

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze Mediche



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXII (2006-2009)

TITOLO

**Correlazione dei polimorfismi dei recettori beta2-
adrenergici con la coronaropatia e lo spessore intimo-
mediale carotideo**

Candidato: dr. Lorenzo Coppo

Coordinatore: prof. Umberto Dianzani

INDICE

1 INTRODUZIONE.....	3
1.1 Meccanismi eziopatogenetici dell'aterosclerosi.....	4
1.2 Fattori di Rischio Cardiovascolari.....	14
1.3 Predisposizione genetica all'aterosclerosi	19
1.4 Il Recettore beta-2 adrenergico e potenziali implicazioni nel processo aterosclerotico.....	22
1.5 Localizzazione ed effetti.....	24
1.6 Gli SNPs del recettore beta 2 adrenergico	26
1.7 Polimorfismo del recettore beta 2 adrenergico e Aterosclerosi	32
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	35
3. MATERIALI E METODI	36
3.1 Esami di Laboratorio.....	37
3.2 Genotipizzazione dei recettori beta-2 adrenergici	37
3.3 Angiografia coronarica	42
3.4 Misurazione dello spessore medio intimale	43
3.5 Analisi statistica.....	44
4. RISULTATI	47
4.1 Caratteristiche demografiche e cliniche	47
4.2 Caratteristiche angiografiche.....	50
5.3 Malattia carotidea.....	53

5. DISCUSSIONE.....	56
5.1 Polimorfismi dei recettori beta2-adrenergici e coronaropatia.....	56
6 LIMITAZIONI	60
7. CONCLUSIONI.....	62
8. BIBLIOGRAFIA.....	63

1 INTRODUZIONE

Le complicanze dell'aterosclerosi rappresentano la più comune causa di morte nel mondo occidentale ed in Italia. Secondo i dati Istat i decessi per malattie del sistema cardiocircolatorio, nel 2006, hanno rappresentato il 39% del totale della mortalità.

(1) L'aterosclerosi è una patologia multifattoriale che vede come attori principali le lipoproteine modificate, macrofagi, linfociti T ed endotelio dei vasi arteriosi. Tale processo porta allo sviluppo di placche ateromasiche all'interno della parete vascolare, la cui rottura e superimposizione di materiale trombotico sono alla base dello stroke e dell'infarto del miocardio. Numerosi fattori di rischio, sia ambientali che genetici sono stati riconosciuti come determinanti per l'instaurarsi ed il progredire delle lesioni aterosclerotiche.

L'approccio medico nei confronti di tali patologie cardio e cerebrovascolari è attualmente in fase di rilevante modificazione, per lo più in considerazione del radicale cambiamento epidemiologico determinato dall'estensione delle pratiche interventistiche in quest'ultimo decennio (soprattutto

in ambito cardiologico, naturalmente, ma negli ultimi anni anche in ambito neuro radiologico). Negli ultimi anni, sempre maggiore attenzione è stata rivolta alla prevenzione cardiovascolare piuttosto che al trattamento della cardiopatia ischemica, poichè quest'ultima, grazie alle moderne e innovative tecniche di rivascolarizzazione percutanea ha oramai raggiunto un plateau di diffusione. Pertanto gli interessi scientifici sono stati focalizzati sull'identificazione di nuovi fattori di rischio, ed in particolare sulla predisposizione genetica, le cui conoscenze potrebbero ampliare gli attuali orizzonti in termini di prevenzione primaria, soprattutto consentendo l'identificazione precoce dei soggetti a rischio fin dall'età giovanile.

1.1 Meccanismi eziopatogenetici dell'aterosclerosi

La disfunzione endoteliale rappresenta il primo passo nel complesso processo dell'aterosclerosi. Le cause di disfunzione endoteliale sono multiple ma si possono sinteticamente ricondurre a quelli che sono considerati fattori di rischio per

l'aterosclerosi, come l'aumento delle LDL, la loro modificazione e ossidazione, la presenza di radicali liberi, tra cui quelli indotti dal fumo di sigaretta, i prodotti di glicosilazione presenti nei diabetici, l'ipertensione, elevate concentrazioni plasmatiche di omocisteina(2). Per motivi di turbolenza di flusso, è ben noto che le lesioni ateromasiche tendano a interessare maggiormente i punti di biforcazione.

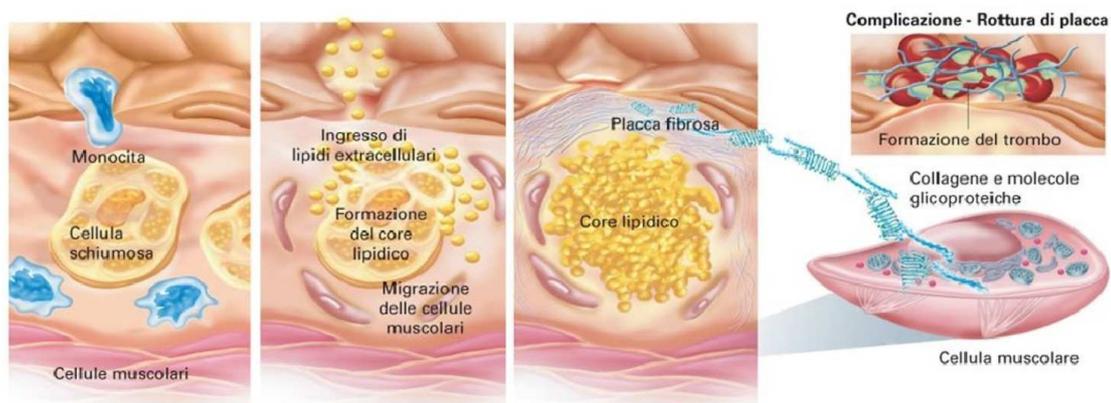


Figura 1 Progressione del processo aterosclerotico fino alla rottura della placca con formazione di trombo

L'aterosclerosi è attualmente considerata come malattia infiammatoria cronica della parete arteriosa. Difatti, l'infiammazione riveste un ruolo chiave nella fisiopatologia del processo aterosclerotico. L'alterazione funzionale dell'endotelio si manifesta con l'espressione di molecole di adesione sulla membrana cellulare e con la secrezione di sostanze biologicamente attive: citochine, fattori di crescita, radicali liberi; questi sono responsabili dell'infiltrazione leucocitaria, della permeabilità alle lipoproteine plasmatiche e del controllo del tono vascolare (3). Nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche possiamo distinguere diverse fasi: i processi

iniziali che generano lesioni clinicamente silenti, le fasi di progressione che portano alla formazione di lesioni stenotiche non necessariamente sintomatiche, gli eventi complicanti che stanno alla base delle manifestazioni cliniche acute e croniche. L'accumulo locale di lipidi a livello subendoteliale può essere considerato l'evento iniziante della formazione di una lesione aterosclerotica (figura 1).

I lipidi sono trasportati nel plasma sotto forma di lipoproteine, complesse molecole idrosolubili, composte da un nucleo di esteri del colesterolo e di trigliceridi ed uno strato superficiale di fosfolipidi, colesterolo libero e dalle specifiche proteine trasportatrici: le apolipoproteine. Le lipoproteine contribuiscono differenzialmente le une dalle altre nello sviluppo delle lesioni: quelle ricche in trigliceridi, i chilomicroni e le VLDL, non sono considerate aterogene, ma si ritiene che lo siano quelle derivanti dalla loro lipolisi, cioè i remnants e le LDL, lipoproteine più ricche in colesterolo. I tessuti assorbono colesterolo dal plasma attraverso il recettore per le LDL, detto LDL-R, in grado di riconoscere e legare la apolipoproteina ApoB-100 presente nelle LDL che ne permette

l'internalizzazione nelle cellule. Tale recettore rimuove approssimativamente il 75% delle LDL dal circolo ed è regolato con un feedback negativo per la sua espressione quando il livello intracellulare di colesterolo aumenta. Il meccanismo grazie al quale le HDL diminuiscono il rischio di malattie cardiovascolari è complesso: è stato proposto che siano il vettore per il trasporto del colesterolo in eccesso dalle cellule periferiche verso il fegato. Si stima che per ogni aumento di 1 mg/dl di colesterolo HDL il rischio di malattie cardiovascolari diminuisca del 2% negli uomini e del 3% nelle donne (4). Le lipoproteine ritenute a maggior rischio aterogenico sono le LDL: in particolare la frazione di lipoproteine LDL più piccole e dense, caratterizzata dalla taglia e dal rapporto lipidi/proteine a favore di queste ultime sembra avere un potenziale aterogenico maggiore delle comuni LDL. Presenta, infatti, una emivita plasmatica aumentata dovuta alla diminuzione di affinità per il recettore per le LDL, LDL-R. Persistendo in circolo continuano a cedere lipidi, aumentando di densità e diminuendo di dimensioni e sono inoltre esposte ad una maggiore numero di eventi ossidativi divenendo prima LDL

mediamente ossidate (MM-LDL) e poi LDL ossidate (oxLDL) (5). L'ossidazione è ritenuta uno dei fattori d'iniziazione della lesione aterosclerotica in quanto i prodotti ossidati sono in grado di indurre danno endoteliale e chemiotassi. L'ossidazione delle lipoproteine occorre sia a livello della porzione lipidica che di quella proteica. Le modificazioni dei lipidi includono la formazione di idroperossidi, lisofosfolipidi, ossisteroli e prodotti aldeici derivanti dalla rottura delle catene degli acidi grassi (6). Le modificazioni della porzione apolipoproteica includono rotture della catena peptidica come anche la formazione di specifici legami tra residui aminoacidici e componenti dei lipidi ossidati. Le LDL ossidate sono state riscontrate sia nel plasma sia nelle lesioni aterosclerotiche precoci e avanzate. In risposta al danno indotto da prodotti ossidativi, da stress meccanico, come alterazioni del flusso ematico, le cellule endoteliali si attivano esprimendo molecole di adesione sulla superficie e producendo mediatori chemiotattici. Le zone solitamente più suscettibili alla formazione delle lesioni aterosclerotiche, ad esempio i punti di ramificazione, spesso sono caratterizzati da flusso turbolento.

