

UNIVERSITA' DEGLI STUDI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca
Ipertensione e Prevenzione del rischio cardiovascolare

**IL SOVRACCARICO DI FERRO:
MODULATORE DELLA RISPOSTA ADRENERGICA**

Relatore: Chiar.mo Prof. Giuseppe MANCIA

Correlatore: Prof. Alberto PIPERNO

Tesi di dottorato di ricerca:

Dott.ssa Raffaella MARIANI

Anno Accademico 2008-2009

INDICE

INTRODUZIONE

SISTEMA NERVOSO SIMPATICO	pag 2
Ipertensione arteriosa	pag 3
Insufficienza renale cronica	pag 7
Sindrome metabolica	pag 10
Scompenso cardiaco	pag 12
Cirrosi epatica	pag 14
Ossido nitrico	pag 16
EMOCROMATOSI EREDITARIA	pag 19
Emocromatosi HFE correlata	pag 19
FERRO e STRESS OSSIDATIVO	pag 26
Ferro e fegato	pag 26
Ferro e cuore	pag 28
Ferro e aterosclerosi	pag 28
SCOPO	pag 31
MATERIALI e METODI	pag 33
RISULTATI	pag 38
DISCUSSIONE	pag 45
BIBLIOGRAFIA	pag 50

INTRODUZIONE

SISTEMA NERVOSO SIMPATICO

Storicamente una delle prime patologie in cui si è sospettato e si è quindi iniziato ad indagare il ruolo patogenetico primitivo del sistema nervoso simpatico è stata l'ipertensione arteriosa essenziale.

Alterazioni della funzione neuroadrenergica sono state inoltre descritte in altre condizioni patologiche, quali le disautonomie primitive e secondarie, il diabete mellito, l'obesità e l'insufficienza renale che, pur non potendosi considerare vere e proprie patologie cardiovascolari, coinvolgono nel loro decorso clinico il cuore e il sistema cardiocircolatorio, favorendo la comparsa di importanti complicanze quali la cardiopatia ischemica, lo scompenso cardiocircolatorio, l'ipertensione e la morte improvvisa (Mancia G 1983, Mancia G 2001). In alcune di queste condizioni morbose l'entità della compromissione della funzione autonoma risulta essere proporzionale alla gravità clinica della malattia, influenzandone negativamente la prognosi e condizionandone il decorso (Vinik AI 1999).

L'iperattività del sistema nervoso simpatico è stata identificata come caratteristica di diverse patologie cardiovascolari quali la cardiopatia ischemica (Graham LN et al. 2004), lo scompenso cardiaco cronico (Leimbach Jr WN et al. 1986) e l'ipertensione (Grassi G 1998). Tale alterazione è stata riportata anche in altre numerose patologie quali l'insufficienza renale (Converse Jr RL et al. 1992), il diabete mellito (Huggett RJ et al. 2003), l'obesità (Grassi G et al. 2007), la sindrome metabolica (Grassi et al. 2005), la sindrome delle apnee ostruttive (Narkiewicz K et al. 1997), la pre-eclampsia (Greenwood JP et al. 2003), la depressione (Barton DA et al. 2007) e la colite ulcerosa (Furlan R et al. 2006).

Iperensione arteriosa. Una delle prime patologie in cui si è sospettato e si è quindi iniziato ad indagare il ruolo patogenetico primitivo del sistema nervoso simpatico è stata l'ipertensione arteriosa essenziale.

Gli studi mediante metodica diretta e indiretta per la valutazione dell'attività neuroadrenergica hanno univocamente mostrato che l'iperattività simpatica caratterizza tutte le forme di ipertensione essenziale (Anderson EA et al. 1989, Grassi G et al. 1998); è già presente in soggetti con familiarità positiva per ipertensione prima che si verifichi un chiaro incremento pressorio (Yamada Y et al. 1988), è evidente nella fase di ipertensione borderline (Anderson EA et al. 1989), caratterizza l'ipertensione arteriosa di grado moderato e severo (Grassi G et al. 1998). Inoltre l'entità dell'iperattività è proporzionale al grado dell'ipertensione arteriosa supportando l'ipotesi che i due fenomeni sono legati da una relazione di causa-effetto (Grassi G et al. 1998). La relazione tra iperattività simpatica centrale e ipertensione non è semplicemente associativa ma l'incremento del sistema nervoso adrenergico giocherebbe un ruolo di promozione nello sviluppo dell'ipertensione (Abboud FM 1982; Grassi G 1998, Grassi G 2004a, Grassi G 2004b, Smith PA et al. 2004). Alcune forme di ipertensione secondaria quali l'iperaldosteronismo primario, la sindrome di Cushing e l'ipertensione nefrovascolare non presentano un incremento dell'attività adrenergica, sostenendo la specificità/peculiarità della condizione di iperattività adrenergica nell'ipertensione arteriosa essenziale (Grassi G et al. 1999, Grassi G et al. 1998, Johansson M et al. 1999). Studi attraverso tecniche radioisotopiche (noradrenalina e adrenalina marcate con trizio, analoghi sintetici della noradrenalina marcati con isotopi radioattivi) e tecnica microneurografica sostengono che l'iperattività che caratterizza l'ipertensione arteriosa interessa quasi tutto il sistema cardiovascolare. Nell'ipertensione arteriosa il rilascio di norepinefrine dalle terminazioni nervose adrenergiche è aumentato in diversi distretti quali il cervello, il rene e il cuore (Esler M 1997, Grassi G et al. 1999).

Diverse sono le ipotesi avanzate sulle cause responsabili dell'incremento del "drive" simpatico in soggetti ipertesi (Mancia G 1997, Grassi G 1998). Una prima ipotesi "centrale" sostiene un incremento dell'attività simpatica a partenza dal sistema nervoso centrale: una disfunzione dei centri ipotalamici, midollari e pontini, deputati alla regolazione adrenergica favorirebbe un incremento dell'attività simpatica. Una seconda ipotesi "umorale" considera l'attivazione adrenergica legata agli effetti simpatoeccitatori centrali di sostanze neuroumorali (angiotensinaII, aldosterone, insulina, leptina, ossido nitrico, endoteline) la cui produzione è incrementata nello stato ipertensivo. Ad esempio l'angiotensina II svolge effetti facilitatori sulla funzione adrenergica potenziando la scarica nervosa simpatica centrale, la secrezione presinaptica di noradrenalina, la ricaptazione adrenergica dalle terminazioni sinaptiche, le risposte vasocostrittrici a livello dell'effettore arteriolare (Mancia G et al 1996, Grassi G 2001). E' stato altresì documentato che lo stato di iperinsulinemia secondario allo stato di insulino-resistenza (che caratterizza una frazione non trascurabile di pazienti ipertesi) può favorire lo sviluppo di ipertono adrenergico (Sherrer U et al. 1997). Tuttavia le interazioni insulina-simpatico sono complesse, in quanto è stato osservato che una condizione di attivazione simpatica può favorire lo sviluppo di insulino-resistenza (Jamerson KA et al. 1993). In altre parole, non è al momento possibile definire se l'iperinsulinemia sia la causa o la conseguenza dell'ipertono adrenergico.

