

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 20083EWHYR

Coordinatore Scientifico	Sandro BETOCCHI
Ateneo	Università degli Studi di NAPOLI "Federico II"
Titolo della Ricerca	Progressione verso la disfunzione sistolica ventricolare e lo scompenso cardiaco nella cardiomiopatia ipertrofica: meccanismi molecolari e predittori clinici
Finanziamento assegnato	Euro 112.440
Durata	24 Mesi

Obiettivo della Ricerca (come da progetto presentato)

Questo progetto continua e sviluppa ulteriormente un precedente progetto PRIN, presentato e finanziato nel 2006: quel progetto si concentrava sul rischio aritmico (valutato mediante lo studio dei canali ionici), e sull'evoluzione verso la forma dilatativa della cardiomiopatia ipertrofica (CMI). In questo nuovo progetto le 2 Unità di Firenze si sono unite in un'unica Unità. Nel progetto precedente, le Unità avevano lavorato in cooperazione, e i risultati sono stati pubblicati su riviste internazionali, totalizzando un Impact Factor superiore a 90. Inoltre le Unità hanno scritto 2 capitoli di libri.

Scopo di questo nuovo progetto di ricerca è investigare la relazione tra eziologia e patogenesi e della più temuta manifestazione clinica della CMI: la cosiddetta forma end-stage (ES).

Mentre la morte improvvisa, altra pericolosa complicanza della CMI, può essere prevenuta impiantando un defibrillatore (nonostante si stiano ancor identificando i migliori candidati tra i pazienti che necessitano di tale trattamento), per la CMI ES il solo trattamento risolutivo è il trapianto cardiaco, oltre alla terapia medica per il trattamento dei sintomi dello scompenso. Recentemente, il pacing bi-ventricolare è stato suggerito come opzione terapeutica a breve termine in una piccola coorte, ma tale strategia necessita di una validazione in una popolazione più ampia e a più lungo termine.

La CMI è la malattia genetica cardiaca più comune, con una prevalenza stimata di 1/500. La CMI ES, al contrario, è una rara complicanza della malattia, con una prevalenza di circa il 5%. Quindi la prevalenza della CMI ES dovrebbe essere di 1/10000, e tale numero richiede un approccio multicentrico. Vista la complessa eziologia e patogenesi della CMI (è causata da mutazioni di geni codificanti proteine sarcomeriche, ma può anche essere simulata da altre patologie del muscolo cardiaco o periferico), per ottenere dei risultati è necessario un approccio multidisciplinare. Questo progetto, benché si affidi per lo più a cardiologi, ha bisogno della collaborazione di fisiologi, biologi molecolari, genetisti, ed esperti di diagnostica per immagini.

Studieremo la fisiopatologia della CMI in modelli in vitro, così come nei pazienti. È interessante il fatto che secondo l'ipotesi oggi più accreditata, l'incorporazione di una proteina sarcomerica mutata conduca a diminuita contrattilità miocitaria. In contrasto, studi precedenti non hanno mostrato riduzione nella tensione sviluppata da miofibrille isolate contenenti proteine mutate. Svilupperemo studi in vitro su miofibrille da pazienti CMI, e su modelli murini transgenici di CMI, per valutare i cambiamenti meccanici e biochimici nei sarcomeri CMI in relazione a geni, età e stadio della malattia. La nostra ipotesi è che le mutazioni delle proteine sarcomeriche, oltre ad essere responsabili delle alterazioni funzionali che portano al fenotipo CMI, possano scatenare e sostenere il rimodellamento maladattativo responsabile della progressione verso la disfunzione sistolica.

Nei pazienti, testeremo 2 ipotesi per spiegare il motivo per cui talvolta la CMI evolve verso l'ES: l'ipotesi genetica e quella ischemica.

L'ipotesi genetica si basa sull'osservazione che la CMI ES è meno rara in alcune famiglie rispetto alla popolazione generale con CMI. Dall'Unità di Firenze sono stati osservati genotipi complessi che sono associati con disfunzione sistolica, dilatazione della cavità, e sintomi di scompenso. Quindi, i pazienti con CMI saranno studiati per valutare la prevalenza della progressione verso la ES, alla luce dei biomarkers della progressione della malattia e della correlazione con gli endpoints clinici. La prevalenza gene-specifica del decorso clinico e della disfunzione sistolica e diastolica sarà valutata comparando le mutazioni della catena pesante della β -miosina, Myosin-Binding Protein C, Troponina ed eventuali genotipi complessi. Saranno studiati anche altri geni responsabili di Cardiomiopatia Dilatativa. Infine si cercheranno altri geni che simulano la CMI (le cosiddette fenocopie) in pazienti ES.

Inoltre si valuterà l'ipotesi che ripetuti episodi di ischemia/riperfusionne portano allo sviluppo di CMI ES studiando l'equilibrio REDOX tramite numerosi marcatori di stress ossidativo da plasma e da cellule mononucleate di pazienti. Questo nuovo approccio consentirà lo studio dell'ischemia in CMI, che è problematico con altre tecniche. I risultati si compareranno tra 3 differenti gruppi di soggetti: 2 gruppi di controllo (soggetti normali e pazienti CMI con normale funzione sistolica) e un gruppo di pazienti con CMI ES.

La complessità di questo progetto di ricerca potrà aiutarci ad identificare le caratteristiche e i meccanismi dell'evoluzione verso la ES CMI.