Le forze di taglio laminari, che contraddistinguono il flusso nella maggior parte del sistema arterioso, inibiscono l'espressione delle molecole di adesione dei leucociti (7) ed incrementano la produzione di ossido nitrico, NO, da parte dell'endotelio. L'ossido nitrico è, per altro, un potente vasodilatatore che agisce inoltre come antinfiammatorio locale, riducendo l'espressione di molecole di adesione. Irregolarità locali nelle forze emodinamiche possono influenzare tali meccanismi cellulari che esercitano un'azione protettiva nei confronti dell'insorgenza delle lesioni aterosclerotiche e rendono parzialmente conto della distribuzione focale delle lesioni aterosclerotiche (8). All'accumulo di lipidi, all'ossidazione ed alla attivazione endoteliale fa seguito il reclutamento di leucociti nel sito della lesione. Le cellule coinvolte sono monociti circolanti (che si trasformano in macrofagi) e linfociti sia CD4+ sia CD8+: tale processo coincide con l'attivazione dell'immunità umorale e cellulare caratteristiche dello stato infiammatorio cronico. La chemiotassi dei leucociti verso il sito della lesione e l'espressione di molecole di adesione sono mediate sia dai

prodotti dell'ossidazione lipidica che da citochine pro infiammatorie. I leucociti riescono ad aderire alle cellule endoteliali grazie a molecole di adesione ed a recettori specifici espressi sulla superficie endoteliale. Tra queste molecole sono importanti la VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1, e la ICAM-1, intracellular adhesion molecule 1 (appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline) e la P-selectina (proteina che fa parte di una famiglia distinta di recettori per i leucociti, le selectine, appunto). Dopo avere aderito alla superficie endoteliale i leucociti attraversano lo strato endoteliale e si insediano nella tonaca intima. I monociti differenziatisi in macrofagi fagocitano ingenti quantità di lipidi e si trasformano in cellule schiumose. Questo processo viene facilitato dal fatto che le LDL ossidate sono riconosciute e fagocitate dai macrofagi mediante recettori specifici, come il recettore LOX-1 e il CD36 o recettore spazzino, scavenger receptor (9). Poiché l'espressione di questi recettori non è inibita dai livelli intracellulari di colesterolo i macrofagi possono assorbire LDL in continuazione fino ad assumere l'aspetto di cellule schiumose, foamy cells, le quali si accumulano contribuendo

all'accrescimento della lesione. D'altra parte alcune di esse possono andare in contro a morte per apoptosi inducendo la formazione di un nucleo, detto core lipidico: aspetto caratteristico di placche aterosclerotiche avanzate. La lesione a questo stadio è definita stria lipidica ed è caratterizzata dall'accumulo di lipidi liberi o sotto forma di cellule schiumose. Tali lesioni non hanno manifestazioni cliniche, si riscontrano in soggetti normali, senza malattia aterosclerotica ma possono essere evidenziate ecograficamente. Non tutte le strie lipidiche progrediscono in ateroma: quest'ultimo è considerato una lesione avanzata e si contraddistingue per la presenza di tessuto anche fibrotico. Alcuni fattori di crescita e citochine prodotte dai macrofagi sono in grado di stimolare la migrazione dalla tonaca media verso l'intima delle cellule muscolari lisce e la loro proliferazione. L'interleuchina 1 (IL1) ed il Tumor Necrosis Factor alfa (TNF-alfa), sono esempi di citochine che possono indurre la produzione locale di ulteriori molecole, come fattori di crescita, incluso il Platelet derived growth factor (PDGF) ed il fattore di crescita per i fibroblasti (FGF). L'interferone gamma, sintetizzato dalle cellule T attivate

(anch'esse presenti a livello delle lesioni), è altresì in grado di inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce. I fenomeni ed i processi che abbiamo appena elencato testimoniano come l'aterogenesi dipenda da un complesso equilibrio tra mediatori promuoventi ed altri in grado di inibirla. Le citochine ed i fattori di crescita prodotti nelle fasi iniziali del processo aterosclerotico sono in grado di stimolare la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media alla tonaca intima dove esse, in risposta a stimoli mitogeni, modificano il fenotipo da “contrattile” a “secernente” (10). La proliferazione delle cellule muscolari lisce rappresenta una fase di transizione critica, in quanto esse sono in grado di generare abbondante matrice extracellulare e formare una lesione fibrolipidica che va a sostituire la stria lipidica. L'accumulo lipidico viene circondato da formazioni fibrose fino ad esserne quasi totalmente sostituito. La fibrosi può essere intesa come un fattore stabilizzante la lesione poiché crea una capsula attorno al core lipidico rendendo la placca più resistente alla rottura. Il fattore di crescita trasformante beta, TGF-beta, è un esempio di molecola che stimola intensamente la produzione di collagene

interstiziale da parte delle cellule muscolari lisce. Tuttavia le cellule muscolari lisce delle lesioni aterosclerotiche complicate si replicano piuttosto lentamente. In effetti l'ateroma avanzato spesso ha carattere fibroso mentre manca l'aspetto ipercellulare caratteristico di stadi meno avanzati. Con l'ingrandirsi della lesione le cellule muscolari lisce ed i macrofagi risentono della carenza di sostanze nutritive e dell'ipossia andando facilmente incontro ad apoptosi. La calcificazione è un altro fenomeno spesso riscontrato nelle placche di tipo avanzato. Il rimodellamento della lesione può avvenire anche in seguito all'espressione ed attivazione di metalloproteasi in grado di degradare la matrice extracellulare della lamina fibrotica che riveste la placca. Queste comprendono vari enzimi: collagenasi, gelatinasi e stromelisina che degradano i diversi costituenti della matrice. La loro attività è inibita da specifiche proteine tissutali, ma a livello della placca vulnerabile, l'esposizione delle varie componenti cellulari alle citochine infiammatorie altera l'equilibrio con incremento della produzione di metalloproteasi e non di inibitori. Questo processo tende ad aumentare la fragilità delle placche, favorendone la

rottura.(figura 2). L'evoluzione delle lesioni aterosclerotiche è estremamente variabile per cui tutti i fenomeni descritti per la fasi iniziali e tardive possono avere più o meno rilevanza nelle diverse placche, né esiste una lineare consequenzialità degli eventi che portano al manifestarsi delle stesse (11).

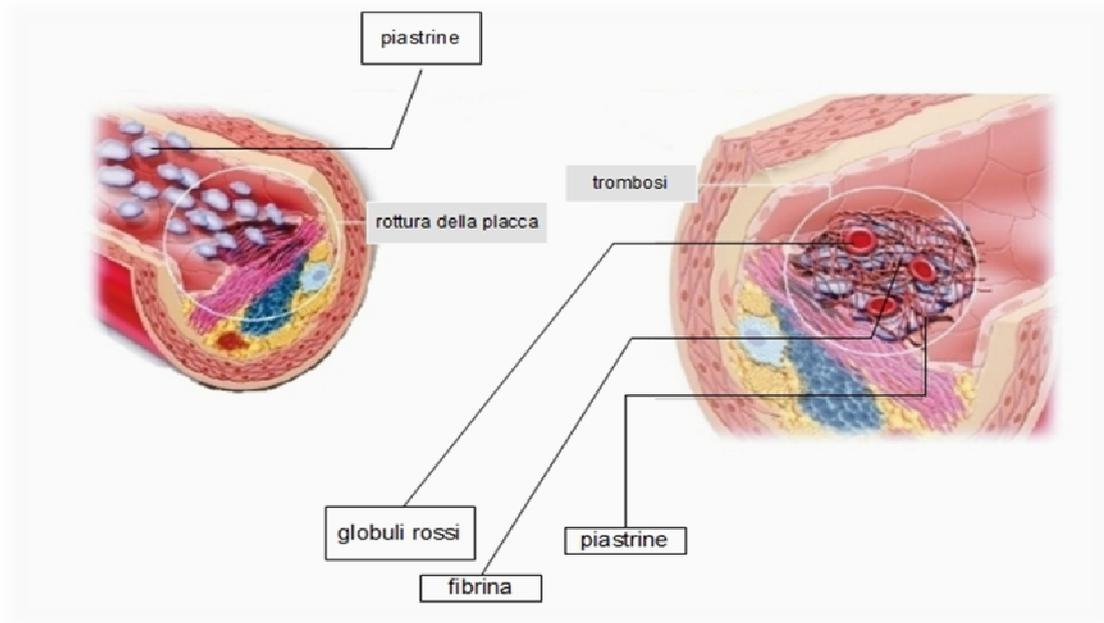


Figura 2 Alla formazione del trombo contribuiscono - dopo la rottura della placca - l'iniziale aggregazione di piastrine e la successiva deposizione di fibrina.

1.2 Fattori di Rischio Cardiovascolari

L'identificazione di fattori di rischio cardiovascolare fornisce un mezzo per ridurre l'incidenza della malattia coronarica e cerebrovascolare, tendendo a controllare i fattori modificabili ed inoltre può guidare l'inizio di eventuali terapie a scopo preventivo. Una distinzione significativa viene posta tra fattori di rischio modificabili e non modificabili. Questi ultimi comprendono il sesso, l'età, la storia familiare le caratteristiche

genetiche. Tali fattori non possono essere corretti ma devono essere tenuti presenti per determinare il rischio cardiovascolare. E' stato osservato che l'incidenza di malattie cardiovascolari è doppia negli uomini rispetto alle donne ed il 60% degli eventi coronarici avvengono negli uomini(12). L'esordio clinico negli uomini avviene generalmente una decina di anni prima che nelle donne e, dopo la menopausa, l'incidenza delle malattie cardiovascolari aumenta rapidamente portandosi vicino al livello maschile. La maggioranza degli infarti del miocardio e degli ictus cerebrovascolari avvengono i pazienti con età superiore a 65 anni. La familiarità può essere spiegata dalla predisposizione genica. L'insorgenza precoce delle lesioni e la loro rapidissima progressione in alcune famiglie costituiscono un vero e proprio fattore di rischio correlato ad un determinato genotipo, come messo in evidenza nell'ipercolesterolemia familiare.

Tra i fattori di rischio modificabili rientrano: il fumo, l'obesità, le dislipidemie, l'ipertensione, il diabete mellito e la sedentarietà. Il fumo di sigaretta riduce il colesterolo HDL, aumenta significativamente il rischio di vasospasmo e favorisce

l'aggregazione piastrinica, e, mediante l'aumento della produzione di radicali liberi, promuove la genesi di LDL modificate. L'obesità ha un ruolo importante nello sviluppo dell'aterosclerosi. In uno studio (13) effettuato su soggetti giovani, di età compresa tra 15 e 34 anni, morti per cause non cardiovascolari, è stata osservata una forte associazione tra indice di massa corporea, BMI, e presenza di lesioni aterosclerotiche. Il tessuto adiposo, non è solo un deposito passivo di riserve energetiche ma, si comporta come un organo endocrino producendo ormoni, quali le adipocitochine in grado di avere effetti metabolici in tutto il corpo. E' possibile che l'aumentata presenza di mediatori proinfiammatori come la leptina e ridotti livelli di altri antiinfiammatori, ad esempio l'adiponectina alterino la funzione endoteliale, variandone la permeabilità, l'espressione di molecole d'adesione e fattori chemiotattici. Livelli elevati di LDL e bassi livelli di HDL insieme all'aumento dei trigliceridi e del colesterolo totale sono certamente associati all'aterogenesi e costituiscono un fattore di rischio noto. Sono note da tempo le mutazioni a carico del gene del recettore delle LDL associate all'ipercolesterolemia

familiare e coronaropatia precoce. In tale condizione, l'alterata funzionalità del recettore per le LDL ne inibisce la captazione dal circolo. Il risultato è di aumentarne i livelli plasmatici e l'emivita favorendone l'ossidazione e gli effetti aterogeni. L'apo E, presente nei chilomicroni, nelle VLDL, nei Remnants e nelle LDL, è necessaria per la loro rimozione dal circolo legandosi al recettore per le LDL, presenta più isoforme alleliche. L'Apo E2 che manifesta ridotta affinità per il suo recettore, la Apo E4 che viceversa presenta una capacità di legame più forte e la Apo E3, che rappresenta la variante allelica più comune nei caucasici. L'ipertensione contribuisce all'aterogenesi sia producendo stress emodinamico sulla parete arteriosa che favorendo i processi ossidativi. Numerosi studi epidemiologici, condotti in popolazioni etnicamente e geograficamente differenti, hanno stabilito una relazione diretta tra elevazione della pressione arteriosa e l'incidenza di malattie cardiovascolari e cerebrovascolari. Le modificazioni di fattori solubili in corso d'ipertensione, ad esempio l'aumento della concentrazione di angiotensina II, un potente vasocostrittore prodotto dal sistema renina-angiotensina, contribuisce all'aterogenesi stimolando la

proliferazione delle cellule muscolari lisce (14). Incrementa inoltre l'attività delle lipossigenasi delle cellule muscolari lisce in grado di ossidare le LDL e sostenere il processo infiammatorio cronico. L'insulino resistenza è una componente eziologica fondamentale del diabete di tipo 2 ed è frequentemente associata allo sviluppo di lesioni aterosclerotiche. E' possibile formulare delle ipotesi riguardo l'interazione tra le funzioni dell'insulina e formazione della placca aterosclerotica. Normalmente l'insulina riduce la concentrazione plasmatica degli acidi grassi liberi ed il suo mancato effetto, nell'insulino resistenza, si traduce nel loro aumento. Nei pazienti diabetici, in presenza di alte concentrazioni di glucosio, le lipoproteine vanno incontro a modificazioni non enzimatiche, la glicazione, che ne altera il riconoscimento ed il legame da parte dei recettori. La glicazione delle LDL causa il prolungamento dell'emivita e dunque l'aumento della concentrazione plasmatica. La continua interazione tra carboidrati e proteine può condurre alla formazione di prodotti di avanzata glicazione altamente reattivi, detti AGEs, advanced glycosilation endproducts. L'accumulo di

questi in proteine a lunga emivita, come quelle della membrana basale subendoteliale, dovuto alla migrazione delle lipoproteine modificate, altera le caratteristiche della matrice e svolge un ruolo peculiare nello sviluppo delle complicanze vascolari associate al diabete.(15). Il bersaglio delle AGEs sono monociti ed endotelio, sui quali sono stati isolati i recettori specifici, R-AGEs. Ed è stato osservato che dall'interazione tra recettore e composti di avanzata glicazione si generano radicali dell'ossigeno in grado di modulare la funzione endoteliale modificandone la permeabilità e l'espressione di molecole di adesione, per altro coinvolte nel processo aterosclerotico.

