione dell'NO-*donor* sulla funzione cardiaca contrattile è stata tuttavia solo in parte supportata dai dati biochimici ottenuti dall'analisi dei fosfati ad alta energia, i quali hanno mostrato una tendenza alla preservazione dei livelli di fosfocreatina e ATP nei ratti trattati rispetto agli animali di controllo senza però raggiungere la significatività statistica. Sulla base di questi risultati, anche la funzione mitocondriale e lo stato energetico dei cardiomiociti sembrerebbero essere migliorati dall'azione dell'albumina nitrosilata ma ulteriori esperimenti con un maggior numero di campioni sono richiesti per ridurre l'errore standard legato alla variabilità intrinseca individuale degli animali.

Contrariamente a quanto osservato per ERK1/2 e cTnI, l'albumina nitrosilata non ha mostrato effetti rilevanti su Akt ed eNOS nel ventricolo destro dei ratti trattati. Dall'analisi Western blot non sono infatti emerse variazioni statisticamente significative dei livelli di fosforilazione di Akt né dei livelli di espressione/attivazione di eNOS nel gruppo di trattamento (SHUNT+S-NO-HSA) rispetto al gruppo di controllo (SHUNT+HSA) dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale.

In questo caso, diversamente da quanto mostrato per ERK1/2 e cTnI, una somministrazione continua di un'ora potrebbe non essere sufficiente per consentire all'albumina nitrosilata di espletare i suoi effetti sulla fosforilazione di Akt e,

conseguentemente, sull'espressione di eNOS. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per valutare lo stato enzimatico di eNOS: nonostante i livelli di espressione rimangano sostanzialmente inalterati, il trattamento potrebbe in qualche modo favorire l'attivazione di un *loop* di regolazione positiva, determinando uno *shift* verso la forma omodimerica, accoppiata, dell'enzima, oppure inibendo direttamente il disaccoppiamento, con conseguente ripristino dell'attività fisiologica di generazione di NO. In questo senso, dunque, se la persistenza cronica dello *shunt* aorto-cavale inducesse il fenomeno dell'eNOS *uncoupling*, l'albumina nitrosilata potrebbe riportare l'enzima nella forma accoppiata, ripristinando così l'omeostasi dell'ossido nitrico nei cardiomiociti. A supporto di questa ipotesi, uno studio sperimentale eseguito su maiali soggetti ad ischemia/riperfusion ha dimostrato come il trattamento con albumina nitrosilata in infusione continua per un'ora preveniva il disaccoppiamento di eNOS e migliorava le funzioni sistolica e diastolica, la perfusione miocardica e le riserve energetiche del cuore in seguito al danno da ischemia/riperfusion (133).

Dal momento che nel nostro studio i livelli di glutatione ossidato nel ventricolo destro sono rimasti pressochè invariati nonostante il trattamento, al fine di validare o smentire questa ipotesi è indispensabile eseguire ulteriori esperimenti con l'impiego di saggi specifici per la valutazione dell'effettivo disaccoppiamento/accoppiamento di eNOS nel modello animale considerato, prima e dopo trattamento con albumina nitrosilata. Sarebbe inoltre interessante determinare direttamente i livelli tissutali di NO e radicali liberi con l'utilizzo di particolari nanosensori, in modo tale da poter monitorare in modo continuo il rilascio dell'NO da parte dell'albumina nitrosilata e verificare la generazione delle specie reattive nelle diverse condizioni.

### ***Effetti dell'albumina nitrosilata nel tessuto polmonare dei ratti con *shunt* aorto-cavale.***

La significativa diminuzione della percentuale di glutatione ossidato (%GSSG) e le marcate variazioni dei livelli di AMP e ATP osservate nel tessuto polmonare degli animali *shuntati* trattati con albumina nitrosilata rispetto ai ratti di controllo, sembrano riflettere un effetto complessivamente positivo dell'albumina nitrosilata a livello polmonare. La sostanziale riduzione dei livelli di glutatione ossidato potrebbe infatti essere indice di una parallela diminuzione dei radicali liberi tissutali, mentre il significativo incremento del contenuto cellulare dei fosfati ad alta energia, in particolare di ATP, rifletterebbe allo stesso tempo una tendenza alla preservazione della funzione mitocondriale e dello stato energetico tissutale. Secondo quanto emerso da questi dati biochimici, l'albumina nitrosilata sembrerebbe dunque avere un effetto sostanzialmente benefico sul tessuto polmonare, riducendo i livelli di radicali liberi e il danno ossidativo/nitrosativo e preservando la funzionalità cellulare.