Stato dell'arte nel campo (come da progetto presentato)

La cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è caratterizzata dalla presenza di ipertrofia ventricolare sinistra (VS), tipicamente asimmetrica, in assenza di malattia sistemica o altra cardiopatia (1). CMI è la più frequente cardiomiopatia primitiva su base genetica con una prevalenza di 1 su 500 nella popolazione generale. La presentazione clinica e la storia naturale sono particolarmente eterogenee, variando da forme benigne e asintomatiche a manifestazioni maligne, quale la morte improvvisa e prematura nei giovani. Un piccolo ma rilevante sottogruppo di pazienti sviluppa disfunzione sistolica VS e scompenso cardiaco severo, di solito associato ad assottigliamento parietale e a dilatazione della cavità VS. Ciò accade in circa il 5% dei pazienti; questa condizione è stata chiamata CMI end-stage (ES). La diagnosi si basa sull'evidenza inspiegata di un ventricolo sinistro ipertrofico e non dilatato; quando la CMI evolve nella sua forma dilatativa, la diagnosi è spesso solo possibile in presenza di pregressa evidenza di ipertrofia e piccolo volume di camera.

Il sottogruppo di CMI ES è eterogeneo ed è stato fino ad oggi poco caratterizzato. La CMI ES ha diverse espressioni cliniche, con un eterogeneo rimodellamento, frequente fibrillazione atriale, e alterata funzione VS che precede la dilatazione, l'assottigliamento parietale e i sintomi di scompenso cardiaco. L'ES è una complicanza sfavorevole con una mortalità dell'11%/anno ed è fattore di rischio per morte improvvisa. Le opzioni terapeutiche sono limitate al trattamento dello scompenso cardiaco ed al trapianto cardiaco (2).

Dal punto di vista eziopatogenetico la cardiomiopatia ipertrofica è considerata una malattia del sarcomero caratterizzata da un'ampia variabilità genetica e studi recenti hanno evidenziato come il meccanismo finale sia da attribuire ad un deficit energetico cellulare (14). Fino ad oggi sono state identificate più di 450 mutazioni relative a 20 geni. I 4 geni più frequentemente coinvolti sono quelli codificanti la catena pesante della β -miosina (MYH7), la proteina C legante la miosina (MYBPC3), la troponina T (TNNT2) ed I (TNNI3). Gli altri geni target di mutazioni patogene comprendono l' α -tropomiosina (TPM1), le catene leggere essenziali e regolatrici della β -miosina (MYL2 e MYL3), la titina (TTN), l' α -actina cardiaca (ACTC), la catena pesante dell' α -miosina (MYH6), la troponina C (TNNC1), la telethonina (TCAP) e la proteina LIM (CSR3P3) (3).

Quali siano i meccanismi alla base del profilo clinico di CMI ES non è noto. L'ipotesi corrente è che in CMI l'ipertrofia è compensatoria all'ipocontrattilità delle proteine sarcomeriche mutate, stimolo potente per la crescita ed il rimodellamento cardiaci. Lo stress cellulare è aumentato, da cui l'espressione dei fattori mitotici e

trofici sensibili allo stress quali l'insulin-like growth factor I (IGF-1), il transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) e l'angiotensina II, risulta up-regolata (4). Sono state proposte numerose ipotesi circa l'evoluzione verso lo scompenso sistolico in CMI; esse non sono mutualmente esclusive, dal momento che diversi meccanismi possono determinare l'evoluzione in differenti pazienti, oppure concorrere nello stesso paziente. Fattori genetici possono essere rilevanti in ES CMI, perchè essa è più comune in alcune famiglie rispetto alla popolazione generale con CMI. Da notare come mutazioni in geni che codificano alcune proteine sarcomeriche (la catena pesante della β miosina, la troponina T, la proteina C legante la miosina, la titina, il fosfolambano, e l' α tropomiosina) siano comuni sia a forme di cardiomiopatia ipertrofica che dilatativa, il che suggerisce una comune convergenza finale di questi 2 fenotipi (3). Sebbene non vi sia relazione genetica tra cardiomiopatia dilatativa e CMI che dilata, è probabile che alcune mutazioni impongono uno stress maggiore ai cardiomiociti e stimolano l'apoptosi. Genotipi complessi, come quelli con più di una mutazione di proteine sarcomeriche, sviluppano CMI ES con maggiore prevalenza. Anche se non c'è un singolo gene responsabile di CMI ES, il gene MYBPC3 sembra più spesso coinvolto.

L'ischemia ha probabilmente un ruolo rilevante, dal momento che le arterie coronarie intramurali sono caratterizzate da ispessimento della media e possono essere considerate come una forma di malattia del microcircolo. Queste alterazioni di architettura e il mismatch tra massa miocardica e circolazione coronaria sono presumibilmente responsabili della ridotta riserva coronaria e dell'ischemia miocardica seguita da ripercussione, seguita da morte cellulare e cicatrizzazione. Detta cicatrice può servire come substrato per la morte improvvisa oppure, se il fenomeno è sufficientemente esteso, per lo scompenso cardiaco. L'ischemia/riperfusionne conduce allo stress ossidativo, che è stato valutato nella fisiopatologia della ipertrofia e dello scompenso cardiaco. Nel miocardio umano, i livelli NADPH sono più alti nello scompenso cardiaco (5). Nei soggetti ipertesi, il sistema del glutatione, ma non quello del sistema della tioredossina, è alterato, con più bassi livelli di GSH con aumento parallelo dei markers di stress ossidativi. L'ischemia miocardica inibisce la catena respiratoria mitocondriale, il che genera Reactive Oxygen Species (ROS). Si ritiene che bassi livelli di ROS giochino un ruolo nel normale signaling cardiaco, nell'adattamento durante la crescita e nelle variazioni della matrice. Più alti livelli attivano il rimodellamento fisiopatologico, l'apoptosi e la disfunzione di camera. La produzione di ROS è aumentata da stimoli come l'angiotensina II, TNF- α , fattori di crescita e di carico. L'aumento della produzione di ROS è implicato nella ipertrofia cardiomiocitaria in vitro e nella fisiopatologia della ipertrofia ventricolare e dello scompenso cardiaco in vivo in differenti modelli sperimentali tra cui un modello di CMI da mutazioni di cTnT. I ROS modulano la proliferazione fibroblastica e la sintesi del collagene (6). Inoltre, proteine chiave coinvolte nella eccitazione-contrazione miocardica, come i canali ionici, i canali che rilasciano Ca⁺⁺ del reticolo sarcoplasmatico (RyR2) e le proteine dei miofilamenti, possono portare ad alterazioni nella attività dipendenti da REDOX.