1.3 Predisposizione genetica all'aterosclerosi

Alcune varianti geniche costituiscono un fattore predisponente allo sviluppo della malattia aterosclerotica a parità di condizioni ambientali. Non tutti i geni associati all'aterosclerosi sono stati identificati, ma quelli candidati sono alcune centinaia, e la loro individuazione risulta un compito particolarmente difficile a causa degli effetti confondenti. Ad

esempio, un singolo gene può determinare fenotipi differenti tra loro, causando pleiotropismo, oppure un gene sopprime l'espressione fenotipica di un altro mascherando un carattere ereditario (3, 16). Livelli elevati di omocisteina costituiscono un fattore di rischio accertato (17). Alcuni difetti a carico del metabolismo di tale aminoacido solforato sono responsabili del suo accumulo nel sangue associato a manifestazioni trombotiche precoci quale ictus cerebrovascolare, cardiopatia ischemia, arteropatia obliterante. L'iper omocisteinemia di grado moderato è anche dovuta alla carenza di vitamine, come l'acido folico, la vitamina B6 e la B12, che agiscono come cofattori nel metabolismo aminoacidico. Per quanto riguarda la componente genetica è stata imputata una variante termolabile dell'enzima metilene tetraidrofolato reduttasi, responsabile della metilazione dell'omocisteina a metionina. Un polimorfismo ne altera la funzione causando una sostituzione aminoacidica nella regione codificante per il sito di legame con l'omocisteina (18). L'elevata concentrazione plasmatica di omocisteina agisce direttamente danneggiando l'endotelio e con effetto protrombotico. Il sistema emostatico, responsabile dell'arresto

del sanguinamento in seguito a danno vasale, è anche implicato nel rischio di trombosi. Le alterazioni della funzione piastrinica e dei sistemi emocoagulativi e fibrinolitici possono influenzare il rischio trombotico (19). I fattori della cascata coagulativa ed in particolare il fibrinogeno, il fattore VII, il fattore V, l'attivatore tissutale del plasminogeno e l'inibitore dell'attivazione del plasminogeno sembrano coinvolti in misura più significativa. E' noto come il fibrinogeno contribuisca ad aumentare la viscosità plasmatica e l'aggregazione piastrinica e faciliti la coagulazione. L'attività plasmatica del fattore VII, primo proenzima della via estrinseca, è un ulteriore punto chiave ed è correlata con fattori ambientali quali una dieta ad alto contenuto lipidico, l'elevato peso corporeo, l'abitudine al fumo, l'assunzione di contraccettivi orali. Le alterazioni dell'attività anticoagulante del fattore V e della modulazione della sua attività da parte del complesso proteina C, proteina S potrebbero aumentare il rischio di trombosi arteriosa così come sono stati correlati all'insorgenza di trombosi venosa (20). L'aumento in circolo del t-PA e dell'inibitore tissutale del plasminogeno su base congenita sono stati messi in relazione

all'insorgenza di eventi trombotici acuti, anche se i risultati ottenuti da tali studi sono controversi.

1.4 Il Recettore beta-2 adrenergico e potenziali implicazioni nel processo aterosclerotico

I recettori beta-adrenergici rappresentano elementi essenziali nella fisiopatologia cardiovascolare. Finora sono stati identificati 3 recettori: Beta-1, Beta-2, Beta-3.

Il recettore beta-2 adrenergico è formato da un singolo filamento proteico che attraversa, caratteristicamente, la membrana cellulare sette volte: l'estremità carbossiterminale è rivolta verso il citoplasma, quella aminoterminale extracellulare; esso presenta poi tre anse o loops intracellulari ed altrettanti extracellulari. E' accoppiato alle proteina Gs, che stimola l'adenilato ciclasi aumentando la concentrazione intracellulare di cAMP. Il legame con le catecolamine induce il cambiamento di conformazione della parte citoplasmatica del recettore e si trasmette alla proteina G accoppiata che si lega con diversi punti di contatto proprio in corrispondenza delle zone carbossiterminale e del terzo loop citosolico del recettore.

La porzione carbossiterminale è inoltre importante per la regolazione (figura 3).

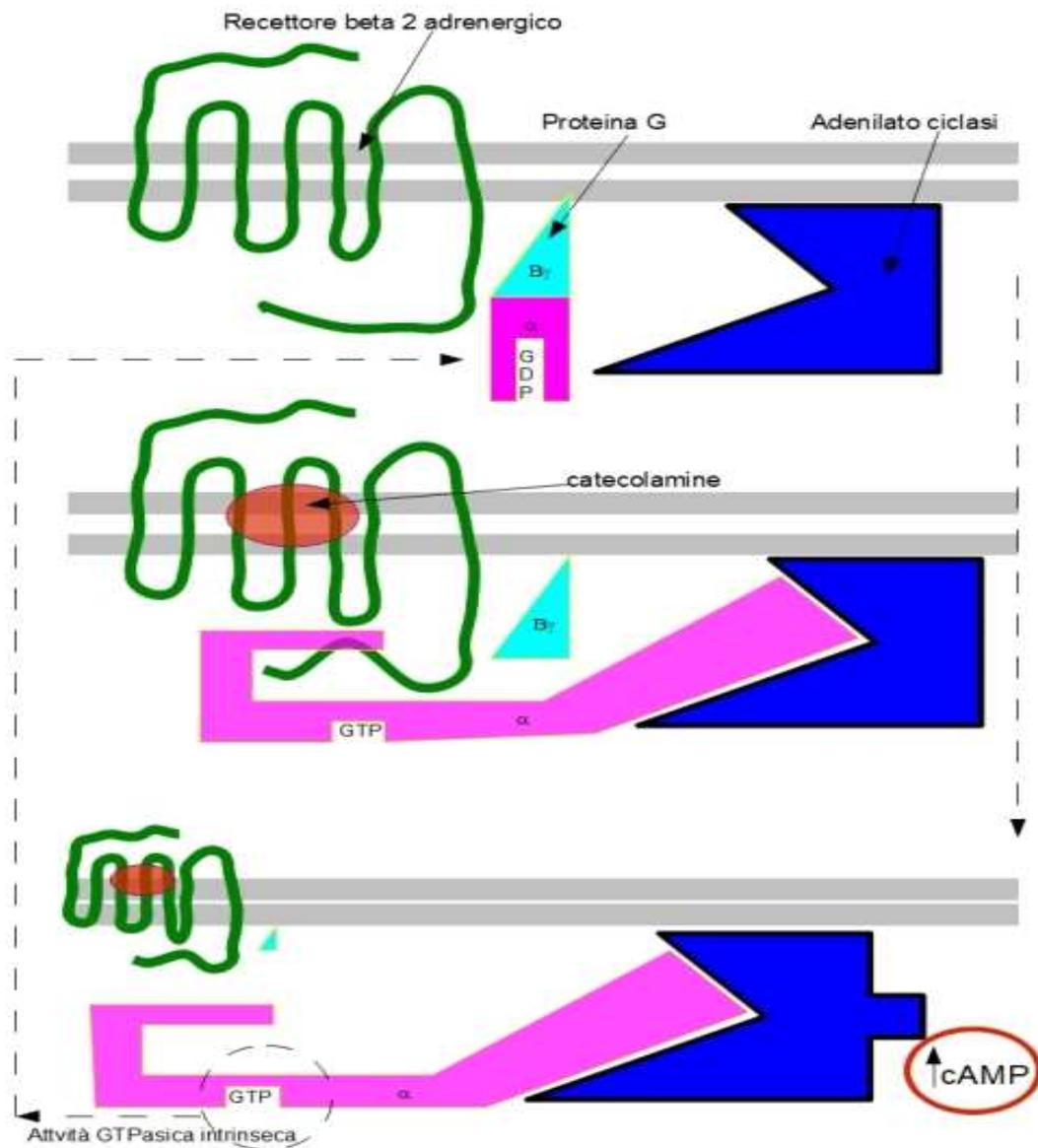


Figura 3 Il recettore beta 2 adrenergico è un unico filamento proteico che attraversa sette volte la membrana fosfolipidica, presenta tre anse extracellulari ed altrettante intracellulari. Il sito di legame per l'agonista è rappresentato da alcuni territori transmembrana e è localizzato in una tasca della membrana plasmatica. Il dominio aminoterminale è extracellulare, quello carbossiterminale è invece intracellulare ed insieme alla terza ansa citoplasmatica interagisce con le proteine Gs nella cascata di trasduzione del segnale. Il legame recettore-agonista attiva la proteina Gs che può interagire con l'adenilato ciclasi: l'effetto è l'aumento del cAMP intracellulare.

1.5. Localizzazione ed effetti biologici

I recettori beta1 e beta 2 adrenergici sono entrambi espressi a livello cardiaco, ed in tale sede regolano l'inotropismo ed il cronotropismo cardiaci. Nelle arterie coronarie i recettori β -adrenergici sono situati a livello avventiziale e nella zona di transizione media-intima, dunque i recettori β -adrenergici risultano essere in rapporto diretto con le terminazioni nervose simpatiche. In rapporto, i β 2 rappresentano circa il 30% mentre i β 1 circa il 70% ed in valore assoluto a livello di coronarie extra parenchimali vi è un maggior numero di recettori β rispetto ad una coronaria intra parenchimale (21). Il bilancio del tono vasomotore a livello delle coronarie è tale che i recettori beta 2 contribuiscono alla vasodilatazione in antagonismo alla vasocostrizione indotta dai recettori alfa 1 e, in corso di aterosclerosi, dalla iperresponsività di questi e dalla disfunzione endoteliale. Sull'endotelio coronarico sono espressi sia i recettori β 1 che β 2, questi ultimi, inoltre, evocano vasodilatazione con la loro funzione miorilassante. I recettori β 1, adrenergici sono per lo più localizzati a livello delle

coronarie epicardiche. I recettori β_2 adrenergici sono posti a livello delle arteriole (figura 4). Più recentemente la presenza di recettori β_3 è stata dimostrata a livello del miocardio e del sistema vascolare cardiaco (più specificamente sulle cellule endoteliali delle arteriole) dove sarebbero in grado di mediare la vasodilatazione attraverso un meccanismo che coinvolge l'ossido nitrico e l'iperpolarizzazione vascolare.