Una terza ipotesi "riflessa" identifica un'alterazione del controllo inibitorio riflesso esercitato dai barocettori arteriosi (aortici e carotidei), dai recettori cardiopolmonari di volume e dai chemocettori arteriosi sull'efflusso simpatico a partenza dal sistema nervoso centrale (Mancia G et al. 1997). Nel paziente iperteso la modulazione del tono vasocostrittore adrenergico esercitata dai barorecettori arteriosi non risulta deficitaria al contrario si osserva una compromissione del controllo vagale della frequenza cardiaca (Grassi G et al. 1998a,). E' più plausibile che l'attivazione simpatica nell'ipertensione

arteriosa sia dovuta ad una disfunzione del controllo riflesso esercitato dai recettori di volume cardiopolmonari la cui modulazione risulta marcatamente compromessa (Mancia G et al. 1997, Grassi G et al. 1998, Grassi G et al. 1988, Mancia G et al. 1997). Tale disfunzione risulta spiccatamente compromessa nell'ipertensione complicata da ipertrofia cardiaca (Grassi G et al. 1988).

L'attivazione del sistema nervoso simpatico contribuisce mediante diversi meccanismi allo sviluppo del danno d'organo di frequente riscontro nello stato ipertensivo e al determinismo del profilo di rischio cardiovascolare globale del paziente (Mancia G et al. 1999). Si osservano infatti alterazioni dirette sul cuore, sui vasi, sulla funzione renale e sul profilo metabolico del paziente.

Nel corso degli ultimi anni accanto ai fattori emodinamici (sovraccarico pressorio e di volume) fattori "non emodinamici" hanno dimostrato la capacità di promuovere direttamente e indirettamente lo sviluppo di alterazioni strutturali cardiovascolari (Mancia G et al. 1999). Diverse sono le evidenze raccolte sul ruolo pro-ipertrofico dei fattori simpatici. Studi in vitro e vivo nell'animale hanno dimostrato che la noradrenalina stimola la crescita dei miociti e quindi favorisce lo sviluppo di ipertrofia cardiaca (Patel MB et al. 1991, Tarazi RC et al. 1982, Bevan RD 1984, Long CS et al. 1989). I pazienti ipertesi con ipertrofia ventricolare sinistra presentano valori plasmatici di catecolamine e valori di traffico nervoso simpatico più elevati rispetto a quanto osservato negli ipertesi senza danno d'organo (Kelm M et al. 1996, Greenwood JP et al. 2001, Grassi G et al. 1998a, Schlaich MP et al. 2003). L'ipertrofia ventricolare sinistra, valutata attraverso risonanza magnetica, nei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale è correlata all'incremento dell'attività adrenergica (Burns J et al. 2007). Altre alterazioni quali la disfunzione diastolica ventricolare sinistra sembrano essere associate ad un ipertono adrenergico indipendentemente dalla presenza di ipertrofia cardiaca (

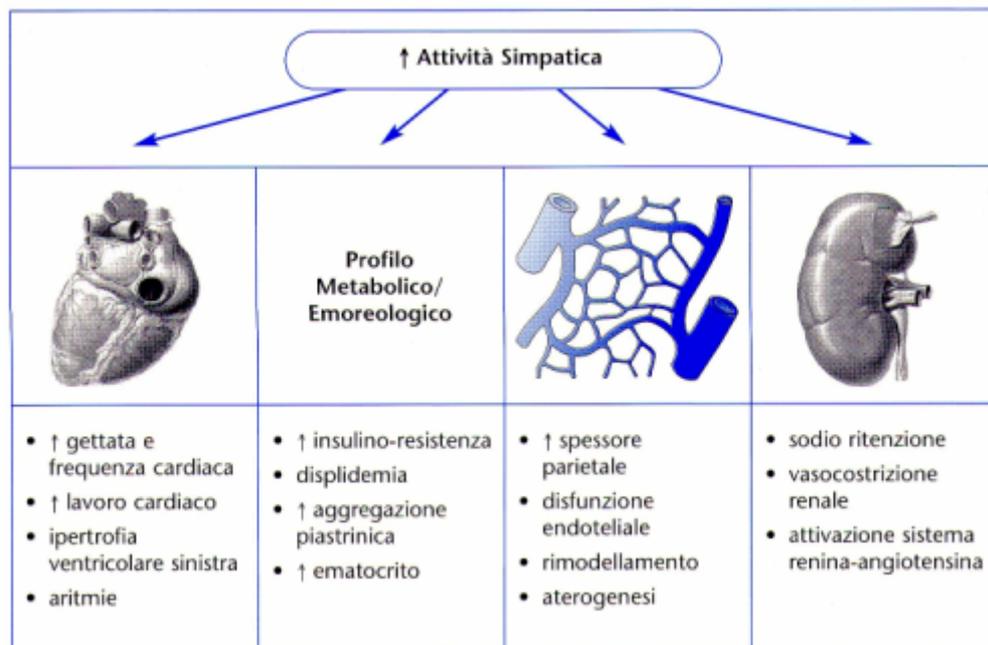
Grassi G et al. 2009). Tutto ciò sostiene il ruolo dell'ipertono adrenergico nello sviluppo delle alterazioni cardiache che caratterizzano il danno d'organo dell'ipertensione.

Oltre all'interessamento cardiaco il distretto vascolare arterioso costituisce un altro bersaglio del danno d'organo secondario all'ipertensione.