Similmente a quanto osservato nel ventricolo destro, l'analisi Western blot non ha evidenziato variazioni statisticamente significative della fosforilazione di Akt né dei livelli di espressione/attivazione di eNOS nei polmoni dei ratti con *shunt* aorto-cavale trattati con albumina nitrosilata rispetto al gruppo di controllo. Anche in questo caso si potrebbe considerare l'ipotesi di un qualche effetto dell'NO-donor sullo stato funzionale

di eNOS piuttosto che sulla modulazione dell'espressione attraverso il *signaling* Akt-eNOS. In questo senso, dunque, e in accordo con dati di studi precedenti (133), la somministrazione acuta di albumina nitrosilata potrebbe indurre il "ri-accoppiamento" dell'enzima, o inibirne direttamente il disaccoppiamento, con conseguente ripristino della funzione principale di generazione di ossido nitrico, riduzione dei livelli di ROS precedentemente prodotti dall'enzima disaccoppiato e riduzione del contenuto cellulare di glutazione ossidato. L'NO gradualmente rilasciato dall'albumina nitrosilata potrebbe dunque attivamente prevenire la disfunzione endoteliale prevenendo il fenomeno dell'*eNOS uncoupling* attraverso un meccanismo di regolazione a *feedback* negativo, con conseguente aumento della biodisponibilità dei substrati e cofattori enzimatici e riduzione della generazione di  $O_2^-$  e altre molecole citotossiche.

Tuttavia, come già discusso per il ventricolo destro, questa ipotesi potrà essere validata o smentita soltanto attraverso l'impiego di saggi enzimatici che permettano di valutare *in vitro* l'attività enzimatica di eNOS e il suo effettivo stato di accoppiamento/disaccoppiamento nei due gruppi di ratti *shuntati*. Ulteriori esperimenti saranno inoltre necessari per identificare le vie di segnalazione e i meccanismi molecolari coinvolti nella mediazione degli effetti apparentemente benefici dell'albumina nitrosilata nel tessuto polmonare degli animali con ipertensione polmonare dovuta al sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro.

A differenza di quanto riportato per il ventricolo destro, nessuna variazione statisticamente significativa dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 è stata evidenziata nel tessuto polmonare dei ratti trattati rispetto agli animali di controllo, dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale. In questo studio è stato dimostrato come la persistenza del sovraccarico emodinamico per un periodo di 20 settimane sia in grado di indurre un lo sviluppo di un quadro avanzato di ipertensione polmonare, come indicato dalla presenza di alcune lesioni istologiche tipiche della fase più tardiva e irreversibile della patologia. Dato il coinvolgimento di ERK1/2 nei processi ipertrofici, e data la sostanziale irreversibilità dell'ipertrofia mediale dei vasi polmonari in questa fase, l'assenza di variazioni nella fosforilazione di queste chinasi potrebbe dunque riflettere l'incapacità di un sistema così "scompensato" di ritornare ai valori fisiologici. Non è inoltre da escludere l'ipotesi che, per l'attenuazione di un quadro patologico così avanzato e, di conseguenza, per osservare dei possibili effetti su ERK1/2, sia necessario un periodo più lungo di infusione di albumina nitrosilata. In uno studio eseguito su ratti con shock endotossico da iniezione sistemica di LPS, Jakubowski e collaboratori hanno infatti dimostrato che un'infusione continua di albumina nitrosilata per 4 ore, per una dose totale di 72 mg/kg, riduceva significativamente il danno polmonare acuto indotto dall'endotossina e prolungava la sopravvivenza di questi animali, suggerendo un potenziale ruolo terapeutico di questo nuovo NO-*donor* nello shock endotossico (138). Questa ipotesi dovrà dunque essere valutata in ulteriori esperimenti.

**Effetti dell'albumina nitrosilata sull'espressione di iNOS nel ventricolo destro e nel tessuto polmonare dei ratti con shunt aorto-cavale.**

L'analisi Western blot ha mostrato una significativa *up*-regolazione dei livelli di espressione di iNOS nel ventricolo destro e nel polmone dei ratti trattati con albumina nitrosilata rispetto ai ratti di controllo dopo 20 settimane di esposizione allo *shunt* aorto-cavale.

Alcuni studi precedentemente eseguiti in modelli sperimentali di ischemia/riperfusionazione hanno dimostrato la capacità di questo nuovo agente donatore di ossido nitrico di migliorare le funzioni sistolica e diastolica biventricolare attraverso l'inibizione dell'espressione di iNOS e conseguente riduzione dei radicali liberi. L'aumentata generazione di queste specie altamente reattive costituisce infatti un noto meccanismo peggiorativo nello scompenso cardiaco cronico. Anche altri studi hanno evidenziato la capacità dell'NO di modulare l'attività e l'espressione di iNOS per lo più con un meccanismo di modulazione a *feedback* negativo, attraverso l'interazione con il componente eme dell'enzima (134).