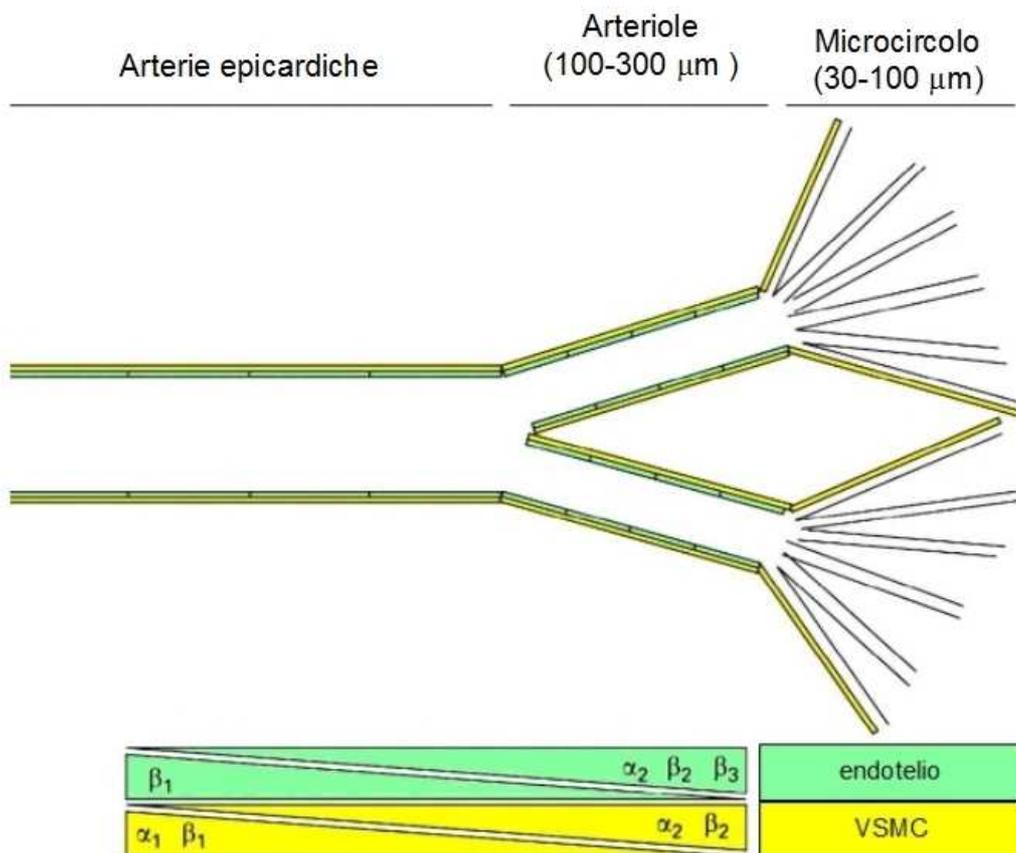


Figura 4 Distribuzione dei recettori adrenergici a livello del circolo coronarico. Il colore verde chiaro rappresenta l'endotelio, il colore giallo rappresenta la media (ovvero le cellule muscolari lisce – VSMC).

1.6 Gli SNPs del recettore beta2 adrenergico

Il recettore beta 2 adrenergico umano, codificato da un gene privo di introni, è posto sul cromosoma 5q31-32 (22). Nella regione codificante sono state individuate 12 varianti polimorfiche consistenti in sostituzioni di una singola base (SNPs)..

I polimorfismi dei geni sono varianti alleliche presenti in una percentuale superiore all'1% della popolazione generale, dovute a sostituzioni di singole basi, inserzioni e delezioni ed a variazioni nel numero di tandem repeats. Il tipo più comune è il Single Nucleotide Polymorphism (SNPs o polimorfismi a singolo nucleotide). Gli SNPs consistono nella sostituzione di una singola base, la loro frequenza è di circa 1 ogni 1000 basi con una presenza, nel genoma umano dai 3 ai 10 milioni di SNPs.

Attualmente risultano identificati circa 1,8 milioni, con una media di 5-10 polimorfismi per gene. Di questi l'1% possono avere significato biologico localizzandosi a livello delle regioni

codificanti o quelle regolatrici. L'effetto di uno SNP può essere ridondante, senza sostituzione aminoacidica; oppure causare sostituzione aminoacidica con effetti minimi sulla proteina o, ancora, in grado di provocarne un cambiamento significativo della struttura e della funzione. Generalmente influenzano l'attività della proteina o modificandone la capacità funzionale oppure la possibilità di regolazione.

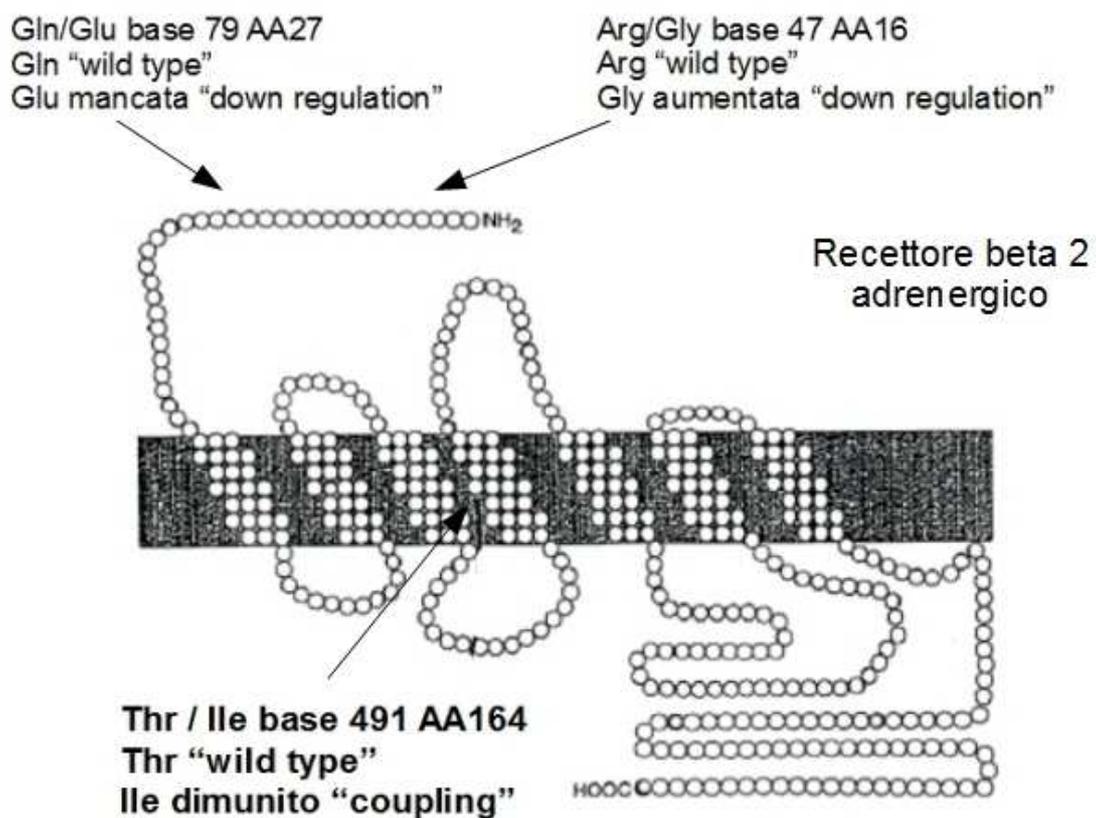


Figura 5 Struttura del recettore beta-2 adrenergico e sito dei SNPs in posizione 16, 27, 164, con i relativi impatti funzionali proposti sull'attività del recettore

Per quanto riguarda il recettore beta2 adrenergico vi sono 5 varianti “non sinonime”(ovvero capaci di provocare una sostituzione aminoacidica): Arg 16Gly, Gln27Glu, Val34Met, Thr164Ile, Ser220Cys; le restanti 7 sono sinonime ed è improbabile che abbiano un significato funzionale. Dei SNPs considerati, tre, posizione 16, 27 e 164, hanno effetti funzionali sia in vitro che in vivo (figura 5), mentre il polimorfismo in posizione 34 (estremamente raro), sembra che non alteri la funzione recettoriale e, per il polimorfismo in posizione 220, al momento, non ci risultano essere presenti in letteratura studi sulle conseguenze funzionali (23). Esistono ulteriori polimorfismi a singolo nucleotide, almeno altri 8, contenuti entro 1,5 kb della regione non trascritta in posizione 5' (5' UTR) sino al codone d'inizio ATG(24), almeno uno dei quali influenza l'espressione del recettore.

Altri posti in linkage disequilibrium con i polimorfismi sono Arg16Gly e Gln27Glu. La sostituzione Isoleucina / Triptofano in posizione 164 (Ile164Thr) in vitro dimostra una riduzione dell'attivazione del recettore beta 2 (25).

Dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) responsabili di alterazioni funzionali particolarmente interessanti sono stati ampiamente riportati in letteratura: Arg16Gly, Gln27Glu; Thr164Ile. In studi condotti su colture cellulari, ciascun recettore presenta un fenotipo unico messo a paragone con quello nativo (wild type). Con la variante Gly16 il recettore mostra aumentata downregulation, ovvero perdita di espressione del recettore promossa dall'agonista. La variante Glu 27 è resistente alla downregulation. Quella Ile 164 mostra una funzione di accoppiamento alla proteina Gs, per la stimolazione dell'adenilato ciclasi, notevolmente depressa. I dati ottenuti sull'impatto di tali varianti genetiche sulla responsività del sistema vascolare sono quanto meno controversi. Studi condotti su volontari sani l'infusione sistemica di β 2 agonisti evoca una maggiore vasodilatazione nei soggetti omozigoti per la variante Arg 16, sebbene l'infusione "locale" nella vena della mano o nell'arteria brachiale risultava in una risposta vasodilatatoria più ampia nei soggetti omozigoti per Gly 16(26). Tuttavia, in uno studio, la terbutalina evocava effetti venodilatatori maggiori in soggetti omozigoti per Arg16.

D'altra parte, individui omozigoti per Glu27 hanno, a livello dell'avambraccio, una risposta vasodilatatoria maggiore all'isoproterenolo comparata ai soggetti omozigoti per Gln27. Questa risposta vasodilatatoria è più pronunciata a livello delle vene che delle arterie. Una risposta vasodilatatoria aumentata è stata comunque osservata solo a livello venoso nei soggetti omozigoti per Gly16 sottoposti ad alte dosi di isoproterenolo.

La ragione di tali discrepanze non è ben comprensibile e sono stati invocati, per la spiegazione, fattori tessuto o agonista dipendenti.

La variante eterozigote Thr164Ile, l'unica riscontrata nell'uomo, è associata con una diminuzione dell'attività dell'adenilato ciclasi sia in condizioni basali che dopo stimolazione con agonista. Ciò sembra dovuto alla alterata conformazione del recettore polimorfico che porta ad una riduzione del passaggio allo stato attivo sia spontaneo che indotto dal legame con l'agonista. Studi su topi transgenici hanno rilevato che tale variante determina una depressione della funzione contrattile rispetto ai controlli. Inoltre, Liggett ed altri

(27) hanno mostrato che questo polimorfismo ha un effetto significativo nel modificare l'andamento della malattia nello scompenso cardiaco congestizio, visto che gli individui eterozigoti presenterebbero un rischio aumentato di morte o di andare in corso a trapianto paragonati ai portatori della variante omozigote Thr/Thr.

Ancora due studi, sebbene effettuati su campioni ridotti, hanno investigato l'impatto del polimorfismo Thr164Ile in relazione alla risposta vasodilatatoria evocata da beta agonisti. Dishy ed altri (26) hanno riportato che la sensibilità alla vasodilatazione dovuta all'isoprenalina è circa di cinque volte inferiore negli eterozigoti rispetto agli omozigoti Thr/Thr. Ed in modo molto simile Bruck ed altri (28) hanno potuto evidenziare che in soggetti, precedentemente sottoposti a vasocostrizione con fenilefrina delle vene della mano, la sensibilità alla vasodilatazione indotta da terbutalina era circa quattro volte inferiore nel gruppo che presentava il polimorfismo Thr164Ile.