Studi sia sull'animale che sull'uomo hanno mostrato che il fenomeno del rimodellamento vascolare nell'ipertensione è mediato da fattori simpatici. In particolare a livello delle piccole arterie l'attività adrenergica gioca un ruolo nello sviluppo del processo di rimodellamento eutrofico (Mancia G et al. 1999), a livello delle grosse e medie arterie il sistema adrenergico è profondamente coinvolto nella regolazione della distensibilità e rigidità arteriosa (Grassi G et al. 1999, Mancia G et al. 1999). La stimolazione simpatica determina dapprima il fenomeno del rimodellamento arteriolare, il danno endoteliale e quindi lo sviluppo dell'ipertrofia vascolare (Folkow B. 1995, Egan B et al. 1987). L'attivazione cronica del sistema simpatico può contribuire alla disfunzione endoteliale e al conseguente sviluppo dell'aterosclerosi (Neunteufl T et al. 1997). I processi di rimodellamento vascolare e disfunzione endoteliale secondari all'iperattività del sistema adrenergico rappresentano il mezzo attraverso cui il sistema precipita e accelera lo sviluppo della patologia cardiovascolare.

A livello renale un incremento delle influenze adrenergiche favorisce la ritenzione sodica, la stimolazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e il processo di vasocostrizione locale (Mancia G et al 1999, Grassi G et al. 1988). Si osservano di conseguenza un'ipervolemia assoluta o relativa e la presenza in circolo di angiotensina II e aldosterone. L'angiotensina II determina, sia a livello sistemico che distrettuale, effetti pro-ipertensivi, pro-ipertrofici, pro-aritmici e pro-aterogeni potenziando gli effetti deleteri della stimolazione adrenergica; l'aldosterone facilita il processo della fibrosi miocardia tissutale .

FIGURA 1. Effetti cardiovascolari, metabolici e renali dell'ipertono adrenergico nell'ipertensione arteriosa (Grassi G 2002)



Insufficienza renale cronica. Nell'insufficienza renale cronica si riscontra un incremento dell'attività del sistema nervoso simpatico che contribuisce a determinarne la prognosi sfavorevole. Il riscontro di aumentati valori di catecolamine plasmatiche e l'aumentata sensibilità all'azione delle norepinefrine sono stati considerati i primi indicatori di iperattività adrenergica nell'insufficienza renale cronica (IRC) (Ishii M et al. 1983, McGath BP et al. 1978). Tale evidenza è stata sostenuta anche dalla valutazione diretta attraverso microneurografia (Schohn D et al. 1985) .

L'incremento del drive adrenergico è stato osservato sia nell'insufficienza renale avanzata (pazienti dializzati) che in forme meno severe (Koomans HA et al. 2009); nei pazienti con rene policistico in fase iniziale l'incrementata attività si manifesta solamente in associazione all'ipertensione arteriosa (Klein IH et al. 2001).

Diversi sono i fattori che concorrono ad alterare il sistema simpatico. L'ischemia renale è probabilmente il principale fattore (Faber JE et al. 1983); l'accumulo renale di

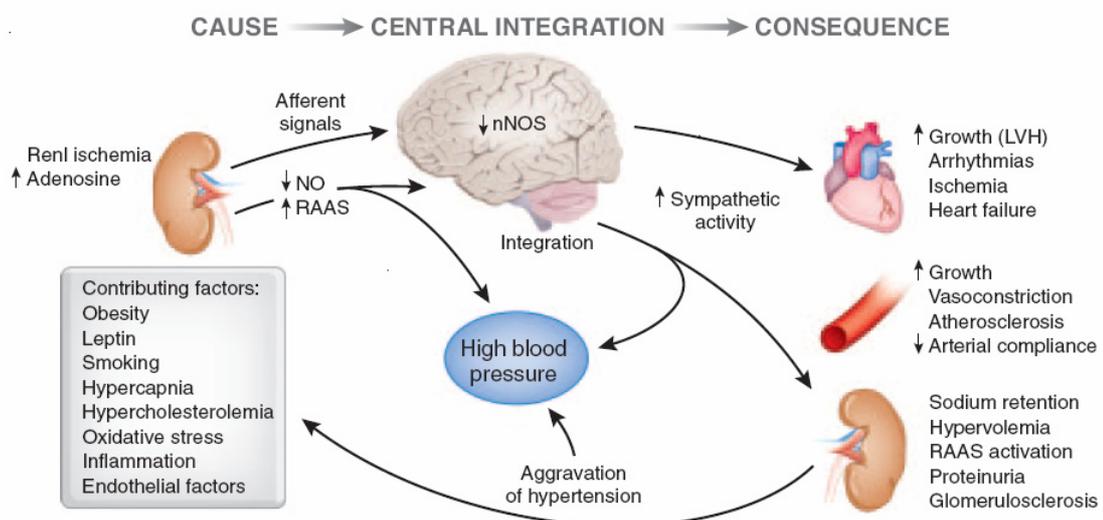
adenosina indotto dall'ischemia determina un rapido incremento dell'attività adrenergica (Katholi RE et al. 1982) attraverso segnali afferenti che influenzano il controllo centrale simpatico (Katholi RE et al. 1984, Katholi RE et al. 1985). L'ischemia stimola anche il sistema renina-angiotensina-aldosterone; l'angiotensina II contribuisce alla stimolazione simpatica attraverso meccanismi sia centrali che periferici : a) agendo direttamente sul centro vasomotore (a livello del sistema nervoso centrale l'area postrema della medulla oblungata presenta un alta densità di recettori per l'angiotensina II), b) facilitando la trasmissione simpatica a livello delle terminazioni nervose incrementando il rilascio e diminuendo il reuptake presinaptico delle catecolamine (Reid IA 1992). E' anche possibile che la ridotta disponibilità di ossido nitrico contribuisca all'iperattività simpatica (Krukoff TL 1999). Diversi fattori concorrerebbero alla disfunzione del pathway dell'ossido nitrico: ridotta disponibilità dei precursori dell'ossido nitrico, diminuzione dell'ossido nitrico sintetasi (NOS), accumulo di inibitori endogeni naturali dell'ossido nitrico sintetasi (ADMA), la presenza di ipercolesterolemia che interferisce con l'attività dell'ossido sintetasi (Koomans HA et al. 2009).

Studi su animali in vivo e ex vivo hanno dimostrato che l'ossido nitrico neuronale è il maggior componente coinvolto nella trasduzione del segnale che tonicamente inibisce l'attività simpatica centrale (Cohn JN et al. 2003). Nei topi con insufficienza renale l'ossido nitrico modula anche il controllo nervoso della pressione arteriosa (Ebert TJ et al. 1992); negli animali alcune specifiche aree del cervello, controllate dal sistema simpatico, che sono coinvolte nella regolazione della pressione arteriosa evidenziano un aumentato turnover di norepinefrine rispetto ai controlli (Vallbo Ab et al. 1979) .