Molti ricercatori sostengono tuttavia che la natura degli effetti dell'NO sulla modulazione dell'espressione di iNOS sia strettamente dipendente dal sistema sperimentale considerato: nel muscolo liscio e nelle cellule del mesangio di ratto stimulate con IL-1, per esempio, l'NO sembra giocare un ruolo positivo nell'induzione di iNOS (135), mentre alcuni NO-*donors* sembrano limitare l'induzione dell'enzima in altri tipi cellulari. Alcuni studi hanno dimostrato come la generazione di cGMP in seguito all'attivazione della guanilato ciclasi solubile potrebbe costituire uno dei meccanismi coinvolti nella mediazione di alcuni effetti degli agenti donatori di NO sull'espressione genica; in particolare, agenti in grado di elevare i livelli di cGMP sembrano esercitare sia effetti positivi sia negativi sull'induzione di iNOS con meccanismi tipo cellulare- e tempo-dipendenti (136). L'esistenza di meccanismi autocrini o paracrini che coinvolgono l'NO nel controllo della sua stessa sintesi attraverso la modulazione dell'espressione di iNOS, è stata proposta in numerosi studi in cui sono state osservate sia amplificazioni che inibizioni dell'espressione di iNOS da parte dell'ossido nitrico stesso. Sulla base di quanto riportato in letteratura, si potrebbe dunque ipotizzare che la prevalenza di effetti positivi o negativi sull'espressione di iNOS potrebbe essere strettamente correlata al tipo cellulare o alle diverse specie considerate. Questo sarebbe quindi il motivo per il quale, come accennato precedentemente, gli NO-*donors* e/o agenti in grado di elevare le concentrazioni di cGMP sembrano giocare un ruolo positivo sull'espressione di iNOS nel muscolo liscio e nelle cellule del mesangio, mentre nelle cellule di tipo macrofagico l'effetto più frequentemente riportato è negativo. In aggiunta a queste considerazioni, Pérez-Sala e collaboratori (136) hanno precedentemente dimostrato che entrambi i tipi di effetti possono essere evidenziati nello stesso sistema sperimentale con modalità tempo-dipendenti; in questi studi, infatti, gli NO-*donors* e gli analoghi del cGMP inizialmente aumentavano l'espressione di iNOS negli stadi precoci dell'infiammazione mentre mostravano un effetto prevalentemente inibitorio nelle fasi più tardive del trattamento.

Secondo questi autori, dunque, negli stadi iniziali di un processo infiammatorio l'NO potrebbe amplificare la sua propria sintesi per poi contribuire all'induzione o

amplificazione dei meccanismi di modulazione a *feedback* negativo dell'espressione di iNOS nelle fasi più avanzate dell'infiammazione (136).

Conformemente a queste considerazioni, nel nostro modello sperimentale la marcata *up*-regolazione dell'espressione di iNOS, osservata a livello del ventricolo destro e del tessuto polmonare dei ratti trattati con albumina nitrosilata, potrebbe riflettere l'effetto dell'*NO-donor* nella fase iniziale di un processo infiammatorio a carico dei tessuti analizzati. Secondo quanto sostenuto da Pérez-Sala e collaboratori (136), dunque, in questa fase precoce dell'infiammazione l'ossido nitrico esogeno potrebbe amplificare la sua stessa sintesi attraverso l'induzione dell'espressione di iNOS, anche se le precise finalità cellulari di un simile meccanismo di *feedback* positivo rimangono ancora da chiarire.

L'ipotesi di un processo infiammatorio in fase precoce nel nostro modello sperimentale sembrerebbe essere supportata dall'analisi istologica eseguita sul tessuto polmonare degli animali *shuntati*, i quali non hanno mostrato segni di arterite necrotizzante, una lesione infiammatoria avanzata, caratteristica della fase tardiva dell'ipertensione polmonare. Al fine di verificare l'ipotesi di Pérez-Sala e collaboratori, sarebbero necessari ulteriori studi eseguiti mantenendo lo *shunt* per un tempo più prolungato, in modo tale da consentire la progressione dell'ipertensione polmonare e lo sviluppo dei processi infiammatori; in questo quadro di infiammazione avanzata si potrebbe quindi procedere con la somministrazione di albumina nitrosilata e la successiva analisi Western blot dei livelli di espressione di iNOS.

I meccanismi mediante i quali l'*NO* esercita i suoi effetti positivi e negativi sull'induzione di iNOS potrebbero essere molteplici; alcuni studi dimostrano infatti come tale molecola sia in grado di modulare l'espressione genica agendo per lo più a livello post-trascrizionale. È stata infatti precedentemente sottolineata l'importanza di meccanismi post-trascrizionali nella determinazione dell'estensione e della durata dell'induzione di iNOS; secondo Pérez-Sala e collaboratori, ad esempio, la destabilizzazione dell'mRNA di iNOS da parte dell'*NO* esogeno potrebbe contribuire alla limitazione dell'induzione enzimatica osservata nelle fasi tardive del trattamento con *NO-donors* (136).