1.7 Polimorfismo del recettore β_2 adrenergico e Aterosclerosi

La regolazione adrenergica della circolazione coronarica è già alterata ad uno stadio precoce dell'aterosclerosi coronarica. Infatti, la presenza di disfunzione endoteliale pregiudica la componente vasodilatatoria adrenergica localizzata a livello endoteliale, spostando il bilancio verso la componente vasocostrittoria.(36). Costantemente, in arterie coronarie angiograficamente normali, vasodilatazione indotta dall'esercizio è ampiamente attenuata in presenza di fattori di rischio per la disfunzione endoteliale, quali l'ipercolesterolemia, il fumo e l'ipertensione. Con il progredire dell'aterosclerosi, la risposta vasodilatatoria coronarica tipicamente osservata in corso di attivazione del simpatico è rimpiazzata dalla vasocostrizione. L'esercizio fisico, il test del freddo, il pacing atriale, lo stress mentale ed il fumo sono tutti noti come fattori in grado di generare una risposta vasocostrittoria in coronarie con danno aterosclerotico grave. Numerosi studi suggeriscono che la vasocostrizione coronarica in presenza di aterosclerosi sia mediata dell'effetto vasocostrittore α adrenergico smascherato dal carente effetto vasodilatatore β adrenergico. (29, 30, 31)

La stimolazione selettiva dei recettori β_2 , con infusione intracoronarica di

salbutamolo, mostra un'incompleta vasodilatazione in pazienti con aterosclerosi coronarica lieve, mentre in arterie stenotiche il salbutamolo induce una vasocostrizione paradossa. Dopo che il blocco α sia indotto con la fentolamina, tale vasocostrizione non è più osservabile, a sostegno del fatto che il rilascio di noradrenalina dalle riserve neuronali

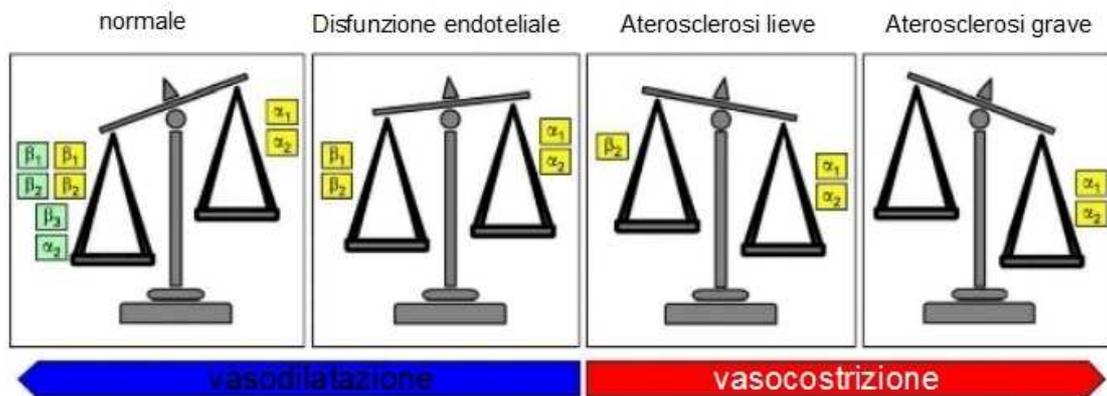


Figura 6. Modificazione della distribuzione dei recettori beta-adrenergici coinvolti nel controllo della vasoreattività dai soggetti normali a diversi gradi di severità di aterosclerosi. Con l'avanzare della malattia aterosclerotica, si ha una prevalenza dell'attività alfa-adrenergica (e quindi vasocostrizione) su quella beta-adrenergica (vasodilatazione).

(e la vasocostrizione risultante) sia mediato dalla stimolazione dei recettori β_2 adrenergici presinaptici (30). Questa osservazione suggerisce il progressivo pregiudicarsi della funzione dei recettori β_2 adrenergici con

l'avanzare della aterosclerosi (figura 6).

Le varianti polimorfiche del recettore beta-2 adrenergico, oltre a contribuire a potenziali eventi ischemici su base vasoreattiva, e, pertanto condizionare la sopravvivenza agli eventi critici nei pazienti aterosclerotici, potrebbero essi stessi avere un ruolo etiopatogenetico nel processo aterosclerotico. Difatti, in base al tipo di prevalente espressione di tali polimorfismi, verrebbe in primo luogo favorita o meno l'insorgenza di un importante fattore di rischio cardiovascolare, quale l'ipertensione arteriosa, ma soprattutto si è anche osservato come i recettori beta-2 adrenergici (la cui espressione dipende da tali polimorfismi) siano coinvolti nella regolazione della proliferazione delle cellule muscolari lisce e pertanto potrebbero modificare la crescita e la composizione della placca ateromasica.

2 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il nostro studio ha i seguenti obiettivi:

- 1) Valutare la relazione tra i polimorfismi del recettore beta-2 adrenergico e la coronaropatia

- 2) Valutare la relazione tra i polimorfismi del recettore beta-2 adrenergici e l'ateromasia carotidea.

3 MATERIALI E METODI

La nostra popolazione è rappresentata da un totale di 904 pazienti consecutive sottoposti ad angiografia coronarica dal Giugno 2007 a Dicembre 2008 presso l'Azienda Ospedaliera-Universitaria, "Maggiore della Carità" di Novara. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti prima di eseguire l'angiografia. Il protocollo è stato approvato dal nostro Comitato Etico. Nessun criterio di esclusione è stato applicato, eccetto il rifiuto a firmare il consenso informato.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti al momento dell'ospedalizzazione ad un accurato esame obiettivo ed anamnesi. Abbiamo rilevato in ogni paziente i parametri antropometrici, quali altezza, peso e cintura addominale. L'ipertensione arteriosa era definite come pressione sistolica > 140 mmHg e/o pressione diastolica > 90 mmHg oppure se i pazienti erano già in trattamento farmacologico antiipertensivo. La diagnosi di diabete si basava sul dato anamnestica di diabete mellito trattato o meno con terapia farmacologica. Tutte le caratteristiche cliniche ed angiografiche sono state

prospettivamente raccolte in un database dedicato, protetto da password.

3.1 Esami di Laboratorio

Un campione di sangue è stato prelevato a digiuno (dopo almeno 12 ore di digiuno) al momento del ricovero o nel giorno di esecuzione della coronarografia.

La glicemia, la creatinemia, i livelli di acido urico, l'esame emocromocitometrico ed il profilo lipidico sono stati determinati secondo le metodiche standard in uso presso il nostro Ospedale.

3.2 Genotipizzazione dei recettori beta-2 adrenergici

Il DNA genomico è stato estratto a partire da 200 microlitri di sangue intero usando il kit commerciale GenElute™ Blood Genomic DNA (Sigma Aldrich). Una volta isolato il DNA genomico il polimorfismo Ile164 del recettore beta 2 adrenergico è stato studiato combinando i risultati della

PCR con l'analisi dei frammenti di restrizione ottenuti dalla digestione enzimatica del prodotto della PCR effettuata con endonucleasi di restrizione MNL I (Fermentas). La PCR è stata effettuata con il termociclatore Applied Biosystem T2720 impostando un numero di cicli pari a 30 ed una temperatura di melting, T_M di 55,0 °C; il volume dei campioni è stato di 10 microlitri, per ogni PCR sono stati inclusi un controllo negativo ed uno positivo. La coppia di oligonucleotidi utilizzata come primers (sintetizzata da IDT DNA, Leuven Belgio) è stata disegnata e confrontata in silico grazie agli strumenti informatici, liberamente disponibili in rete, Primer3, SNPer view ed Oligo Analyzer (IDT DNA). La loro sequenza è di seguito riportata:

1) **primer forward:** (5'-TTA CTT CAC CTT TCA AGT ACC AGA GC-3'), 26 bp;

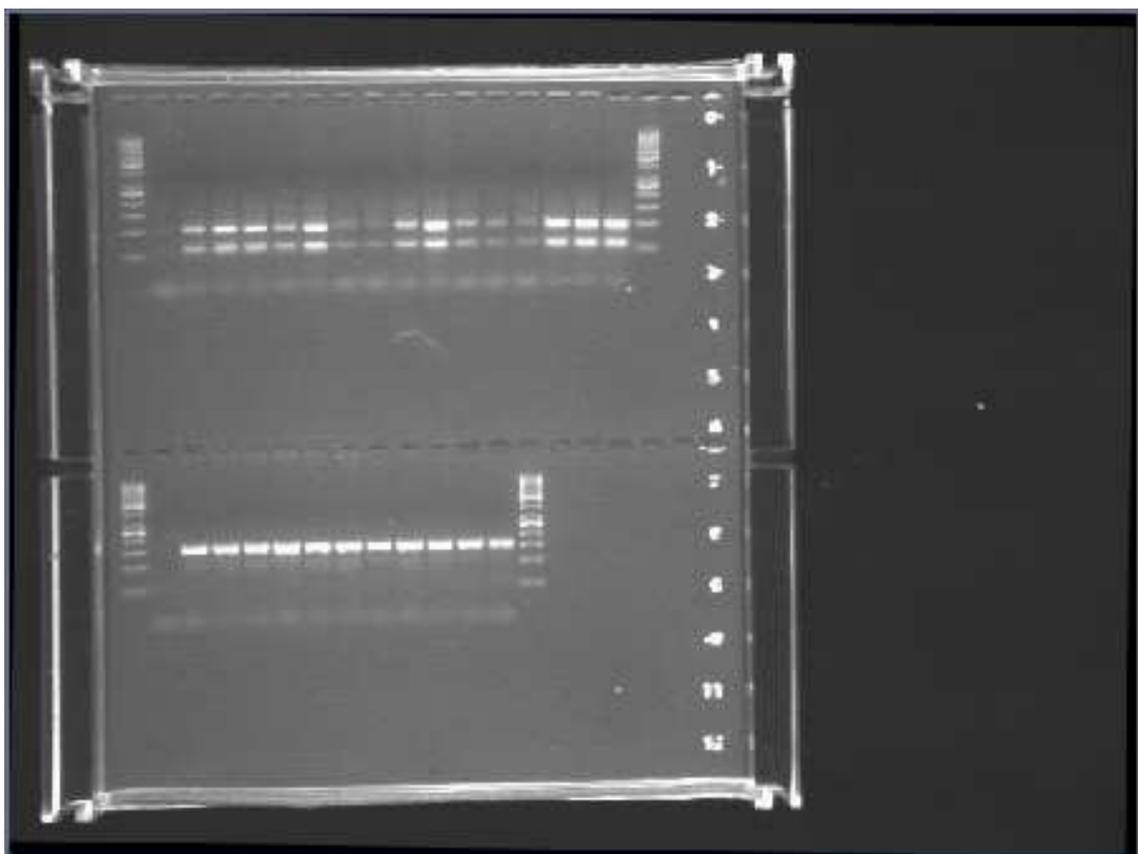
2) **primer reverse:** (5'-CAT AGC AGT TGA TGG CTT CCT G-3'), 22 bp.

I reagenti usati per la PCR sono stati GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega), con buffer 5X Green GoTaq® Flexi Buffer e Cloruro di Magnesio separati che hanno permesso la messa a punto ottimale della

reazione.