L'iperattività del sistema nervoso determina importanti conseguenze sia a livello renale che cardiovascolare (Schlaich M et al. 2009). L'ipertensione è presente nella maggior parte dei pazienti e ricopre un ruolo chiave nel progressivo deterioramento della

funzionalità renale e nell'aumentare la frequenza di eventi cardiovascolari che rappresentano la principale causa di morbilità e mortalità in questo gruppo di pazienti (Kasiske BL et al. 1993, Gansenvoort RT et al. 1995). L'ipervolemia e l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone contribuiscono in modo significativo all'innalzamento della pressione arteriosa (Ritz E et al. 1996). L'attività simpatica contribuisce allo sviluppo, al mantenimento e all'aggravamento dell'ipertensione, contribuisce inoltre a promuovere la glomerulosclerosi (Adamczak M et al. 2002) e il processo di aterosclerosi (Mancia G et al. 1999, Mangoni AA et al 1997, Failla M et al. 1999). Vasocostrizione, aterosclerosi e proliferazione delle cellule muscolari lisce sono tutte conseguenze dell'iperattività simpatica che concorrono alla progressione della malattia renale qualunque sia la genesi (Campese CM et al 2002, Xu H et al. 20019). L'iperattività simpatica può anche determinare alterazioni funzionali e strutturali del miocardio. L'azione diretta neuromorale contribuisce allo sviluppo prematuro di ipertrofia ventricolare sinistra, insufficienza coronarica e aritmie cardiache, che rappresentano le cause di morte nel 40-50% dei pazienti con IRC. I livelli di catecolamine sono fattori predittivi indipendenti di eventi cardiovascolari fatali e non fatali (Kotanko P. 2006).

FIGURA 2. Cause e conseguenze dell'ipertono simpatico nell'IRC (Schlaich MP 2009)



Sindrome Metabolica. L'attivazione del sistema nervoso simpatico è coinvolta nella patogenesi delle componenti che caratterizzano la sindrome metabolica e si associa ad un aumentato rischio cardiovascolare. La condizione di insulino resistenza caratterizza tutte le componenti della sindrome metabolica (Tentolouris N et al. 2008, Reaven GM 1993). Nell'uomo un'iperinsulinemia acuta euglicemica, sia fisiologica che farmacologica, si associa ad un aumento dell'attività simpatica come è stato evidenziato dalla rilevazione dei valori plasmatici di catecolamine (O'Hare JA et al. 1989), dallo spillover di norepinefrine plasmatiche (Lembo G et al. 1992), o dalla registrazione diretta microneurografica (Anderson EA et al. 1991, Berne C et al. 1992). Numerose evidenze sperimentali sostengono che l'attivazione simpatica dell'insulina non riconosce meccanismi locali ma centrali (Scherrer U et al. 1997, Muntzel MS et al. 1994).

In alcune delle diverse componenti della sindrome metabolica si riscontrano aumentati livelli di leptina, anch'essa responsabile di un incremento dell'attività simpatica mediante un meccanismo di attivazione centrale. Dati sperimentali hanno evidenziato un'azione della leptina a livello del nucleo arcuato dell'ipotalamo giocando un ruolo importante nel controllo dell'attivazione simpatica; tale interazione spiegherebbe anche gli effetti cardiovascolari della leptina (Rahmouini K et al. 2007). L'aumento persistente dell'insulina, della leptina o di entrambe indurrebbe un'attivazione del sistema nervoso simpatico nei soggetti con sindrome metabolica e sarebbe implicato sia nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa che dell'aterosclerosi in quanto entrambe hanno effetto sul sistema circolatorio (Scherrer U et al. 1997, Correia ML et al. 2006). I pazienti con sindrome metabolica presentano un traffico nervoso simpatico aumentato, anche in assenza di ipertensione , rispetto a chi non è affetto dalla sindrome (Grassi G et al. 2005). Oltre a ciò, l'aumento della circonferenza addominale e l'insulino-resistenza sono

direttamente associate all'iperattività simpatica che è a sua volta inversamente associata ad un'alterata sensibilità barorecettoriale (Grassi G et al. 2004c, Grassi G et al. 2005).

Gli individui obesi sono caratterizzati da una marcata attivazione simpatica che contribuisce all'alta prevalenza di ipertensione e malattie cardiovascolari in questa categoria di soggetti. I pazienti con distribuzione del grasso prevalentemente centrale presentano un'attività nervosa muscolare simpatica (MSNA) e concentrazioni plasmatiche di norepinefrina significativamente aumentate rispetto ai soggetti con distribuzione periferica del grasso (Grassi G et al. 2004c). MSNA risulta essere più strettamente associata con il grasso viscerale addominale piuttosto che con la massa grassa totale o il grasso sottocutaneo addominale. Quindi l'aumento del grasso viscerale è un importante fattore che contribuisce all'iperattività del sistema simpatico (Alvarez GE et al. 2002). L'obesità, indipendentemente da ogni altra componente, è in grado di per sé di alterare i meccanismi di regolazione dell'attività del sistema nervoso simpatico (Grassi G et al. 1998b). Nei pazienti con sindrome metabolica la perdita di peso con una dieta ipocalorica e moderata restrizione di sodio riduce lo spillover della noradrenalina e MSNA mentre aumenta la sensibilità barorecettoriale (Straznicky NE et al. 2005). Tutto ciò potrebbe essere dovuto ad una diminuzione dei livelli di leptina, ad un aumento della sensibilità insulinica e della funzionalità barocettiva (Straznicky NE et al. 2005).

In aggiunta il grasso viscerale favorisce la lipolisi con il rilascio di acidi grassi liberi non esterificati, un repentino aumento di tali sostanze si associa sia ad effetti metabolici che a un'attivazione del sistema nervoso simpatico (Paolisso G et al. 2000, Gadegbeku CA et al. 2002).

La sindrome metabolica è molto frequente nei pazienti con diabete mellito di tipo 2, anticipando di molti anni l'insorgenza della malattia (Bianchi C et al. 2008, Monami M et al. 2007). L'insulino resistenza è riconosciuta come meccanismo patogenetico del

diabete di tipo 2 ed è strettamente associata alla predominanza dell'attività simpatica rispetto a quella vagale (Mancia G et al. 2007).