Bibliografia essenziale.

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classifications of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006; 113:1807-1816.
2. Harris KM, Spirito P, Maron MS, Zenovich AG, Formisano F, Lesser JR, Mackey-Bojack S, Manning WJ, Udelson JE, Maron BJ. Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2006;114:216-25.
3. Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49:1251-64.
4. Marian AJ and Roberts R. The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:655-70
5. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel J-L, Hasenfuss G, Shah AM. Increased Myocardial NADPH Oxidase Activity in Human Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2164-71
6. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-30.

Criteri di verificabilità (come da progetto presentato)

Il prodotto di questo tipo di progetto di ricerca è costituito da pubblicazioni su riviste scientifiche di settore. La produttività scientifica (valutata in termini di Impact Factor) costituisce il principale metro di valutazione del nostro programma.

CRITERI DI VERIFICABILITÀ SCIENTIFICA

Dopo il primo anno del programma, risultati preliminari saranno presentati a congressi internazionali. Alla fine del periodo di durata del programma l'efficacia sarà valutata in base al numero ed alla qualità dei lavori pubblicati o sottoposti per pubblicazione.

CRITERI DI VERIFICABILITÀ TEMPORALE

La distribuzione temporale di alcune fasi del protocollo non è prevedibile. In particolare, la parte di protocollo che prevede l'impiego di tessuto miocardico umano è esposto alla occasionalità di reperimento dei materiali. Il reclutamento di pazienti non prevede alcuna difficoltà, poiché le Unità dispongono di ambulatori dedicati allo studio della cardiomiopatia ipertrofica, ognuno con un ampio database di pazienti. Le metodiche per le parti dello studio (imaging di risonanza magnetica, ecocardiografia, ergospirometria, sequenziamento del DNA per identificazione di mutazioni, studio meccanico e biochimico di miofibrille private di membrana e isolate etc.) sono già implementate presso le Unità. Dopo i primi 18 mesi, gran parte dei risultati dovranno esser acquisiti; il completamento dell'intero programma è prevedibile entro i 2 anni. La struttura del programma di ricerca rende molto probabile il rispetto della sua durata totale.

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità	Università degli Studi di NAPOLI "Federico II"
Responsabile Scientifico	Sandro BETOCCHI
Finanziamento assegnato	Euro 20.460

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

L'ipotesi alla base di questo progetto è che la forma "end-stage" (ES) della cardiomiopatia ipertrofica (CMI) sia la conseguenza di ripetuti attacchi di ischemia/riperfusionne: è noto che il conseguente rilascio di radicali liberi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) riduce la contrattilità miocardica e conduce successivamente alla disfunzione sistolica cronica ed alla dilatazione della cavità ventricolare sinistra. Questo meccanismo è stato ampiamente studiato in pazienti con malattia coronarica, ma è speculativo in CMI.

Lo scopo della nostra Unità è di valutare l'impatto dello stress ossidativo e dello stato REDOX sulle caratteristiche cliniche ed anatomiche della CMI, e di correlare questi dati con segni clinici di ischemia e di iniziale riduzione della funzione sistolica.

Selezione della popolazione da studiare:

La CMI è una cardiopatia genetica relativamente diffusa, con una prevalenza (stimata) di 1/500. Il nostro ambulatorio, dedicato esclusivamente allo studio della CMI ed attivo da 20 anni, conta su un database di oltre 300 pazienti; di conseguenza non ci sarebbero problemi ad arruolare anche un gran numero di pazienti con CMI.

La CMI ES, invece, è rara, colpendo approssimativamente il 5% dei pazienti con CMI: l'arruolamento di un numero sufficiente di paziente sarebbe dunque problematico se non impossibile in un singolo centro, tuttavia la stretta collaborazione, datante oltre 10 anni, con le Unità di Padova e di Firenze consente una ragionevole certezza di arruolare un numero complessivo di 50 pazienti con CMI ES.

Sebbene non via sia un'età particolarmente colpita dalla forma ES, limiteremo il nostro arruolamento a pazienti maggiori di 18 anni, questo perché il protocollo

prevede l'uso di mezzo di contrasto in risonanza magnetica, e riteniamo sia opportuno ottenere il consenso informato dagli stessi pazienti che devono dunque essere maggiorenni.