Circa 4 microlitri dei 10 disponibili sono stati posti per la corsa elettroforetica su gel di agarosio (gellyphor, CellBio) al 2,5% in TAE 1x (tris acetato EDTA), usando come intercalante delle basi per la fotografia all'ultravioletto 4 microlitri di GEL RED (TM) in 100 ml di gel di agarosio. La corsa è stata effettuata in un campo di differenza di potenziale costante di 90 Volts per 30 minuti, la differenza di potenziale scelta ha permesso di prevenire il riscaldamento del tampone di corsa ed il rischio di raggiungere la temperatura di melting della reazione PCR con conseguente denaturazione del DNA. Come marker sono stati utilizzati pesi molecolari da 50 paia di basi (50 bp marker, Fermentas). E' stata cosi messa in evidenza con la fotografia all'ultravioletto (effettuata con Gel Doc, Biorad), nei campioni indagati, una banda di 154 paia di basi, corrispondente all'amplicone desiderato.(figura 7)

Figura 7 Nei pozzetti di gel d'agarosio in basso è stato fotografato, all'UltraVioletto, il risultato della PCR per amplificare il tratto di DNA genomico interessato dal polimorfismo in posizione 164 del recettore beta 2 adrenergico: la banda attesa è di 154 bp; il primo pozzetto include il controllo negativo. Nei pozzetti in alto è stato fotografato l'effetto della digestione enzimatica con MNL I. I campioni presentano tutti 2 bande a 99 e 55 bp, corrispondenti alla variante Thr/Thr, wild type.



La digestione del prodotto della PCR è stata effettuata incubando a 37 °C per 120 minuti i 6 microlitri rimanenti con una quantità, per ciascun campione, di 2,75 microlitri di acqua, 1 microlitro di buffer G (Fermentas,

TM) e 0,25 microlitri di endonucleasi di restrizione MNL I.

L'analisi dei frammenti di restrizione attesi, simulata precedentemente attraverso l'uso del software Vector NTI (Invitrogen), è stata effettuata sempre tramite elettroforesi su gel di agarosio (High Resolution agarose, Sigma Aldrich) al 3 % con 4 microlitri /100ml di Gel Red come intercalante del DNA. Come markers sono stati usati ancora i 50 bp e la differenza di potenziale applicata è stata di 90 Volts. La corsa elettroforetica è stata di cinquanta minuti e alla fotografia all'ultravioletto sono stati messi in evidenza i differenti pattern (peraltro attesi): (99 bp + 55 bp,) ovvero la variante Thr/Thr, per la quale l'endonucleasi effettuava la digestione su entrambi gli alleli e pertanto per brevità è stata denominata TT (taglio/taglio); (154 bp + 99 bp +55 bp) ovvero la variante eterozigote Thr/Ile, per la quale MNL I evidenziava un solo sito di restrizione in quanto la presenza dello SNP esclude il sito di taglio sull'altro allele (figure 7 e 8) denominata TNT (taglio/non taglio). Tale variante polimorfica, infatti, è contraddistinta dalla sostituzione di una singola base, C/T (citosina/timina) a livello dell'acido nucleico 491, alla quale corrisponde la variazione dell'aminoacido Ile in posizione 164.



Figura 8 Nel dettaglio è indicato l'effetto della digestione enzimatica con MNL I del prodotto della PCR. In verde la variante Ile164Thr del recettore beta 2 adrenergico con tre bande rispettivamente a 154, 99 e 55 paia di basi. In giallo la variante nativa Thr/Thr con 2 bande a 99 e 55 paia di basi.

3.3 Angiografia coronarica

L'angiografia coronarica è stata eseguita mediante la tecnica di Judkins con utilizzo di cateteri angiografici 6-French. L'angiografia quantitativa

(Siemens Acom Quantcor QCA, Erlangen, Germany) è stata eseguita da due cardiologi esperti che non erano a conoscenza dei dati clinici e di laboratorio dei pazienti. Una malattia coronarica significativa veniva definita come la presenza di almeno una stenosi coronarica superiore al 50%. Una malattia coronarica severa veniva definita come malattia trivasale e/o del tronco comune.

3.4 Misurazione dello spessore medio intimale

L'ecografia carotidea è stata eseguita da un ecografista esperto), che non era a conoscenza dei dati clinici, angiografici e/o genetici del paziente. È stato utilizzato uno strumento Acuson-Siemens XP 128/10, equipaggiato con un trasduttore a scansione lineare L538 (5,0 MHz). I pazienti sono stati fatti accomodare in posizione supina usando un angolo di 45° del trasduttore per l'acquisizione. Le immagini dell'asse maggiore e cross-sezionali delle arterie carotidi sia destra che sinistra al di sopra ed al di sotto del bulbo carotideo sono state ottenute ponendo il trasduttore con angolazione posteriore, mediale ed anteriore. Le misurazioni dello spessore medio intimale (IMT),

definito come la distanza tra due zone ecogene che corrispondano al confine tra lume e intima e tra media ed avventizia, sono state rilevate nei 10 mm distali di entrambe le arterie carotidi comuni, sia destra che sinistra. Sono state eseguite 5 determinazioni su ciascun lato e la media delle misurazioni è stata usata per l'IMT. Inoltre abbiamo considerato l'IMT massimale tra le due arterie. Un'arteria era classificata come affetta da placca aterosclerotica allorché venisse riportato un ispessimento localizzato $> 1,5$ mm che non coinvolgesse uniformemente l'intera arteria carotide, destra o sinistra, con o senza alterazione del flusso.

3.5 Analisi statistica

Le variabili continue sono espresse come media \pm Deviazione Standard, e le variabili categoriche come percentuale. .

L'analisi della varianza è stata usata per le variabili continue, laddove il χ -quadro test è stato usato per le variabili categoriche. La regressione multipla logistica è stata utilizzata

per valutare la correlazione tra il polimorfismi del recettore in posizione 164, e la coronaropatia.

Variabile	TT n=871	TNT n=33	p
età (media \pm deviazione standard)	68.7 \pm 10.6	65.5 \pm 10.7	0.09
altezza (cm)	166.8 \pm 10.7	168.5 \pm 8.7	0.35
peso (kg)	75.1 \pm 14.9	77.7 \pm 12.9	0.33
cinta addominale (cm)	95.5 \pm 13.6	98.3 \pm 11.2	0.25
pressione sistolica (mmHg)	137.2 \pm 20	132.3 \pm 23.3	0.17
Sesso maschile (%)	66	75.8	0.24
Diabete (%)	27.3	27.3	1.0
Ipercolesterolemia (%)	48.4	36.4	0.17
Abitudine al fumo (%)	36.8	36.4	0.68
storia familiare di coronaropatia (%)	27.8	42.4	0.067
insufficienza renale (%)	19.2	6.1	0.067
ipertensione (%)	71.9	63.6	0.30
Precedente infarto miocardica acuto (%)	24	21.2	0.71
Precedente PTCA (%)	15.5	24.2	0.18
Precedente by pass aortocoronarico (%)	11.7	6.1	0.32
Precedente accidente cerebrovascolare (%)	4.1	8.5	0.012
Indicazione alla coronarografia			
angina stabile od ischemia silente (%)	22.6	18.1	0.21
miocardiopatia dilatativa o valvulopatia (%)	22.7	26.3	>0.0001
sindrome coronarica acuta (%)	56.2	60.4	0.06

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche in base al polimorfismo Ile164 Thr del recettore beta 2 adrenergico.

Variabile	TT	TNT	valore di p
Dati di laboratorio all'ammissione			
glicemia a digiuno(mg/dl)	128.4±48.1	135.4±51.1	0.41
Creatinina (mg/dl)	1.17±0.64	1.12±0.44	0.63
Emoglobina glicosilata	6.3±1.22	6.3±1.39	0.97
Fibrinogeno	477±158	468±114	0.76
Acido urico	6.27±1.77	6.45±1.87	0.57
Colesterolo totale (mg/dl)	164±41	164±43	0.99
Colesterolo LDL (mg/dl)	98±42	88±28	0.19
Colesterolo HDL (mg/dl)	39±12	38±8	0.61
Trigliceridi (mg/dl)	152±94	168±96	0.33
Conta piastrinica	217±67	212±61	0.67
Globuli bianchi	7.79±3.1	7.68±2.56	0.9
Globuli rossi	4.56±0.61	4.5±0.44	0.59
terapia al momento dell'ammissione			
Statine (%)	45.2	45.5	0.98
Acido acetilsalicilico (%)	58.1	54.5	0.68
Nitrati (%)	41.1	39.4	0.85
Beta bloccanti (%)	49.8	39.4	0.24
Ace inibitori (%)	38.5	33.3	0.55
Antagonisti del recettore dell'angiotensina (%)	21.7	33.3	0.11
Diuretici (%)	33.8	12.1	0.008
Calcio antagonisti (%)	21.4	18.2	0.66
Clopidogrel (%)	25.1	33.3	0.29

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche in base al polimorfismo Ile164 Thr del recettore beta 2 adrenergico

4. RISULTATI

Abbiamo analizzato il polimorfismo del recettore beta-2 adrenergico in posizione 164 in un totale di 904 pazienti che rappresentano pertanto la popolazione finale dello studio. Un totale di 33 pazienti (3.6%) presentavano una variante polimorfica.

4.1 Caratteristiche demografiche e cliniche

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti in base al polimorfismo sono presentate nella Tabella 1.

Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nelle caratteristiche cliniche di base tra i due gruppi. E' da sottolineare una maggiore prevalenza di familiarità per CAD, di insufficienza renale e di una età più giovane dei pazienti polimorfici, anche se queste differenze erano ai limiti della significatività statistica. Non vi erano differenze per quanto

riguarda l'indicazione alla coronarografia, e nessuna differenza in termini di parametri ematochimici (Tabella 2)

Eccetto che per la terapia diuretica (più frequentemente utilizzata nei pazienti normali (33.8% vs 12.1%, $p = 0.008$), non sono osservate differenze maggiori tra i due gruppi per quanto riguarda la terapia cardiovascolare al momento del ricovero.

variabile	TT	TNT	valore di p
coronaropatia CAD (%)	67.2	66.7	0.95
Numero di Vasi Malati			0.79
0	32.8	33.3	
1	28.6	27.3	
2	17.2	24.2	
≥3	21.3	15.2	
Malattia del tronco comune	9.1	3.0	0.23
Malattia trivasale o del tronco comune (%)	27.9	27.3	0.94
Coronaria sinistra	44.4	39.4	0.57
Circonflessa	36.2	36.4	0.98
Coronaria destra	42.8	39.4	0.70
Lunghezza della lesione	16.8 ± 12.2	12.7 ± 5.5	0.11
percento di stenosi	85.5 ± 16	83 ± 15.5	0.45
Diametro di riferimento (mm)	3.01 ± 0.69	3.05 ± 0.69	0.75
Calcificazione (%)	25.7	28	0.8
Occlusione cronica (%)	18.2	8	0.19
Restenosi (%)	4.8	8	0.47
Biforcazione (%)	16.1	12	0.85
Trombo intacoronarico (%)	6.	8	0.66
flusso TIMI			0.18
3	72.3	92	
2	3.8	0	
1	3.3	0	
0	20.5	8	

Tabella 2. Caratteristiche angiografiche in base al polimorfismo Ile164Thr del recettore beta 2 adrenergico.