La dislipidemia e in particolar modo l'ipertrigliceridemia così come gli aumentati valori plasmatici di acidi grassi non esterificati possono alterare la funzione barorecettoriale (Gadegbeku CA et al. 2002). L'iperlipemia acuta indotta causa un'alterazione della sensibilità barorecettoriale anche in assenza di insulino resistenza suggerendo un coinvolgimento degli acidi grassi liberi non esterificati nell'attivazione del sistema nervoso simpatico cardiaco (Paolisso G et al. 2000). La dislipidemia, frequentemente presente nella sindrome metabolica può favorire lo sviluppo o l'aggravamento dell'ipertensione negli individui predisposti (Lopes HF et al. 2001). Una dieta ipolipidica appropriata può condurre a una riduzione delle manifestazioni legate all'iperattività simpatica cardiaca.

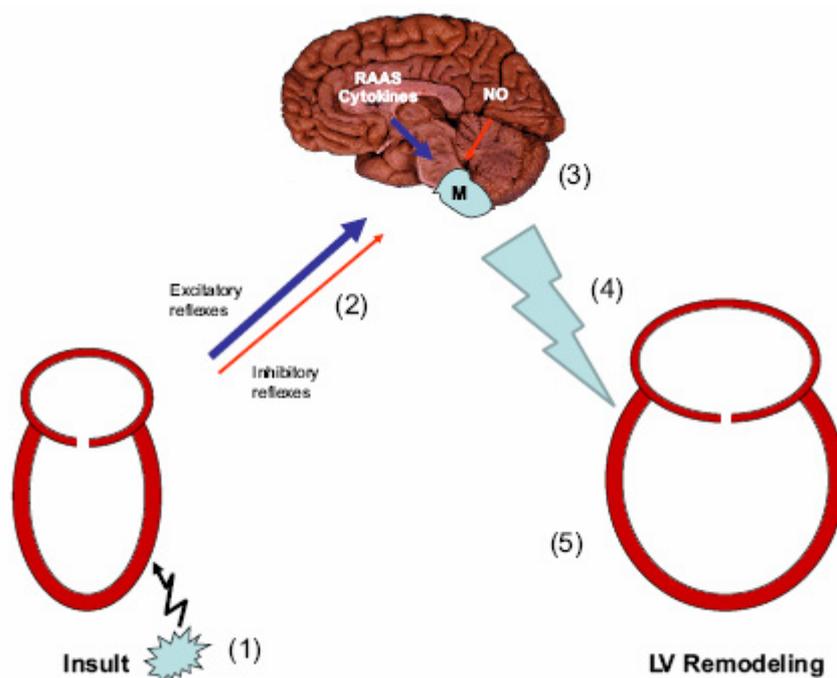
Scompenso Cardiaco. Lo scompenso cardiaco è una condizione caratterizzata da un'interazione continua tra disfunzione miocardica e meccanismi neuroumorali compensatori che comprendono il sistema nervoso simpatico, il sistema renina-angiotensina-aldosterone e le citochine. Inizialmente questi sistemi sono in grado di preservare l'omeostasi cardiovascolare, ma una loro prolungata e continuativa attivazione causa effetti deleteri sulla funzionalità cardiaca conducendo allo scompenso (Triposkiasi F et al. 2009).

Lo scompenso cardiocircolatorio è caratterizzato, oltreché dalle alterazioni emodinamiche (riduzione della gittata cardiaca, ipoperfusione tissutale, ingrandimento delle dimensioni delle camere cardiache, ...) da una marcata attivazione neuroumorale comprendendo anche il sistema nervoso simpatico (Grassi G et al. 1995, Grassi G et al. 1997). L'iperattività simpatica è documentata da aumentati livelli plasmatici di norepinefrina, aumentata attività simpatica centrale e da un elevato rilascio di norepinefrina plasmatica dalle fibre nervose simpatiche attivate (Pepper GS et al. 1999).

L'iperattività simpatica è conseguenza di alterazioni nei sistemi riflessi cardiovascolari, infatti si verifica un aumento dell'attività riflessa simpatica a discapito di quella barorecettoriale (Watson AM et al. 2006); tali anomalie si osservano sia a livello dei meccanismi riflessi cardiaci regionali che a livello del sistema nervoso centrale (Karayannis G et al. 2008, Leenen FH 2007).

L'iperattività si osserva sia nelle forme di scompenso cardiaco lievi che in quelle più avanzate (Grassi G et al. 1995,). L'attività simpatica registrata nello scompenso cardiaco congestizio presenta caratteristiche simili a quella dell'ipertensione arteriosa essenziale (Sahn DJ et al. 1978, Schiller NB et al. 1989, Devereux RB et al. 1977, de Simone G et al. 1994). Quando l'ipertensione arteriosa e lo scompenso cardiaco coesistono il grado di attivazione adrenergica è spiccato, facilitando così lo sviluppo di complicanze aritmiche e ischemiche o aggravando la severità del quadro clinico.

FIGURA 3. Attivazione simpatica nello scompenso cardiaco (Triposkiadis F et al. 2009)



Cirrosi Epatica. Evidenze emodinamiche, biochimiche, radioisotopiche e enurofisiologiche hanno dimostrato che nella cirrosi epatica il sistema nervoso adrenergico subisce una spiccata attivazione. Infatti il paziente cirrotico, soprattutto nella fase di scompenso, presenta una condizione di circolo iperdinamico con incremento della frequenza e della gittata cardiaca a riposo (Schrier RW 1988). A tale stato circolatorio iperdinamico si associa la presenza di elevati livelli plasmatici di noradrenalina e adrenalina (Henriksen JH et al. 1998). L'impiego di metodiche dirette di valutazione dell'attività nervosa simpatica ha dimostrato che l'aumento delle catecolamine dipenda da un processo di ipersecrezione adrenergica piuttosto che da una riduzione della loro clearance (processo che avviene principalmente a livello epatico). Mediante microneurografia si è osservato che l' "outflow" simpatico centrale è triplicato nel paziente cirrotico con ascite rispetto al controllo sano e tale incremento si associa a un parallelo aumento dei livelli plasmatici di noradrenalina (Floras JS et al. 1991, Pozzi M et al. 2001). La compromissione della reattività vascolare a diversi agenti vasocostrittori (endotelina, angiotensina II e vasopressina) sostiene che la disfunzione neuroadrenergica non coinvolga solo il sistema nervoso centrale ma anche quello periferico (Ryan J et al. 1993).