Rimangono tuttavia ancora sconosciuti gli eventi molecolari alla base dell'amplificazione *NO-donors*-mediata dei livelli di espressione di iNOS nelle fasi precoci dell'infiammazione, anche se sono stati riportati casi in cui gli agenti donatori di ossido nitrico sembravano aumentare la velocità di trascrizione di iNOS nelle cellule del mesangio di ratto precedentemente stimulate con IL-1 $\beta$  (135). In aggiunta, secondo alcuni autori, potenziali *targets* dell'*NO* potrebbero essere rappresentati dai fattori di trascrizione AP-1 e NF-kB, normalmente coinvolti nell'induzione di iNOS in risposta alla stimolazione da citochine pro-infiammatorie: agenti donatori di *NO* potrebbero favorire il *binding* AP-1-DNA incrementando quindi l'attività trascrizionale dei geni *targets*. È stato precedentemente descritto, inoltre, come in alcuni tipi cellulari gli *NO-donors* sembrano esercitare sia effetti positivi che negativi sull'espressione di I $\kappa$ B $\alpha$ , promuovendo la traslocazione nucleare di NF-kB negli stadi iniziali della stimolazione con citochine pro-infiammatorie e diminuendo i livelli nucleari di NF-kB negli stadi più tardivi, determinando dunque una modulazione bifasica dell'espressione di COX-2 (137).

Secondo questi studi, quindi, la modulazione dei livelli di I $\kappa$ B $\alpha$  potrebbe essere coinvolta nella regolazione dell'espressione di iNOS da parte dell'NO esogeno.

## **6. CONCLUSIONI.**

Il modello studiato di sovraccarico cronico di volume del ventricolo destro con progressivo sviluppo di ipertensione polmonare dimostra il coinvolgimento di vie di segnale attivate nella patogenesi dell'insufficienza ventricolare destra con ipertensione del circolo arterioso polmonare e in particolare:

- ERK 1/2 nell'ipertrofia cardiaca e della componente vascolare polmonare;
- Akt nella sopravvivenza cellulare;
- cTnI nella regolazione della funzione contrattile dei cardiomiociti;
- eNOS e iNOS nell'omeostasi endoteliale e nella generazione di ossido nitrico.

In questo contesto sperimentale, che riproduce condizioni cliniche specifiche, l'utilizzo di un nuovo NO-*donor* quale la S-NO-HSA per via sistemica in acuto, risulta essere vantaggioso non solo per il profilo emodinamico e biochimico ma poiché attenua le alterazioni di mediatori coinvolti in vie biomolecolari di fondamentale importanza per le possibili implicazioni cliniche.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G; **ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The Task Force for the diagnosis and treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT).** *Eur Heart J* 2009; 30: 2493-2537.
2. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J; American College of Cardiology Foundation Task Force on **Expert Consensus Documents**; American Heart Association; American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc; Pulmonary Hypertension Association. **ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association.** *JACC* 2009; 53: 1573-619.
3. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJV, Caballero L, Stewart S. **An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2007; 30: 104-109.
4. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. **Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review.** *Eur Respir J* 2009; 34: 888-894.
5. Oudiz RJ. **Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease.** *Clin Chest Med* 2007; 28: 233-241.
6. Hatano S, Strasser T. **Primary Pulmonary Hypertension. Report on a WHO Meeting.** October 15-17, 1973, Geneva: World Health Organization, 1975.
7. Fishman AP. **Clinical classification of pulmonary hypertension.** *Clin Chest Med* 2001; 22: 385-91.
8. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N,

Souza R. **Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension.** *JACC* 2009; 54: S43-54.

9. Gabbay E, Yeow W, Playford D. **Pulmonary arterial Hypertension (PAH) is an uncommon cause of pulmonary hypertension (PH) in an unselected population: the Armadale echocardiography study.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: A713.
10. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. **Pulmonary Arterial Hypertension in France: Results from a National Registry.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 1023-1030.
11. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, Levy PC, Reid LM, Vreim CE, Williams GW. **Primary Pulmonary Hypertension: A National Prospective Study.** *Ann Intern Med* 1987; 107: 216-223.
12. Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, Stanton KC, Wheeler LA, Phillips III JA, Loyd JE, Nichols WC. **High Frequency of *BMPR2* Exonic Deletions/Duplications in Familial Pulmonary Arterial Hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 590-598.
13. Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, Gruenig E, Janssen B, Koehler R, Seeger W, Eickelberg O, Olschewski H, Elliott CG, Glissmeyer E, Carlquist J, Kim M, Torbicki A, Fijalkowska A, Szewczyk G, Parma J, Abramowicz MJ, Galie N, Morisaki H, Kyotani S, Nakanishi N, Morisaki T, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O, Soubrier F, Coulet F, Morrell NW, Trembath RC. **Mutations of the TGF- $\beta$  Type II Receptor *BMPR2* in Pulmonary Arterial Hypertension.** *Hum Mutat* 2006; 27: 121-132.
14. Friedman WF. **Proceedings of National Heart, Lung, and Blood Institute Pediatric Cardiology Workshop: Pulmonary Hypertension.** *Pediatr Res* 1986; 20: 811-824.
15. Galie N, Manes A, Palazzini M, Negro L, Marinelli A, Gambetti S, Mariucci E, Dotti A, Branzi A, Picchio FM. **Management of Pulmonary Arterial Hypertension associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome.** *Drugs* 2008; 68: 1049-1066.
16. Daliento L, Somerville J, Presbitero P, Menti L, Brach-Prever S, Rizzoli G, Stone S. **Eisenmenger syndrome: factors relating to deterioration and death.** *Eur Heart J* 1998; 19: 1845-1855.