Verranno arruolati solo pazienti con evidenza di non inducibilità di ischemia alla miocardioscintigrafia, o con rischio stimato di malattia cardiovascolare a 10 anni <10%. Tramite anamnesi ed esame obiettivo escluderemo gravidanza, malattie tiroidee, e tutte le condizioni che alterano l'equilibrio REDOX, come tumori, stati infiammatori, malattie ossee e reumatiche, traumi o procedure chirurgiche recenti, malattie epatiche croniche, abuso di alcool, insufficienza renale. Gli stessi criteri di esclusione verranno applicati per la selezione di 50 pazienti con CMI non ES accoppiati per età e sesso alla popolazione ES, e per un gruppo di controllo di 15 volontari sani, anche questi accoppiati per età e sesso al gruppo di studio.

Valutazione clinica:

I sintomi dei pazienti saranno, come di consueto, registrati in un apposito database. L'angina pectoris sarà definita come dolore o senso di peso precordiale di breve durata; in CMI la relazione tra dolore precordiale ed esercizio è elusiva e non stretta come in pazienti con coronaropatia, perciò anche il dolore a riposo sarà considerato in questa categoria. La tolleranza all'esercizio sarà stimata con le classi funzionali NYHA e con sistemi obbiettivi (vedi poi: Esercizio). Al momento della valutazione sarà eseguito un prelievo di sangue per dosaggio di proteina C-reattiva e Troponina I. La valutazione clinica non includerà i soggetti sani del gruppo di controllo.

Valutazione dello stress ossidativo:

Lo stato dello stress ossidativo verrà valutato nel gruppo di controllo e nei 2 gruppi di studio, misurando il rapporto GSSG/GSH nel plasma e nelle cellule mononucleate, così come le molecole prodotte dall'azione dei ROS, come i prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP), le LDL ossidate (OxLDL), la malondialdeide (MDA). Livelli di MDA, GSH, GSSG saranno misurati nel plasma e nelle cellule mononucleate tramite HPLC. I livelli dell'antiossidante endogeno Trx saranno misurati nel plasma mediante un kit ELISA. Un kit ELISA sarà anche usato per le OxLDL nel plasma, mentre gli AOPP saranno misurati mediante analisi spettroscopica di campioni di plasma.

Estrazione di RNA totale e PCR quantitativa:

La risposta allo stress ossidativo cronico sarà valutata misurando i livelli di mRNA dei componenti dei sistemi antiossidanti endogeni del GSH e della Trx in cellule mononucleate. Per la normalizzazione dei campioni si userà come gene di riferimento la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH).

Lo stress ossidativo sarà correlato a parametri clinici, come la presenza di angina pectoris e di sintomi/segni di scompenso cardiaco, e parametri derivati dall'ecocardiografia, dalla tolleranza all'esercizio (con riguardo alla presenza di anomala risposta pressoria), a Imaging di Risonanza Magnetica (IRM).

Le tecniche descritte in seguito saranno usate esclusivamente nei 2 gruppi di pazienti con CMI.

Ecocardiografia:

La cardiomiopatia ipertrofica verrà diagnosticata clinicamente come ipertrofia VS in assenza di cause cardiache o sistemiche capaci di indurla.

Il minimo spessore parietale diagnostico per CMI sarà di 15 mm nella popolazione generale e di 13 mm nell'ambito di screening familiari. Una stima del grado e della estensione dell'ipertrofia verrà ottenuta con lo score di Wigle. Questo metodo attribuisce uno score da 1 a 4 allo spessore settale e addizionali punteggi per l'eventuale estensione al setto medio e/o apicale ed alla parete laterale. Un altro semplice metodo per la stima dell'ipertrofia ventricolare sinistra sarà lo spessore parietale massimo misurato a qualsiasi livello del ventricolo sinistro. A causa del suo limitato arco di tempo il presente progetto di ricerca non include il follow-up dei pazienti; è comunque importante, al fine di classificare i pazienti con CMI ES, stabilire un valore di cut-off per le variazioni nel tempo di spessore delle pareti ventricolari. Variazioni dello spessore settale verranno considerate quando la stessa parete presenta variazioni di spessore di \$IMM_COM_0098\$ 3 mm (setto anteriore e la parete posteriore) di \$IMM_COM_0098\$ 5 mm (parete laterale ed setto posteriore; ciò è dovuto alla peggiore risoluzione spaziale in queste regioni). Il diametro tele-diastolico del ventricolo sinistro sarà misurato con esame M-Mode o esame bidimensionale immediatamente al di sotto della valvola mitrale. La frazione di eiezione VS sarà misurata dalla 4 e dalla 2 camere apicale con il metodo dei dischi. In ciascun paziente, la funzione VS (valutata con la frazione di eiezione) sarà classificata in accordo con l'American Society of Echocardiography, normale >55 %, lievemente depressa da 45 a 54%; moderatamente anormale tra 30 e 44%, e severamente anormale \$IMM_COM_0097\$ 30%.

Poiché la frazione di eiezione VS è tipicamente supernormale in CMI, la fase ES sarà diagnosticata in presenza di una frazione di eiezione \$IMM_COM_0097\$ 55% anche se non vi sarà evidenza di assottigliamento parietale. In pazienti con ridotta frazione di eiezione e assottigliamento della pareti ventricolari, la CMI ES sarà diagnosticata solo in presenza di precedente evidenza dei segni ecocardiografici classici di CMI. Inoltre, poiché un'anomala deformazione regionale valutata con tecnica strain e strain rate è indice di fibrosi miocardica, lo strain radiale verrà misurato a livello del setto anteriore e della parete posteriore a livello mitralico e papillare, mentre lo strain longitudinale verrà valutato a livello del setto posteriore, parete laterale e postero-inferiore a livello basale e medio.