L'attivazione simpatica non è un fenomeno che si manifesta solo nelle fasi cliniche della malattia di fegato scompensata, ma risulta presente anche nelle fasi iniziali e intermedie, anche in assenza di versamento ascitico (Pozzi M et al. 2001). Essa partecipa allo sviluppo e alla progressione della malattia e alla patogenesi delle principali complicanze.

Due sono le principali ipotesi avanzate per spiegare l'attivazione adrenergica nel paziente cirrotico. La prima è basata sulla possibilità che alterazioni primitive funzionali di aree recettoriali che esercitano effetti inibitori sul simpatico siano responsabili del fenomeno: i barocettori aortici e carotidei, deattivati dalla ridotta pressione

sistodiastolica, perderebbero la simpatoinibizione favorendo la simpatoattivazione (Henriksen JH et al. 1998); allo stesso modo l'area riflessogena cardiopolmonare perderebbe la capacità di inibire il sistema simpatico a causa dell'ipovolemia centrale (Henriksen JH et al. 1998, Henriksen JH et al. 1989). La seconda ipotesi considera l'attivazione simpatica un fenomeno legato agli effetti simpatoeccitatori centrali di sostanze umorali (angiotensina II, aldosterone, ossido nitrico, ecc) la cui produzione è aumentata nella cirrosi (Henriksen JH et al. 1998). Anche lo stato di insulino resistenza presente nella malattia avanzata di fegato potrebbe concorrere all'attivazione simpatica (Nolte et al. 1995).

L'attivazione simpatica della cirrosi, anche se nelle fasi iniziali della malattia viene ritenuta un meccanismo di compenso finalizzato a mantenere intatta l'omeostasi cardiovascolare e pressoria, svolge nel tempo effetti sfavorevoli a livello cardiaco (tachicardia), a livello renale (ritenzione idrosalina), a livello epatico (ipertensione portale) e a livello pancreatico (esacerbazione dell'insulino-resistenza) (Henriksen JH et al. 1998).

Ossido Nitrico. Numerosi studi condotti nel corso degli ultimi anni hanno dimostrato che alcune condizioni morbose, tra cui l'ipertensione arteriosa, l'obesità, lo scompenso cardiaco, l'insufficienza renale cronica sono caratterizzati da una attivazione del sistema nervoso adrenergico e da una condizione di insulino resistenza.

Negli ultimi anni sempre maggiori sono le evidenze secondo cui l'ossido nitrico occuperebbe un ruolo chiave nel controllo dell'equilibrio metabolico e cardiovascolare (Scherrer U et al. 1997, Sartori C et al. 1999, Scherrer U et al. 2000).

L'ossido nitrico (NO) è sintetizzato da molte cellule grazie all'ossidazione di L-arginina in L-citrullina da parte dell'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) (Moncada S et al. 1993) di cui sono state identificate tre isoforme: nNOS (neuronale), eNOS (endoteliale) e iNOS (inducibile). Le prime due isoforme sono costitutivamente espresse e in condizioni fisiologiche sintetizzano piccole quantità di ossido nitrico; iNOS è espressa a seguito di stimoli infiammatori e in particolari condizioni patologiche tutte e tre le isoforme contribuiscono alla sintesi di elevate quantità di NO (Kimura et al 2005 in Hirooka 2009).

Negli anni studi condotti sull'uomo hanno sostenuto fortemente che alterazioni della sintesi dell'ossido nitrico possano giocare un ruolo centrale nella patogenesi dell'insulino resistenza secondaria ad alterazioni metaboliche (Sartori C et al. 1999, Scherrer U et al. 2000). Nei soggetti magri l'insulina favorisce la circolazione sanguigna e diminuisce le resistenze vascolari nei muscoli scheletrici (Scherrer U et al. 1997, Scherrer U et al. 1994a, Laasko M et al. 1990, Laasko M et al. 1992, Randin D et al. 1994, Vollenweider P et al. 1994, Scherrer U et al. 1993); l'effetto vasodilatatore è mediato dall'ossido nitrico. In condizioni di insulino resistenza, come l'obesità e l'ipertensione arteriosa essenziale, l'azione insulinica a livello muscolare è alterata e tale alterazione è probabilmente dovuta ad un difetto della sintesi dell'ossido nitrico endoteliale (Scherrer U et al. 1997, Scherrer U et al. 2000, Scherrer U et al. 1994b, Petrie JR et al. 1996, Serne

EH et al. 1999). Inoltre nei pazienti con aterosclerosi e ipertensione arteriosa la ridotta disponibilità di ossido nitrico potrebbe essere associata ad elevate concentrazioni plasmatiche di inibitori endogeni di NOS (Fard A et al. 2000, Ito A et al. 2000, Chen PY et al. 1991). Nell'uomo l'ossido nitrico endoteliale regola la pressione arteriosa (Shesely EG et al. 1996, Huang Pl et al. 1995) e l'ipertensione arteriosa è associata a polimorfismi del gene dell'ossido nitrico sintetasi endoteliale (Yoshimura T et al. 2000, Miyamoto Y et al. 1998, Shoji M et al. 2000).

E' stato inoltre documentato che aumentati livelli di colesterolo LDL associati ad insulino resistenza determinano una ridotta espressione di eNOS che contribuisce alla disfunzione endoteliale (Lamarche B et al. 1999).