17. Roberts KE, McElroy JJ, Wong WPK, Yen E, Widlitz A, Barst RJ, Knowles JA, Morse JH. **BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease.** *Eur Respir J* 2004; 24: 371-374.
18. Beghetti M, Galié N. **Eisenmenger syndrome: a clinical perspective in a new therapeutic era of pulmonary arterial hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 733-740.
19. Hopkins WE. **The remarkable right ventricle of patients with Eisenmenger syndrome.** *Coron Artery Dis* 2005; 16: 19-25.
20. Besterman E. **Atrial septal defect with pulmonary hypertension.** *Br Heart J* 1961; 23:587-598.
21. Edelman JD. **Clinical presentation, differential diagnosis, and vasodilator testing of pulmonary hypertension.** *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2007; 11: 110-118.
22. Heath D, Edwards JE. **The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease: a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects.** *Circulation* 1958; 18: 533-547.
23. Mooi WJ, Grünberg K. **Histopathology of pulmonary hypertensive diseases.** *Curr Diagn Pathol* 2006; 12: 429-440.
24. Wagenvoort CA. **Plexogenic arteriopathy.** *Thorax* 1994; 49: S39-S45.
25. Archer S, Rich S. **Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research “Work in progress”.** *Circulation* 2000; 102: 2781-2791.
26. Smith P, Heath D. **Electron microscopy of the plexiform lesion.** *Thorax* 1979; 34: 177-186.
27. Yi ES, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, Hansen LA, Park K, Friedmann PJ. **Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1577-1586.
28. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupuis J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, Suzuki YJ, Gladwin M, Denholm EM, Gail DB. **Right ventricular function and failure. Report of a National Heart, Lung and Blood Institute Working Group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure.** *Circulation* 2006; 114: 1883-1891.

29. Lang IM, Benza R. **Pulmonary hypertension: chapters of innovation and tribulation.** *Eur Heart J* 2012; 33: 961-968.
30. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, Morrell NW. **Primary Pulmonary Hypertension Is Associated With Reduced Pulmonary Vascular Expression of Type II Bone Morphogenetic Protein Receptor.** *Circulation* 2002; 105: 1672-1678.
31. Hamid R, Cogan JD, Hedges LK, Austin E, Phillips III JA, Newman JH, Loyd JE. **Penetrance of Pulmonary Arterial Hypertension is modulated by the expression of normal *BMPR2* allele.** *Hum Mutat* 2009; 30: 649-654.
32. Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JRB, Gomberg-Maitland M, Thébaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J. **Epigenetic Attenuation of Mitochondrial Superoxide Dismutase 2 (SOD2) in Pulmonary Arterial Hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target.** *Circulation* 2010; 121: 2661-2671.
33. Xu XF, Ma XL, Shen Z, Wu XL, Cheng F, Du LZ. **Epigenetic regulation of the endothelial nitric oxide synthase gene in persistent pulmonary hypertension of the newborn rat.** *J Hypertens* 2010; 28: 2227-2235.
34. Paulin R, Courboulin A, Barrier M, Bonnet S. **From oncoproteins/tumor suppressors to microRNAs, the newest therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension.** *J Mol Med* 2011; 89: 1089-1101.
35. Boucher JM, Peterson SM, Urs S, Zhang C, Liaw L. **The miR-143/145 cluster is a novel transcriptional target of Jagged-1/Notch signaling in vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 2011; 286: 28312-28321.
36. Chin KM, Kim NHS, Rubin LJ. **The right ventricle in pulmonary hypertension.** *Coron Artery Dis* 2005; 16: 13-18.
37. Noordegraaf AV, Galiè N. **The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir Rev* 2011; 20: 243-253.
38. Chin KM, Coghlan G. **Characterizing the right ventricle: advancing our knowledge.** *Am J Cardiol* 2012; 110: S3-S8.
39. Markel TA, Wairiuko GM, Lahm T, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Meldrum DR. **The right heart and its distinct mechanisms of development, function, and failure.** *J Surg Res* 2008; 146: 304-313.

40. Bogaard HJ, Abe K, Noordegraaf AV, Voelkel NF. **The right ventricle under pressure. Cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension.** *Chest* 2009; 135: 794-804.
41. Galiè N, Manes A, Palazzini M, Negro L, Romanazzi S, Branzi A. **Pharmacological impact on right ventricular remodelling in pulmonary arterial hypertension.** *Eur Heart J* 2007; 9:H68-H74.
42. Marcus JT, Gan CT, Zwanenburg JJ, Boonstra A, Allaart CP, Götte MJ, Vonk-Noordegraaf A. **Interventricular mechanical asynchrony in pulmonary arterial hypertension: left-to-right delay in peak shortening is related to right ventricular overload and left ventricular underfilling.** *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:750-757.
43. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. **Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.** *Cell* 2003; 114: 763-776.
44. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. **Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.** *Nature* 2001; 410: 701-705.
45. Velez-Roa S, Ciarka A, Najem B, Vachiery JL, Naeije R, van de Borne P. **Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension.** *Circulation* 2004; 110:1308-1312.
46. Sakao S, Tatsumi K. **Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: Multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities.** *Int J Cardiol* 2011; 147: 4-12.
47. Li C, Xu Q. **Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells.** *Cell Signal* 2000; 12:435-445.
48. Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ. **Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling.** *Int J Biochem Cell B* 2009; 41: 2351-2355.
49. Ruwhof C, van der Laarse A. **Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways.** *Cardiovasc Res* 2000; 47: 23-37.
50. Baines CP, Molkenkin JD. **STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis.** *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 47-62.
51. Wortzel I, Seger R. **The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles.** *Genes Cancer* 2011; 2:195-209.