Con l'ecocardiografia, verranno misurati il diametro ed il volume telesistolici dell'atrio sinistro. Una stima della pressione telediastolica VS sarà effettuata misurando la differenza di durata del flusso prodotto dalla contrazione atriale a livello mitralico e a livello di una vena polmonare. Verrà riportato anche il rapporto E/e', dove E è il picco del flusso protodiastolico mitralico a livello mitralico e e' è il picco protodiastolico registrato a livello dell'anulus laterale.

La presenza di ostruzione al tratto di efflusso ventricolare sinistro sarà valutato con SAM e con Doppler continuo, usando cura nel differenziare il flusso del tratto di efflusso da quello prodotto dalla insufficienza mitralica. Il grado di insufficienza mitralica verrà valutato con color Doppler. In pazienti sintomatici senza evidenza di ostruzione a riposo verrà effettuato ecocardiografia durante esercizio per elicitarne eventualmente l'ostruzione che verrà valutata come prima riportato.

Esercizio:

Un esercizio massimale (limitato da sintomi) al treadmill con la misurazione continua dei gas espirati sarà eseguito con il protocollo di Bruce modificato, con cadenza annuale o più volte se indicato.

La pressione sistolica verrà misurata di base, ad 1 minuto di intervallo durante l'esercizio ed ad 1 minuto di intervallo per 5 minuti durante la fase di recupero. Un valore cut-off di 20 mmHg sarà usato per definire due tipi di risposta. Una risposta anomala includerà una risposta ipotensiva ed una risposta piatta. Una risposta ipotensiva sarà definita sia in presenza di un iniziale aumento della pressione sistolica seguita da un decremento >20 mmHg rispetto al picco di pressione sistolica o in presenza di un continuo decremento della pressione sistolica durante tutto l'esercizio >20mmHg. Una risposta piatta sarà definita da un cambio di pressione sistolica durante tutto l'esercizio \$IMM_COM_0097\$ 20 mmHg rispetto alla pressione sistolica a riposo.

IRM:

I pazienti eseguiranno una risonanza magnetica utilizzando una apparecchiatura da 1.5-Tesla equipaggiata con gradienti Master (massima ampiezza di gradiente=30mT/m, massimo slew rate=150mT/m/ms). Le immagini verranno acquisite utilizzando una bobina cardiaca a 5 elementi con sincronizzatore elettrocardiografico (Vector-ECG) e respiratorio. Dopo una scansione di centratura e una di riferimento verranno eseguite sequenze bidimensionali utili per decidere dove localizzare i piani di scansione da utilizzare per le acquisizioni Cine-RM. I piani di scansione utilizzati per lo studio del cuore sono: asse lungo a 2 camere (atrio-ventricolare) e 4 camere; asse corto biventricolare. Successivamente verrà acquisito un pacchetto volumetrico multislice-multiphase comprendente il ventricolo sinistro diviso in 8-9 strati (spessore: 10 mm) posizionati sull'asse corto biventricolare, dall'apice alla base. Le sequenze utilizzate sono delle gradient echo ultraveloci di tipo Balanced (B-FFE) caratterizzate da segnale iperintenso del sangue con un ottimale contrasto parete ventricolare-sangue. Tali sequenze devono essere effettuate in apnea respiratoria (breath-hold) con un tempo di acquisizione di circa 18-20 secondi per singolo strato.

Verranno successivamente eseguite delle sequenze T1-FLASH-snapshot-inversion recovery durante somministrazione endovenosa in bolo di mezzo di contrasto paramagnetico (Gd-DTPA, 0.2 mmol/Kg). Tale sequenza sarà acquisita utilizzando come piano di riferimento un asse lungo a 4 camere. A 15'-20' dalla somministrazione del mezzo di contrasto verrà infine acquisita una sequenza T1-Turbo Field Echo per la valutazione della iperintensità tardiva di segnale come espressione della fibrosi miocardica. Per la valutazione del segnale di iperintensità tardiva, la presenza del tipo di segnale "diffuso" (corrispondente a fibrosi interstiziale) sarà misurata in ogni fetta nelle aree la cui densità superi quella del background (cavità) di almeno 2 e meno di 6 deviazioni standard; analogamente il tipo confluyente sarà misurato nelle aree la cui densità media ecceda quella del background + >6 deviazioni standard.

Per la quantizzazione della massa ventricolare verranno tracciati i bordi endocardico ed epicardico nei frames telediastolico e telesistolico di tutte le sezioni in asse corto. Conoscendo lo spessore della sezione è possibile calcolare il volume occupato dal muscolo cardiaco in una sezione sottraendo al volume totale (epicardico) il volume endocardico; sommando i volumi così ottenuti si misurerà il volume muscolare ventricolare sinistro. Per il calcolo della massa in grammi basterà moltiplicare il volume ottenuto x 1.05 (densità del muscolo cardiaco). Anche i muscoli papillari saranno inclusi nella misurazione della massa. La massa verrà indicizzata per la superficie corporea.

Collaborazione con le altre Unità:

Le Unità di Padova e Firenze seguiranno simili protocolli nei loro pazienti. Queste Unità ci invieranno i dati clinici e strumentali dei loro pazienti e campioni di sangue per gli scopi specifici del nostro progetto. Noi metteremo in comune con le altre 2 Unità i dati clinici, anatomici e funzionali, ed invieremo il DNA dei nostri pazienti all'Unità di Padova per gli scopi del loro progetto.