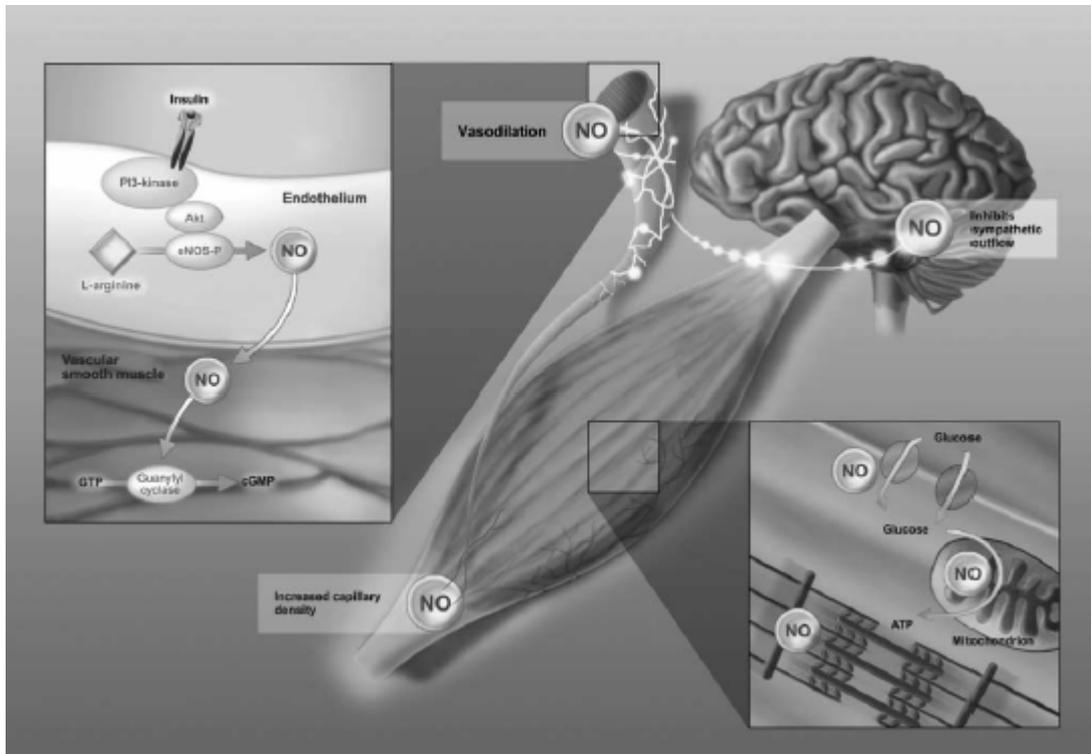
Sia nell'uomo che nell'animale l'insulino resistenza si associa ad un aumento dell'attivazione simpatica (Sartori C et al. 1999, Scherrer U et al. 2000, Scherrer U et al. 1994b) che può causare complicanze cardiovascolari (Scherrer U et al. 1997,) e alterare l'attività metabolica dell'insulina (Trueb L et al. 1996).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'ossido nitrico non è solo un vasodilatatore endoteliale ma anche una molecola chiave coinvolta nel controllo della trasmissione simpatica dal tronco encefalico (Lepori M et al. 1998, Patel KP et al. 2001, Cook s e Scherrer U 2002) e che alterazioni nella sintesi di NO a livello centrale abbiano conseguenze funzionali sulla attivazione simpatica centrale (Zanzinger J et al. 1995, Zhang J et al. 1998). Tutte le isoforme dell'ossido nitrico sintetasi sono ampiamente rappresentate nelle aree encefaliche implicate nella regolazione centrale dell'attività del sistema simpatico e della pressione arteriosa (Rodrigo J et al. 1994).

Le concentrazioni periferiche e centrali di ossido nitrico sono anche criticamente dipendenti dall'equilibrio fra specie reattive dell'ossigeno (ROS) e antiossidanti. Nello sviluppo della malattia cardiovascolare i ROS originano da fonti endogene attraverso l'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi e l'alterazione dell'ossido nitrico sintetasi.

L'azione dei ROS si manifesta in molteplici tessuti sia direttamente o attraverso la deplezione dell'ossido nitrico. A livello vascolare causano vasocostrizione e disfunzione endoteliale; a livello cardiovascolare innescano il rimodellamento ipertrofico; a livello renale promuovono la ritenzione salina, diminuiscono la filtrazione glomerulare e conducono a un danno tissutale. Inoltre gli elevati livelli di ROS causano uno spiazzamento dell'ossido nitrico e di conseguenza la rimozione dell'inibizione simpatica centrale (Lindley TE et al. 2004, Zimmerman MC et al. 2004) aumentando la trasmissione nervosa simpatica efferente dal sistema nervoso centrale. L'aumento dei ROS è anche in grado di attivare o sensibilizzare direttamente i neuroni simpatici attraverso alterazioni della funzione dei canali ionici di membrana (Peterson JR et al. 2006, Zimmerman MC et al. 2004).

FIGURA 4. Meccanismi d'azione dell'ossido nitrico (Cook S e Scherrer U 2002)



EMOCROMATOSI EREDITARIA

E' una condizione clinica caratterizzata da un inappropriato incremento dell'assorbimento intestinale del ferro con conseguente sovraccarico nelle cellule del fegato, del pancreas, del cuore e di altri organi e la conseguente alterazione della loro struttura e funzione (Pietrangelo A 1998, Fleming RE et al. 2002).

Nell'intento di spiegare da un punto di vista genetico l'emocromatosi, sono stati identificati diversi geni coinvolti nella regolazione del metabolismo del ferro: il primo è stato *HFE*, il cui clonaggio è avvenuto nel 1996, seguito dalla scoperta di *TfR2* (recettore 2 della transferrina), *HJV* (emojuvelina), *HAMP* (epcidina) e *SCL40A1* (ferroportina) (Montosi G et al. 2001, Pietrangelo A 2004a, Fleming R et al 2001). Mutazioni a carico di *HFE* sono la causa più frequente di emocromatosi ereditaria (tipo 1) mentre più rare sono le mutazioni a carico degli altri geni. Il ruolo dei singoli geni nel metabolismo del ferro è stato in parte chiarito (Fleming R et al 2005), si ipotizza che *HFE*, *TfR2* e *HJV* siano coinvolte nella via di regolazione dell'espressione di epcidina, che rappresenta quindi il fulcro di tutto il metabolismo marziale. Oggi con il termine emocromatosi si intende un ampio spettro di disordini ereditari del metabolismo del ferro accumulati, dal punto di vista eziopatogenetico, dall'inadeguata produzione o insufficienza di epcidina (Pietrangelo A 2004b). L'epcidina funziona da ormone regolatore controllando i livelli corporei di ferro sia a livello intestinale che macrofagico oltre che limitando la liberazione dalle riserve epatiche.

EMOCROMATOSI HFE-CORRELATA

E' la forma più comune di emocromatosi dovuta a mutazioni di *HFE* che si trasmette con carattere autosomico recessivo.

E' una condizione relativamente comune, prevalentemente diffusa tra le popolazioni caucasiche. Nel Nord Europa la frequenza di malattia è pari a 0,3-0,5% e la frequenza di

portatori pari a circa 10% (Bacon BR 2001). In Italia, la prevalenza di emocromatosi è più bassa con un gradiente nord-sud in decrescendo (Piperno A et al. 1998).