4.2 Caratteristiche angiografiche

Come mostrato nelle Figure 9 e 10,

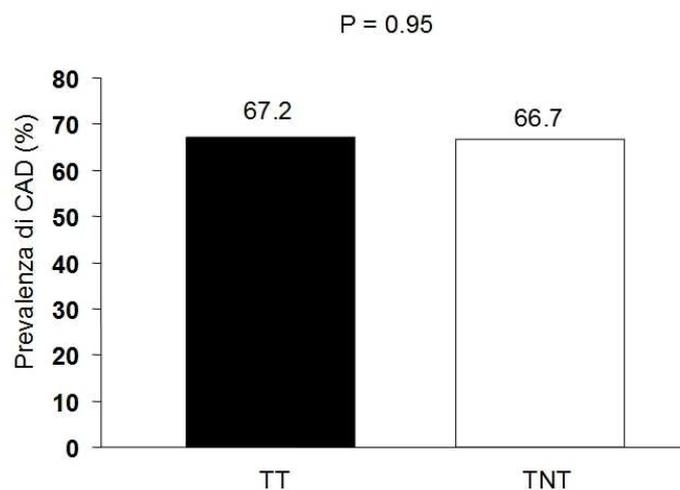


Figura 9 Il grafico a barre mostra che la prevalenza di coronaropatia è paragonabile nei due gruppi di pazienti, dove TT indica coloro i quali sono portatori della variante nativa (Thr/Thr) e TNT i portatori della variante (Ile/Thr)

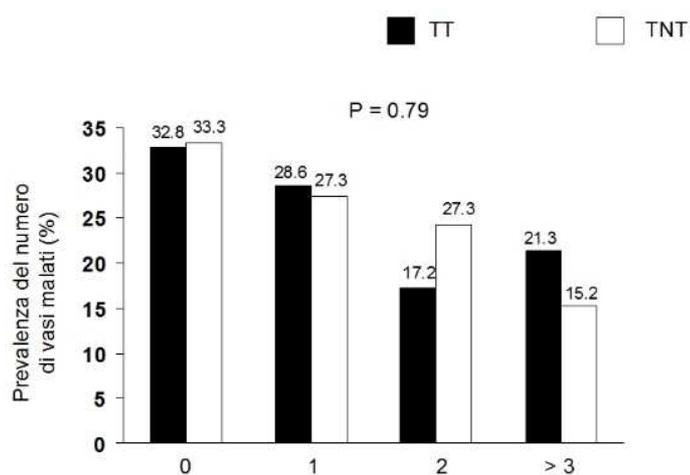


Figura 10 Il grafico a barre mostra la distribuzione del numero di coronarie malate simile tra i soggetti normali (TT) ed i soggetti polimorfici (TNT).

Non si è osservata nessuna differenza in termini di prevalenza di malattia aterosclerotica tra i due gruppi di pazienti. Simili dati sono stati osservati per quanto riguarda la prevalenza di malattia del tronco comune (figura 11) o di una malattia severa (definita come malattia trivasale e/o malattia del tronco comune)(figura 12). Nessuna differenza è stata osservata per quanto riguarda le caratteristiche morfologiche delle stenosi coronariche (Tabella 2), della dimensione dei vasi, lunghezza e percento di stenosi.

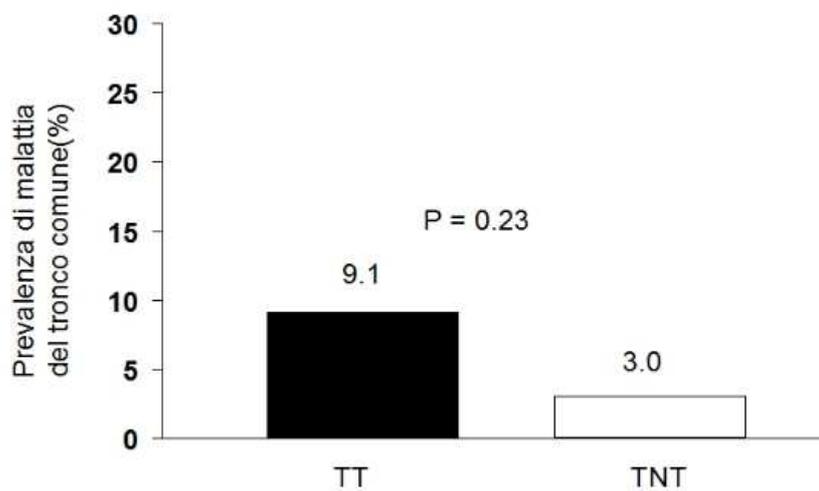


Figura 11 Il grafico a barre mostra la prevalenza della malattia del tronco comune simile tra i soggetti normali (TT) ed i soggetti polimorfici (TNT).

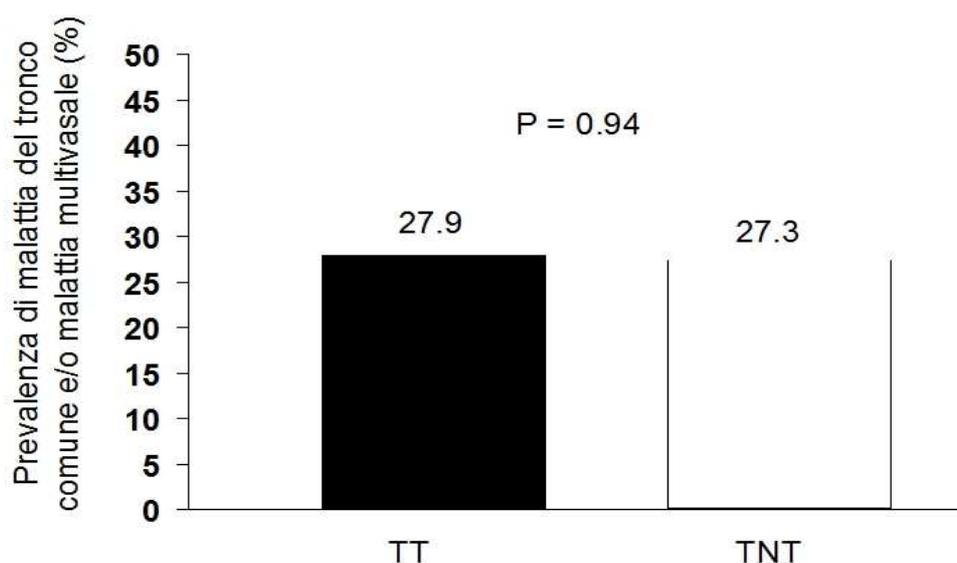


Figura 12 Il grafico a barre mostra la prevalenza di malattia coronarica severa (definita come malattia del tronco comune e/o malattia travasale) simile tra i soggetti normali (TT) ed i soggetti polimorfici (TNT)

4.3 Malattia carotidea

L'ecografia carotidea è stata eseguita in 343 pazienti consecutivi (37.9%), di cui 13 erano polimorfici. Come mostrato nella Figura 13, non si è osservato nessuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi in termini di IMT sia medio (0.94 ± 0.24 nel gruppo normale (TT) vs 0.87 ± 0.19 nei polimorfici (TNT), $p = 0.33$) che massimale (1.02 ± 0.28 nel gruppo normale (TT) vs 0.92 ± 0.22 nei polimorfici (TNT), $p = 0.22$). Risultati simili sono stati osservati in termini prevalenza

di placche significative, definita come $IMT \geq 1.5$ mm, sia come IMT medio che massimo (Figura 14).

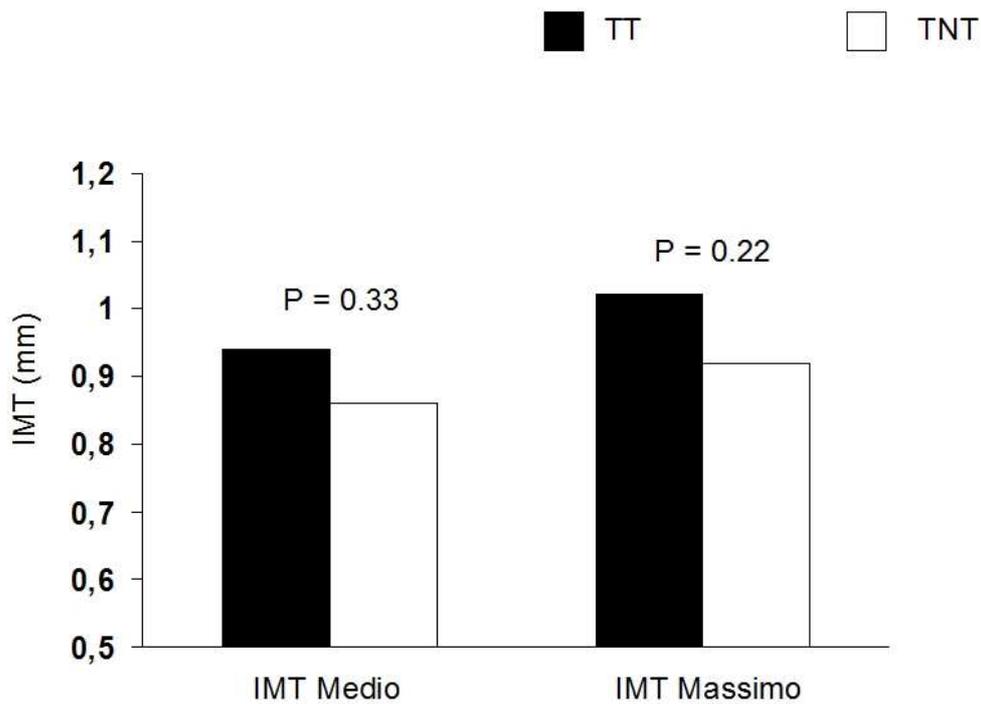


Figura 13 Il grafico a barre mostra il livelli di spessore carotide (IMT = Intima-media thickness) tra i soggetti normali (TT) ed i soggetti polimorfici (TNT). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra i due gruppi sia nella valutazione dello spessore medio tra le due carotidi (IMT Medio) sia dello spessore massimo (IMT Massimo)

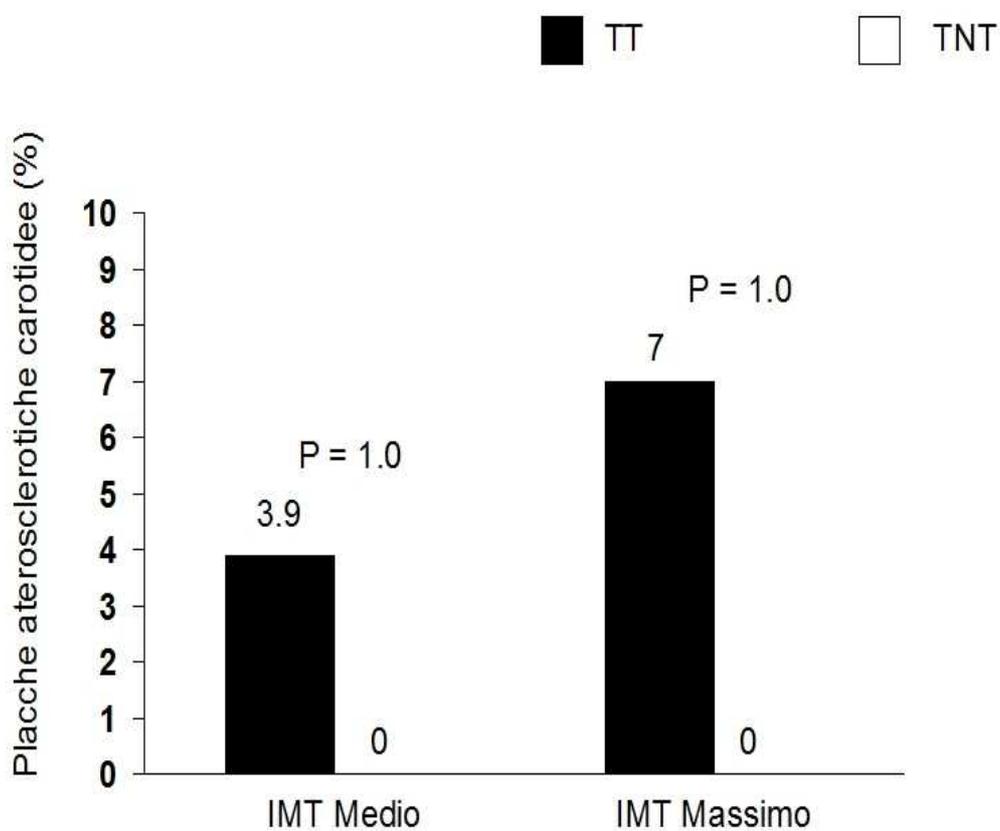


Figura 14 Il grafico a barre mostra la prevalenza di placche carotidee significative (definite come valori di $IMT \geq 1.5$ mm) tra i soggetti normali (TT) ed i soggetti polimorfici (TNT). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra i due gruppi sia nella valutazione dello spessore medio tra le due carotidi (IMT Medio) sia dello spessore massimo (IMT Massimo)

5. DISCUSSIONE

Questo è il più grande studio prospettico condotto finora per valutare l'associazione tra il polimorfismo in posizione 164 e l'estensione dell'ateromasia coronarica e carotidea. La principale conclusione del nostro studio è che il polimorfismo del recettore beta2 adrenergico Ile164 non è correlato con il grado di coronaropatia e ispessimento medio-intimale carotideo.