52. Roskoski R Jr. **ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation.** *Pharmacol Res* 2012; 66:105-143.
53. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. **The protein kinase complement of the human genome.** *Science* 2002; 298:1912-1934.
54. Cargnello M, Roux PP. **Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75:50-83.
55. Kehat I, Molkenstein JD. **Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy.** *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1188: 96-102.
56. Lloyd AC. **Distinct functions for ERKs?** *J Biol* 2006; 5:13.
57. Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD, Cobb MH. **Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro.** *J Biol Chem* 1993; 268:5097-5106.
58. Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM. **Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:12759-12764.
59. Manning BD, Cantley LC. **AKT/PKB Signaling: navigating downstream.** *Cell* 2007; 129: 1261-1274.
60. Sussman MA, Völkers M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT, Din S, Gude N, Avitabile D, Alvarez R, Sundararaman B, Quijada P, Mason M, Konstandin MH, Malhowski A, Cheng Z, Khan M, McGregor M. **Myocardial Akt: the omnipresent nexus.** *Physiol Rev* 2011; 91: 1023-1070.
61. Song G, Ouyang G, Bao S. **The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival.** *J Cell Mol Med* 2005; 9: 59-71.
62. Donker DW, Maessen JG, Verheyen F, Ramaekers FC, Spätjens RL, Kuijpers H, Ramakers C, Schiffers PM, Vos MA, Crijns HJ, Volders PG. **Impact of acute and enduring volume overload on mechanotransduction and cytoskeletal integrity of canine left ventricular myocardium.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H2324-H2332.
63. Dent MR, Das S, Dhalla NS. **Alterations in both death and survival signals for apoptosis in heart failure due to volume overload.** *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43:726-732.

64. Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. **Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis.** *Circ Res* 1998; 83:334-341.
65. Loufrani L, Retailleau K, Bocquet A, Dumont O, Danker K, Louis H, Lacolley P, Henrion D. **Key role of alpha1/beta1-integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H1906-H1913.
66. Morello F, Perino A, Hirsch E. **Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system.** *Cardiovasc Res* 2009; 82: 261-271.
67. Tirziu D, Simons M. **Endothelium-driven myocardial growth or nitric oxide at the crossroads.** *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18: 299-305.
68. Förstermann U, Sessa WC. **Nitric oxide synthases: regulation and function.** *Eur Heart J* 2012; 33: 829-837.
69. Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT. **Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension.** *Free Radical Bio Med* 2012; 52: 1970-1986.
70. Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H. **Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function.** *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 625-632.
71. Darra E, Rungtatscher A, Carcereri de Prati A, Podesser BK, Faggian G, Scarabelli T, Mazzucco A, Hallström S, Suzuki H. **Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation.** *Thromb Haemost* 2010; 104: 200-206.
72. Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV, Gusev NB. **Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning.** *Biochemistry (Mosc)* 1999; 64: 969-985.
73. Layland J, Solaro RJ, Shah AM. **Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation.** *Cardiovasc Res* 2005; 66: 12-21.
74. Solaro RJ, Rosevear P, Kobayashi T. **The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 82-87.
75. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. **Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297: L1013–L1032.

76. Dumas de la Roque E, Savineau JP, Bonnet S. **Dehydroepiandrosterone: a new treatment for vascular remodeling diseases including pulmonary arterial hypertension.** *Pharmacol Therapeut* 2010; 126: 186-199.
77. Shah AS, Atkins BZ, Hata JA, Tai O, Kypson AP, Lilly RE, Koch WJ, Glower DD. **Early effects of right ventricular volume overload on ventricular performance and beta-adrenergic signaling.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120:342-349.
78. Garcia R, Diebold S. **Simple, rapid and effective method of producing aortocaval shunts in the rat.** *Cardiovasc Res* 1990; 24: 430-432.
79. Ocampo C, Ingram P, Ilbawi M, Arcilla R, Gupta M. **Revisiting the surgical creation of volume load by aorto-caval shunt in rats.** *Mol Cell Biochem* 2003; 251:139-143.
80. Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. **Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat.** *J Appl Physiol* 2003; 94:752-763.
81. Nishimura T, Faul JL, Berry GL, Kao PN, Pearl RG. **Effect of a surgical aortocaval fistula on monocrotaline-induced pulmonary hypertension.** *Crit Car Med* 2003; 31: 1213-1218.
82. Van Albada ME, Schoemaker RG, Kemna MS, Cromme-Dijkhuis AH, van Veghel R, Berger RM. **The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2005; 26: 487-493.
83. Zuckerbraun BS, George P, Gladwin MT. **Nitrite in pulmonary arterial hypertension:therapeutic avenues in the setting of dysregulated arginine/nitric oxide synthase signaling.** *Cardiovas Res* 2011; 89:542–552.
84. Liu J, Li C, Waalkes M, Clark J, Myers P, Saavedra J, Keefer L. **The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice.** *Hepatology* 2003; 37: 324–333.
85. Fiorucci S, Antonelli E, Tocchetti P, Morelli A. **Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO donor. A review of its current status.** *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 135–146.
86. Hallström S, Gasser H, Neumayer C, Fügl A, Nanobashvili J, Jakubowski A, Huk I, Schlag G, Malinski T. **S-nitroso human serum albumin treatment reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle via nitric oxide release.** *Circulation* 2002; 105:3032-3038.