La nostra aspettativa è di poter interpretare, al termine del progetto, le differenze (sempre che ve ne siano) tra CMI ES, CMI e controlli sotto il profilo dello stato REDOX, e di correlare questi dati con indicatori anatomici e funzionali di evoluzione verso la forma ES: assottigliamento di parete, dilatazione VS, riduzione della funzione sistolica, tolleranza all'esercizio e presenza e tipo di fibrosi VS.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di PADOVA
Responsabile Scientifico	Paola MELACINI
Finanziamento assegnato	Euro 26.880

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

In questa ricerca ci proponiamo di analizzare un'ampia popolazione di pazienti affetti da CMI consecutivamente studiati e seguiti con un follow-up a lungo termine (dal 1980 ad ora) presso le Cliniche Cardiologiche di Padova, Firenze e Napoli, che hanno presentato una insufficienza cardiaca progressiva e severa caratterizzata da classe NYHA III-IV, morte per scompenso o trapianto cardiaco.

Pazienti con forme sporadiche o con forme familiari di CMI ed evoluzione verso lo scompenso e/o la morte o il trapianto cardiaco verranno genotipizzati:

1) con metodica tradizionale di sequenziamento genico per la ricerca di mutazioni patogene nei 4 geni (MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3) più frequentemente coinvolti nella malattia;

2) in un sottogruppo selezionato, con tecnica di DNA resequencing array per ricerca di mutazioni in 12 geni (MYH7, MYBPC3, MYL3, MYL2, TNNT2, TNNI3, TNNC1, TPM1, ACTC, CSRP, PLN, PRKAG2);

3) qualora non sia stata trovata alcuna mutazione nei geni sopraelencati verranno studiati nuovi geni che attualmente sono noti causare cardiomiopia dilatativa;

4) nei pazienti con ereditarietà X-linked dominante e segni enzimatici di CPK elevate (compromissione del muscolo scheletrico) verrà analizzato anche il gene LAMP2.

I pazienti genotipizzati verranno inoltre sottoposti a metodiche cardiologiche non invasive (Eco-color-Doppler con TDI, Ecocardiogramma da sforzo con l'identificazione del gradiente da sforzo e a test cardio-polmonare con consumo di O2 massimo) per l'analisi morfologico-funzionale.

Tali pazienti verranno inoltre studiati con metodi diagnostici non invasivi quali risonanza magnetica cardiaca con e senza mezzo di contrasto per ricercare segni di ischemica acuta e cronica (edema, first-pass e late-enhancement) nel tentativo di una caratterizzazione tissutale in vivo (ricerca di fibrosi sostitutiva, interstiziale ed edema). In particolare, durante il follow-up, verranno rivalutati i pazienti con lo stesso metodo onde diagnosticare precocemente i determinanti dell'evoluzione di malattia.

Contemporaneamente, verrà eseguito un prelievo ematico per il dosaggio dell'NT pro-BNP, del collagene, della troponina I e T, della PCR altamente sensibile, dell'IMA (ischemia modified albumin) e dell'endotelina.

Inoltre saranno analizzati reperti macroscopici e microscopici provenienti dai pazienti trapiantati o morti per scompenso per definire anche dal punto di vista patologico i diversi quadri evolutivi. In particolare all'esame macroscopico ed istologico post-mortem o dei cuori espantati verranno analizzate necrosi, apoptosi, fibrosi sostitutiva ed interstiziale, presenza di ponti muscolari, coronaropatia epicardica e questi reperti verranno correlati con i dati ottenuti in vivo.

L'end-point di tale ricerca è definire il profilo clinico-patologico di pazienti con CMI eziologicamente caratterizzati che evolvono verso lo scompenso cardiaco, la morte per scompenso o il trapianto cardiaco cercando di correlare il fenotipo clinico con il genotipo.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di FIRENZE
Responsabile Scientifico	Franco CECCHI
Finanziamento assegnato	Euro 65.100

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Basandosi su una stretta interazione fra clinici e scienziati di base, proponiamo un modello di approccio multidisciplinare per caratterizzare l'espressione clinica e molecolare della progressione di malattia nella CMI, e nei familiari genotipizzati, in relazione alle specifiche basi genetiche. Gli obiettivi specifici del progetto sono sintetizzati di seguito:

A- Andamento nel tempo, basato su dati retrospettivi (dal nostro database contenente oltre 900 pz), e predittori di progressione clinica, in 3 gruppi di pazienti con CMI: 1. con ostruzione all'efflusso e/o rigurgito mitralico significativo 2. assenza di ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro e/o rigurgito mitralico significativo 3. genotipizzati senza espressione fenotipica della CMI

A1- Valutazione dello stadio di malattia attraverso la valutazione clinica, incluso ECG quantitativa, Ecocardiografia basale e da sforzo per le misurazioni standard incluso la funzione diastolica (TDI ECHODoppler) e l'ostruzione inducibile dallo sforzo, monitoraggio ECG secondo Holter per le aritmie, test cardiorespiratorio per la valutazione del VO2 max, e, nei pazienti molto limitati, "6 minutes walking test"

A2- Prevalenza dei pazienti con progressione di malattia, caratterizzata da incremento della limitazione funzionale, disfunzione sistolica e diastolica, rimodellamento atriale e ventricolare sinistro

A3- Prevalenza dei pazienti nella fase "end-stage"