5.1 Polimorfismi dei recettori beta2-adrenergici e coronaropatia

Ampio interesse è stato posto nel ruolo che il polimorfismo abbia nell'estensione di coronaropatia. Infatti, i recettori beta2 adrenergici sono largamente espressi nel sistema cardiovascolare, dove modulano l'inotropismo ed il cronotropismo cardiaci (29, 32) ed inoltre intervengono nella regolazione della vasodilatazione coronarica(33). Recentemente

è stato dimostrato che i recettori beta2 adrenergici endoteliali contribuiscono al vasorilassamento e all'angiogenesi post-ischemica (30). Si è visto che la sequenza del recettore beta2 adrenergico umano è altamente polimorfica. In particolare, la sostituzione della treonina in posizione 164 con isoleucina è associata con un decremento dell'attività, sia basale che mediata dall'agonista, dell'adenilato ciclastasi ed una diminuita affinità per i beta2 agonisti (34). In modo simile l'attività vasodilatatrice dei portatori della variante Ile164 del recettore beta2 adrenergico è pregiudicata nell'uomo (34). Di recente, Piscione e altri (35), hanno trovato che la proliferazione di cellule muscolari lisce vascolari è ridotta nei pazienti portatori del polimorfismo Ile164Thr come dimostrato dalla diminuita proliferazione cellulare. Così in via speculativa, si potrebbe considerare come un recettore beta2 adrenergico disfunzionale possa favorire una ridotta cellularità, a livello delle placche aterosclerotiche (per calo nella proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari) che condurrebbe allo sviluppo di placche più facilmente soggette ad instabilità e rottura. Inoltre, poiché le cellule muscolari lisce vascolari sono le uniche

produttrici della componente di tensione della matrice extracellulare (in particolare del collagene di tipo 1), una diminuzione nel loro numero porterebbe ad una ridotta produzione di molecole stabilizzanti la placca è pertanto a ridotta stabilità di placca. Un numero assai limitato di studi ha fin qui investigato la relazione tra il polimorfismo Ile164Thr e la coronaropatia. Barbato ed altri, in una popolazione di 786 pazienti consecutivi sottoposti ad angiografia coronarica non ha trovato alcuna differenza nella prevalenza del polimorfismo in posizione 164 tra pazienti affetti da coronaropatia rispetto a quelli non affetti (37). Risultati opposti sono stati osservati da Piscione ed altri. Questi ultimi hanno valutato la relazione tra polimorfismo Ile164Thr e la coronaropatia in più di 300 pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica e confrontati con un gruppo di pazienti controllo (donatori sani). Piscione e altri hanno osservato che l'esordio della cardiopatia ischemica era significativamente più precoce in coloro i quali esprimevano tale polimorfismo. Tuttavia, la differenza è stata statisticamente modesta ($p=0,04$) e non è stata corretta per le variabili cliniche. Inoltre la differenza potrebbe essere considerata ancora meno

rilevante da un punto di vista prettamente clinico, essendo di soli 2,7 anni. La presenza di coronaropatia grave era stata confermata angiograficamente attraverso l'osservazione di una più elevata incidenza di lesioni di tipo B2 e C, un più alto numero di casi di malattia multivasale ed un numero apprezzabilmente maggiore di lesioni gravi che necessitavano di trattamento con PCI (percutaneous catheter intervention). Per di più, essi hanno osservato un numero significativamente maggiore di placche aterosclerotiche nei pazienti che presentano insieme la variante Ile164 ed un valore IMT (intima media thickness) più grande.

Il nostro studio, con l'inclusione di 904 pazienti rappresenta attualmente il più grande studio sull'associazione tra polimorfismo Ile164Thr e aterosclerosi coronarica e carotidea. Differentemente dallo studio di Piscione ed altri, abbiamo arruolato una popolazione consecutiva di pazienti sottoposti ad esame coronarografico. Diversamente dal precedente studio, ed in accordo con Barbato ed altri, non abbiamo trovato una relazione tra tale polimorfismo e la severità della coronaropatia

e dell'aterosclerosi carotidea.

6. LIMITAZIONI

Uno dei limiti maggiori dello studio è rappresentato dalla scarsa prevalenza della variante polimorfica, che limita il potere statistico soprattutto nel confronto delle caratteristiche cliniche tra i due gruppi di pazienti. Uno studio caso controllo avrebbe certamente superato il limite della disparità tra la popolazione, ma il nostro studio è stato volutamente condotto su una popolazione continua di pazienti in modo da evitare l'eventuale bias di selezione dei pazienti fatta in maniera retrospettiva. Non è stato utilizzato un gruppo controllo di donatori sani, comunemente utilizzati in studi di genetica, in quanto la coronarografia rappresenta la metodica più valida nella valutazione dell'ateromasi coronarica, laddove l'assenza di sintomi (angina e/o dispnea) o esami diagnostici negativi che qualificano un donatore sano, hanno un limitato valore predittivo negativo, soprattutto in pazienti anziani e diabetici, in larga prevalenza inclusi nel nostro studio. Infine la valutazione dell'aterosclerosi coronarica è stata valutata mediante angiografia coronarica. L'utilizzo di ultrasonografia

intravascolare avrebbe certamente fornito informazioni aggiuntive rilevanti e migliorato i risultati del nostro studio.

7. CONCLUSIONI

Il nostro studio ha mostrato una bassa prevalenza del polimorfismo Ile164Thr del recettore beta-2 adrenergico, osservata in 33 pazienti (3,6%). Il polimorfismo in posizione 164 non si associava ad una maggiore incidenza di coronaropatia rispetto al gruppo controllo. Dati simili sono stati osservati in termini di spessore medio-intimale. In attesa di ulteriori studi di maggiori dimensioni, tale polimorfismo non può essere considerato un fattore di rischio cardiovascolare.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Commento ai dati di mortalità per causa –anno 2006. Roma ISTAT, 2009.
- 2) Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res* 2006; 4: 53-56.
- 3) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874.
- 4) Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144: 285-301.
- 5) Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparisons of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 36-47.
- 6) Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:441-448.
- 7) Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* 2006; 259: 381-92.
- 8) Stary, Herbert C. MD, Chair; Chandler, A. Bleakley MD; Dinsmore, Robert E. MD et al. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, AHA. *Circulation* 1995; Sept 92(5): 1355-137
- 9) Dhaliwal Bs, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1999; 286: 191-20

- 10) Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- 11) Shah Pk. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:15-22.
- 12) R Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2007; 115: e69-171.
- 13) Henry C. McGill, Jr, MD; C. Alex McMahan, PhD; Edward E. Herderick, BS; Arthur W. Zieske, MD; Gray T. Malcom, PhD; Richard E. Tracy, MD; Jack P. Strong, MD, for the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group Obesity Accelerates the Progression of Coronary Atherosclerosis in Young Men. *Circulation* 2002;105:2712.
- 14) Mazzolai L, Hayoz D. The renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Current hypertension reports* 2006 Apr;8(1):47-53.
- 15) Ann Marie Schmidt, Shi Du Yan, Jean-Luc Wautier, David Stern Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products. A Mechanism for Chronic Vascular Dysfunction in Diabetic Vasculopathy and Atherosclerosis *Circulation Research* 1999;84:489-497.
- 16) Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis : novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006; 110: 1868-73.

- 17) Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1646–54.
- 18) Keavney B, Watkins H. Evolution of genetic analysis strategies in coronary heart disease: a case of unnatural selection? *Eur Heart J* 2001 Feb;22(4):294-9.
- 19) K. J. Williams, I Tans The response to retention Hypothesis of early atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995; 15: 551-561.
- 20) Steve E. Humphries; Paul M. Ridker; Philippa J. Talmud, Genetic Testing for Cardiovascular Disease Susceptibility: A Useful Clinical Management Tool or Possible Misinformation? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004;24:628.
- 21) Carlo Cavallotti · Paolo Bruzzone · Massimo Mancone, Catecholaminergic nerve fibers and adrenergic receptors in the human heart and coronary vessels. *Heart Vessels* (2002) 17:30–35.
- 22) Kobilka BK, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Dixon RA, Keller P, Caron MG, Lefkowitz RJ. Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J Biol Chem* 1987 May 25;262(15):7321-7.
- 23) Leineweber K, Brodde OE, Beta2-adrenoceptor polymorphisms: relation between in vitro and in vivo phenotypes. *Life Sci* 2004 Apr23;74(23):2803-14.
- 24) Scott MG, Swan C, Wheatley AP, Hall IP., Identification of novel polymorphisms within the promoter region of the human beta2 adrenergic receptor gene. *J Pharmacol* 1999 Feb;126(4):841-4.

- 25) O.E. Brodde; *Pharmacology & Therapeutics* 2008;117: 1-29.
- 26) Dishy V, Sofowora GG, Xie HG, et al.. The effect of common polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *N Engl J Med* 2001;345:1030–5.
- 27) S B Liggett, L E Wagoner, L L Craft, R W Hornung, B D Hoit, T C McIntosh, and R A Walsh, The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure *J Clin Invest* 1998Oct15; 102(8): 1534–1539.
- 28) Bruck H, Leineweber K, Park J, Weber M, Heusch G, Philipp T, Brodde OE, Human beta2-adrenergic receptor gene haplotypes and venodilation in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2005 Sep;78(3):232-8.
- 29) Baumgart D, Haude M, Goerge G, et al.. Augmented β -adrenergic constriction of atherosclerotic human coronary arteries. *Circulation* 1999;99:2090–7.
- 30) Barbato E, Piscione F, Bartunek J, et al. Role of β 2-adrenergic receptors in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2005;111:288–94.
- 31) Julius BK, Vassalli G, Mandinov L, et al.. β -adrenoceptor blockade prevents exercise-induced vasoconstriction of stenotic coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1499–505.
- 32) Indolfi C, Piscione F, Villari B, et al. Role of alpha 2-adrenoceptors in normal and atherosclerotic human coronary circulation *Circulation* 1992 Oct;86(4):1116-24.

- 33) Barbato E, Bartunek J, Wyffels E, et al.. Effects of intravenous dobutamine on coronary vasomotion in humans. *J Am Coll Cardiol* 2003 Nov 5;42(9):1596-601.
- 34) Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* 2006;100:323–37.
- 35) Piscione F, Iaccarino G, Galasso G, Cipolletta E, Rao MA, Brevetti G, Piccolo R, Trimarco B, Chiariello M; Effects of Ile164 polymorphism of beta2-adrenergic receptor gene on coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 52(17):1381-1388.
- 36) Barbato E; Role of adrenergic receptors in human coronary vasomotion. *Heart*. 2009 Apr;95(7):603-8.
- 37) Barbato E, Berger A, Delrue L, Van Durme F, Manoharan G, Boussy T, Heyndrickx GR, De Bruyne B, Ciampi Q, Vanderheyden M, Wijns W, Bartunek J. GLU-27 variant of beta2-adrenergic receptor polymorphisms is an independent risk factor for coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* .2007 Oct;194(2):e80-6. .