87. Semsroth S, Fellner B, Trescher K, Bernecker OY, Kalinowski L, Gasser H, Hallström S, Malinski T, Podesser BK. **S-nitroso human serum albumin attenuates ischemia/reperfusion injury after cardioplegic arrest in isolated rabbit hearts.** *J Heart Lung Transplant* 2005; 24:2226–2234.
88. Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. **Validated High-Performance Liquid Chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples.** *Anal Biochem* 1997; 247: 63-68.
89. Zeng Z, Li Y, Jiang Z, Wang C, Li BB, Jiang W. **The extracellular signal-regulated kinase is involved in the effects of Sildenafil on pulmonary vascular remodeling.** *Cardiovasc Ther* 2010; 28: 23-29.
90. Murray F, MacLean MR, Pyne NJ. **An assessment of the role of the inhibitory gamma subunit of the retinal cyclic GMP phosphodiesterase and its effect on the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in animal and cellular models of pulmonary hypertension.** *Br J Pharmacol* 2003; 138: 1313-1319.
91. Zhang W, Elimban V, Xu YJ, Zhang M, Nijjar MS, Dhalla NS. **Alterations of cardiac ERK1/2 expression and activity due to volume overload were attenuated by the blockade of RAS.** *J Cardiovasc Pharm T* 2010; 15: 84-92.
92. Yano M, Kim S, Izumi Y, Yamanaka S, Iwao H. **Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension.** *Circ Res* 1998; 83: 752-760.
93. Bueno OF, Molkentin JD. **Involvement of extracellular signal-regulated kinases1/2 in cardiac hypertrophy and cell death.** *Circ Res* 2002; 91: 776-781.
94. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ et al. **Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.** *Science* 2001; 292: 624-626.
95. Wang X, Ren B, Liu SY, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. **Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat.** *J Appl Physiol* 2003; 94: 752-763.
96. Wang X, Sentex E, Chapman D, Dhalla NS. **Alterations of adenylyl cyclase and G proteins in aortocaval shunt-induced heart failure.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H118-125.
97. Dent MR, Dhalla NS, Tappia PS. **Phospholipase C gene expression, protein content, and activities in cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; H719-727.

98. Barac YD, Zeevi-Levin N, Yaniv G, Reiter I, Milman F, Shilkrut M et al. **The 1, 4, 5- inositol triphosphate pathway is a key component in Fas-mediated hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes.** *Cardiovasc Res* 2005; 68: 75-86.
99. Yang Y, Nie W, Yuan J, Zhang B, Wang Z, Wu Z, Guo Y. **Genistein activates endothelial nitric oxide synthase in broiler pulmonary arterial endothelial cells by an Akt-dependent mechanism.** *Exp Mol Med* 2010; 42: 768-776.
100. Pei Y, Ma P, Wang X, Zhang W, Zhang X, Zheng P, Yan L, Xu Q, Dai G. **Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism.** *Eur J Pharmacol* 2011; 666: 165-172.
101. D'Uscio LV. **eNOS uncoupling in pulmonary hypertension.** *Cardiovasc Res* 2011; 92: 359-360.
102. Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. **Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities.** *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1713-1765.
103. Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA, Bivalacqua TJ, Mancini EA, Diwan BA et al. **Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability.** *Blood* 2007; 109: 3088-3098.
104. Xu D, Guo H, Xu L, Lu Z, Fassett J, Hu X et al. **Exacerbated pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in animals with loss of function extracellular superoxide dismutase.** *Hypertension* 2011; 58: 303-309.
105. Jerkic M, Kabir MG, Davies A, Yu LX, McIntyre BA, Husain NW et al., **Pulmonary hypertension in adult *Alk1* heterozygous mice due to oxidative stress.** *Cardiovasc Res* 2011; 92: 375-384.
106. Zhao YY, Zhao YD, Mirza MK, Huang JH, Potula HH, Vogel SM et al. **Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration.** *J Clin Invest* 2009; 119: 2009-2018.
107. Balligand JL. **Regulation of cardiac beta-adrenergic response by nitric oxide.** *Cardiovasc Res* 1999; 43: 607-620.
108. Gealekman O, Abassi Z, Rubinstein I, Winaver J, Binah O. **Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and  $\beta$ -adrenergic**

- hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure.** *Circulation* 2002; 105: 236-243.
109. Thoenes M, Forstermann U, Tracey WR et al. **Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart.** *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 165-169.
110. Stein B, Eschenhagen T, Rudiger J et al. **Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1179-1186.
111. Drexler H, Kastner S, Strobel A et al. **Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart.** *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 955-963.
112. De Belder AJ, Radomski MW, Why HJ et al. **Nitric oxide synthase activities in human myocardium.** *Lancet* 1993; 341: 84-85.
113. Hare JM, Givertz MM, Creager MA et al. **Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure: potentiation of beta-adrenergic inotropic responsiveness.** *Circulation* 1998; 97: 161-166.
114. Yamamoto S, Tsutsui H, Tagawa H et al. **Role of myocyte nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness in heart failure.** *Circulation* 1997; 95: 1111-1114.
115. Harding SE, Davies CH, Money-Kyrle AM et al. **An inhibitor of nitric oxide synthase does not increase contraction or beta-adrenoceptor sensitivity of ventricular myocytes from failing human heart.** *Cardiovasc Res* 1998; 40: 523-529.
116. Abassi ZA, Gurbanov K, Mulroney SE et al. **Impaired nitric oxide-mediated renal vasodilation in rats with experimental heart failure: role of angiotensin II.** *Circulation*. 1997; 96: 3655-3664.
117. Khadour FH, O'Brien DW, Fu Y et al. **Endothelial nitric oxide synthase increases in left atria of dogs with pacing-induced heart failure.** *Am J Physiol* 1998; 275: H1971-1978.
118. Behr TM, Wang X, Aiyar N et al. **Monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated in rats with volume-overload congestive heart failure.** *Circulation* 2000; 102: 1315-1322.

119. Sam F, Sawyer DB, Xie Z, et al. **Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction.** *Circ Res* 2001; 89: 351-356.
120. Feng Q, Lu X, Jones DL et al. **Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice.** *Circulation* 2001; 104: 700-704.
121. Solaro RJ, Rarick HM. **Troponin and tropomyosin. Proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments.** *Circ Res* 1998; 83: 471–480.
122. Han YS, Tveita T, Prakash YS, Sieck GC. **Mechanisms underlying hypothermia-induced cardiac contractile dysfunction** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H890–H897.
123. Chen F, Ogut O. **Decline of contractility during ischemia-reperfusion injury: actin glutathionylation and its effect on allosteric interaction with tropomyosin.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C719–C727.
124. Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V. **Phosphorylation-dependent alteration in myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart.** *Am J Respir Crit Med* 2000; 163: 362–367.
125. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ. **Increased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins.** *Cardiovasc Res* 2003; 57: 37–47.
126. Solaro RJ, de Tombe PP. **Review focus series: sarcomeric proteins as key elements in integrated control of cardiac function.** *Cardiovasc Res* 2008; 77:616–618.
127. Solaro RJ, Rosevear P, Kobayashi T. **The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 25: 82–87.
128. van Bilsen M, Smeets PJH, Gilde AJ, van der Vusse GJ. **Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome?** *Cardiovasc Res* 2004; 61: 218–226.

129. Kalsi KK, Smolenski RT, Pritchard RD, Khaghani A, Seymour AM, Yacoub MH. **Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy.** *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 469–77.
130. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. **Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction.** *Circ Res* 2001; 88:529–35.
131. El Alaoui-Talibi Z, Landormy S, Loireau A, Moravec J. **Fatty acid oxidation and mechanical performance of volume-overloaded rat hearts.** *Am J Physiol* 1992; 262:H1068–1074.
132. Saavedra WF, Paolocci N, St. John ME, et al. **Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart.** *Circ Res* 2002; 90:297–304.
133. Hallström S, Franz M, Gasser H, Vodrazka M, Semsroth S, Losert UM, Haisjackl M, Podesser BK, Malinski T. **S-nitroso human serum albumin reduces ischaemia/reperfusion injury in the pig heart after unprotected warm ischaemia.** *Cardiovasc Res.* 2008; 77: 506-514.
134. Albakri QA, Stuehr DJ. **Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability.** *J Biol Chem* 1996; 271: 5414–5421.
135. Mühl H, Pfeilschifter J. **Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1b-stimulated rat mesangial cells.** *J Clin Invest* 1995; 95: 1941–1946.
136. Pérez-Sala D, Cernuda-Morollón E, Díaz-Cazorla M, Rodríguez-Pascual F, Lamas S. **Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F466–F473.
137. Díaz-Cazorla M, Pérez-Sala D, Lamas S. **Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells.** *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 943–952.
138. Jakubowski A, Maksimovich N, Olszanecki R, Gebicka A, Gasser H, Podesser BK, Hallström S, Chlopicki S. **S-nitroso human serum albumin given after LPS challenge reduces acute lung injury and prolongs survival in a rat model of endotoxemia.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2009; 379: 281–290.