A4- Valutazione dei biomarkers di progressione di malattia (peptici natriuretici atriali, sottoprodotti del collagene, PCR, Troponina, CK, TGF-Beta1, TNF) e correlazione con gli endpoint di decorso clinico, incluso la progressione di malattia

A5- Prevalenza gene specifica di andamento clinico e disfunzione sistolica e diastolica e confronto fra genotipo MYH7, MYPC3, TROPONINA I e T e genotipi complessi

A6- Studi di risonanza magnetica cardiaca con mezzo di contrasto per la valutazione qualitativa e quantitativa delle aree di "delayed enhancement" e loro correlazione con la valutazione mediante tomografia ad emissione di positroni (PET) del flusso massimale iperemico indotto da Dipiridamolo, per predire la progressione di malattia

A7- Importanza del rimodellamento atriale e della fibrillazione atriale come marker e causa di progressione di malattia

B- Modificazioni meccaniche e biochimiche nel sarcomero CMI: relazione con il tipo di gene mutato, le caratteristiche cliniche e l'età del paziente.

B1- Studi meccanici su miofibrille isolate da pazienti affetti da CMI con mutazioni di MYBPC3 e MYH7.

B2- Modificazioni dell'espressione e della fosforilazione delle proteine sarcomeriche

B3- Studi in modelli animali di CMI da mutazioni del gene CMYBPC3: topi knock-out e knock-in.

Scopo B1- Studi meccanici su miofibrille isolate da pazienti affetti da CMI con mutazioni di MYBPC3 e MYH7.

Trabecole e cellule cardiache 'demembrate' sono i modelli sperimentali solitamente impiegati per misurare le modificazioni meccaniche prodotte da alterazioni delle proteine del sarcomero cardiaco. L'impiego di singole miofibrille, preparati che possono essere isolati in grande quantità anche da piccole biopsie cardiache umane fresche o congelate (18-19), rappresenta un progresso significativo nella possibilità di ottenere misure dirette della prestazione meccanica del sarcomero cardiaco umano. Le miofibrille isolate rappresentano l'unità elementare dell'apparato contrattile del muscolo cardiaco in cui si mantengono intatti l'organizzazione del lattice dei miofilamenti e l'assemblaggio di tutte le proteine sarcomeriche. Come modello per esperimenti meccanici, la miofibrilla presenta importanti vantaggi rispetto ai tradizionali preparati di dimensioni maggiori. Grazie alle loro piccole dimensioni (>1 micrometro di diametro), le miofibrille si equilibrano con la soluzione in cui sono immerse in meno di 1ms e con questo tipo di preparati si possono impiegare tecniche di cambio rapido della soluzione di perfusione (i) per produrre variazioni istantanee della concentrazione del Ca²⁺ e analizzare la cinetica di attivazione e di rilascio della forza contrattile, oppure (ii) variare altrettanto velocemente la concentrazione di substrato (MgATP) e prodotti (Pi e MgADP) dell'ATPasi acto-miosinica per studiare specifiche tappe del ciclo meccanico del cross-bridge.

Con questo approccio sperimentale, ampiamente utilizzato nel nostro laboratorio, è stato possibile iniziare a valutare, direttamente nei sarcomeri cardiaci di pazienti affetti da CMI, l'impatto funzionale di mutazioni dei geni più frequentemente responsabili della malattia (MYH7 e MYBPC3) (20). Attualmente abbiamo raccolto campioni congelati da diversi pazienti CMI (6 portatori di mutazioni di MYH7 e 9 di MYBPC3) sottoposti a miectomia settale o trapianto cardiaco e ci aspettiamo, nei prossimi due anni, di raddoppiare questi numeri. Ci proponiamo di estendere il nostro studio confrontando le proprietà meccaniche di miofibrille cardiache (atriali e ventricolari) isolate da: (i) un numero relativamente ampio di pazienti CMI portatori di diverse mutazioni (MYH7 vs. MYBPC3 vs. genotipi complessi) di diversa età e stadio clinico della malattia; (ii) da pazienti affetti da ipertrofia secondaria; (iii) da pazienti con scompenso cardiaco; (iv) da pazienti di controllo non-ipertrofici, non-scompenati (donatori, stenosi mitraliche). Miofibrille isolate da ciascun campione verranno impiegate per misurare:

- la sensibilità al Ca²⁺ dei miofilamenti. La relazione pCa-tensione verrà costruita attivando la miofibrilla a concentrazioni massimali e sotto-massimali di Ca²⁺. In diversi modelli sperimentali di CMI è stata riportata un aumento della sensibilità dei miofilamenti al Ca²⁺. Questa alterazione, oltre a produrre effetti negativi sulla funzione diastolica e sull'energetica del cuore, potrebbe contribuire al remodeling elettrico del miocita cardiaco e all'aumentato rischio di aritmie (25) e rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico.

- Cinetica della generazione di forza e cinetica dei cross bridges. Allo scopo di evidenziare alterazioni di tappe specifiche dell'interazione acto-miosinica, verranno misurate: la velocità di sviluppo della forza della miofibrilla in risposta ad una rapida Ca²⁺-attivazione, la velocità di risviluppo della forza in risposta a rapide perturbazioni meccaniche, le risposte di forza del preparato in seguito a variazioni stazionarie o improvvise della concentrazione di substrato (MgATP) e prodotti (Pi e MgADP) dell'ATPasi acto-miosinica.

- Cinetica del rilascio. La cinetica del rilascio ventricolare è limitata da processi dinamici intrinseci sia ai sarcomeri cardiaci sia ai sistemi di trasporto del Ca²⁺ ancorati alla membrana cellulare e del reticolo sarcoplasmatico. Alterazioni della funzione del sarcomero causate dalle mutazioni responsabili di CMI possono direttamente produrre disfunzione diastolica. La tecnica di cambio rapido della soluzione di perfusione in miofibrille consente di dissezionare i determinanti sarcomerici del rilascio cardiaco da quelli coinvolti nel trasporto del Ca²⁺.

- Tensione passiva. Per valutare l'elasticità passiva delle miofibrille cardiache, che rappresenta una componente significativa della stiffness diastolica complessiva del ventricolo e risulta alterata in diverse cardiomiopatie, verranno misurate le relazioni tensione passiva-lunghezza del sarcomero.

Scopo B2- Modificazioni dell'espressione e della fosforilazione delle proteine sarcomeriche

Allo studio delle proprietà meccaniche delle miofibrille descritte in B1 verrà associata un'analisi delle proteine sarcomeriche eseguita sugli stessi campioni di miocardio usati per la preparazione delle miofibrille.

Il livello di espressione della proteina mutata nei pazienti CMI, nonostante rappresenti un fattore importante di alterazione della funzione del sarcomero, è di solito ignoto. Anche l'espressione di altre proteine sarcomeriche può essere modificata nella CMI come risposta secondaria alla malattia e/o alla sua progressione. Altro fattore sarcomerico, che può modificare la prestazione contrattile e che risulta spesso alterato nelle patologie cardiache (26-29), è rappresentato dal grado di fosforilazione delle proteine dei miofilamenti ad opera, soprattutto, della protein chinasi A attivata dalla stimolazione β -adrenergica. E' probabile che nelle cardiomiopatie alterazioni dell'equilibrio tra chinasi e fosfatasi possano modificare la funzione del sarcomero. E' probabile che alterazioni specifiche del pattern di fosforilazioni della troponina I, troponina T, cMyBP-C e della catena leggera di tipo 2 della miosina si associno ai fenotipi di diverse patologie cardiache. Questo tipo di informazione può essere molto importante sia per caratterizzare i diversi fenotipi, sia per comprendere le differenze funzionali tra fenotipi diversi. L'analisi delle proteine sarcomeriche nei diversi gruppi di campioni elencati in B1 verrà condotta in collaborazione con ricercatori del VUMC, Amsterdam (J. van der Velden & G. Stienen), dell'Imperial College, Londra (S. Marston) e dell'Università di Amburgo (L. Carrier) che hanno grande esperienza con questo tipo di ricerca.

Sui campioni genotipizzati di tessuto miocardico cercheremo di stabilire se le mutazioni di MYH7 e MYBPC3 responsabili di CMI portano all'espressione della proteina mutata o ad alterazioni dell'espressione. A livello dell'mRNA verranno misurati i livelli sia di mRNA normale che mutante mediante RT-PCR impiegando specifiche sonde TaqMan. Per stabilire se la mutazione dà luogo a 'poison peptides' o ad alterazioni della quantità di proteina normale espressa, verranno impiegati diversi metodi (spettrometria di massa, gel-elettroforesi mono- e bi-dimensionale, anticorpi specifici).

Nei campioni cardiaci di pazienti CMI portatori di mutazioni di MYH7 e MYBPC3 verranno analizzati i livelli di espressione e di fosforilazione di altre proteine del sarcomero mediante diversi metodi di analisi elettroforetica; tali livelli verranno confrontati con quelli rilevati in campioni di controllo, in campioni di cuori affetti da ipertrofia secondaria e di cuori scompenati.

L'impiego di gel-elettroforesi monodimensionale e della colorazione delle proteine fosforilate con Pro-Q Diamond in combinazione con la colorazione SYPRO Ruby dello stesso gel consente un'analisi quantitativa simultanea del contenuto e del grado di fosforilazione relativa delle principali proteine che compongono i miofilamenti partendo da piccole quantità di tessuto cardiaco.

Tecniche di gel elettroforesi bi-dimensionale saranno impiegate su campioni selezionati per stabilire le quantità assolute e la distribuzione delle proteine soggette a fosforilazione in siti multipli.

Scopo B3- Studi in modelli animali di CMI da mutazioni del gene CMYBPC3: topi knock-out e knock-in.

Non è del tutto chiaro come le mutazioni del gene MYBPC3 causino la CMI. L'ipotesi che la malattia sia dovuta ad aploinsufficienza (ridotta espressione nel sarcomero della proteina cMYBP-C) ha portato allo sviluppo del modello di topo transgenico knock-out per la cMyBP-C come modello di CMI. Recentemente la Dott.ssa L. Carrier (Università di Amburgo) ha sviluppato un modello di topo knock-in (con una mutazione del gene MYBPC3 simile a una di quelle osservate nella CMI umana) che può meglio simulare la malattia umana.

In questo modello è stato osservato che nel topo knock-in si verifica una regolazione negativa dell'espressione della proteina sia a livello dell'mRNA che a livello della proteina in seguito alla maggior attività del sistema ubiquitina-proteasoma. Entrambe i fattori contribuiscono a una condizione di aploinsufficienza (comunicazione personale di L. Carrier).

Grazie alla collaborazione con la Dott.ssa L. Carrier, ci proponiamo di studiare le proprietà meccaniche di miofibrille cardiache di topi knock-out e knock-in neonati e adulti di diverse età. I risultati saranno confrontati con quelli ottenuti da pazienti CMI portatori di mutazioni di MYBPC3 (vedi scopo B1).