La mutazione C282Y in omozigosi spiega fino al 90% dei casi di emocromatosi nelle popolazioni di origine celtica. In Italia tale assetto si riscontra mediamente nel 60% dei casi, con una variabilità dal 69% nelle regioni settentrionali al 33% in quelle centro-meridionali (Piperno A et al. 1998). Più comune della mutazione C282Y nella popolazione generale è la mutazione H63D la cui frequenza varia tra il 15 e 40% nella popolazione Caucasica (Gochee PA et al. 2002 Matteo). La mutazione H63D conferisce un lieve rischio di sovraccarico di ferro; negli uomini il suo contributo alla malattia è irrilevante. Lo stato di eterozigoti composta C282Y/H63D determina un'espressione generalmente moderata di malattia e con una bassa penetranza (circa il 5% dei pazienti con emocromatosi)(Feder JH et al 1996, Beutler E et al. 2000). Le mutazioni identificate in *HFE* tuttavia non si limitano a C282Y e H63D, altre mutazioni (E168X, W169X, ecc.) (Piperno A et al. 2000), anche se più rare, quasi sempre private e in associazione con la mutazione C282Y, sono responsabili della malattia (Camaschella C et al. 2005).

L'emocromatosi tipo 1 è caratterizzata da una significativa eterogeneità fenotipica, solo in parte spiegata dai diversi genotipi a rischio. In studi di popolazione si è osservato che la maggior parte degli omozigoti C282Y mostra alterazioni degli indici biochimici dello stato del ferro, ossia almeno l'aumento della percentuale di saturazione della transferrina. In più del 50% dei soggetti si osserva l'aumento anche dei valori di ferritina, che indirettamente è espressione dell'accumulo di ferro. Solo il 25% dei soggetti, generalmente di sesso maschile, ha livelli di ferritina tali da far presupporre la presenza di danno d'organo. Esiste infine una percentuale di soggetti omozigoti C282Y che non sviluppano mai evidenze biochimiche di alterato metabolismo marziale. Circa il 30% delle donne e il 5% degli uomini possono infatti non esprimere la malattia.

Pertanto questa forma di emocromatosi ha una penetranza incompleta stimata intorno al 20-25% ed una variabilità di espressione fenotipica. Quest'ultima è influenzata da altri fattori genetici e ambientali a loro volta in grado di modificare lo stato di equilibrio marziale o di potenziare l'effetto tossico del ferro. Rimanendo nell'ambito fisiologico, i flussi mestruali rendono la donna omozigote C282Y in età fertile meno predisposta all'accumulo di ferro, che generalmente si manifesta dopo la menopausa. E' stato dimostrato che condizioni patologiche quali il tratto β -talassemico, l'epatite cronica virale e l'introito alcolico elevato sono in grado di potenziare l'espressione di malattia in termini di entità di sovraccarico o di danno, mentre condizioni come perdite ematiche o malassorbimento possono ridurla. Tutte le persone omozigoti per C282Y sono geneticamente predisposte allo sviluppo di danno, ma è attualmente impossibile predire chi svilupperà la malattia e quando (Pietrangelo A 2004c.)

Il danno d'organo del sovraccarico di ferro

Il danno d'organo ferro-mediato può presentare condizioni cliniche estremamente poliedriche. Mentre il classico quadro del "diabete bronzino" caratterizzato da iperpigmentazione cutanea, diabete mellito e cirrosi epatica è sempre più di eccezionale riscontro, è in progressivo aumento il numero di pazienti che giungono alla diagnosi di emocromatosi a causa di un singolo sintomo o di un'alterazione isolata degli indici biochimici dello stato del ferro.

Il fegato è la sede di accumulo di ferro quantitativamente più importante e temporalmente più precoce. Tale riscontro è facilmente comprensibile alla luce delle recenti scoperte che riconoscono la centralità di questo organo nei processi di regolazione e mobilizzazione del ferro. L'epatopatia è frequentemente la manifestazione d'esordio, sostituita talvolta dalle manifestazioni articolari o dall'ipogonadismo. Al contrario lo sviluppo del diabete mellito e della cardiopatia, espressioni di un più severo sovraccarico di ferro, è generalmente più tardivo.

Tutte le manifestazioni cliniche, esclusa l'artropatia, sono strettamente correlate all'entità del sovraccarico di ferro.

Il danno d'organo, determinato dall'accumulo di ferro nei tessuti, ha alla base un meccanismo lipo-perossidativo seguito da un processo di fibrosi. Il ferro è infatti un potente catalizzatore dello stress ossidativo e, mediante la produzione dei radicali liberi, determina la sidero-necrosi e il conseguente sviluppo di fibrosi.

Il **fegato**, essendo l'organo candidato al deposito di ferro enterale, è la sede dove più precocemente si instaura un danno d'organo nell'emocromatosi HFE. In un fegato normale è presente una concentrazione di ferro tra i 10 e 36 $\mu\text{mol/g}$, un suo aumento rappresenta la condizione predisponente all'instaurarsi di una cascata di eventi che innesca il processo fibrogenetico (Deugnier Y et al. 2007). Basset e collaboratori (Basset ML et al. 1986) hanno dimostrato l'esistenza di un valore soglia per la concentrazione epatica di ferro (circa 400 $\mu\text{mol/g}$) al di sopra della quale vi è un alto rischio di sviluppare fibrosi e cirrosi epatica. Più recenti osservazioni di Adams e collaboratori (Adams PC 2001) hanno abbassato tale soglia ad una concentrazione epatica di 250 $\mu\text{mol/g}$. Se, oltre ad un sovraccarico di ferro, coesistono altri fattori epatotossici, come l'alcool e le infezioni da virus epatitici, è sufficiente una quantità di ferro minore per provocare una rapida accelerazione della fibrosi. La fibrosi può progressivamente evolvere fino allo sviluppo di cirrosi epatica. Nei pazienti emocromatosici la ferritina può essere considerata un indicatore indiretto dell'entità dei depositi marziali. Diversi studi (Beaton M et al. 2002, Guyader D et al. 1998) hanno stabilito l'esistenza di un valore soglia (1000 $\mu\text{g/L}$) oltre il quale aumenta la probabilità di sviluppare un danno d'organo. I segni clinici e biochimici sono inizialmente aspecifici quali epatomegalia, con o senza un lieve aumento degli indici di necrosi epatica. Con il progredire del

sovraccarico di ferro si possono osservare alterazioni obiettive, biochimiche o strumentali che indirettamente fanno ipotizzare lo sviluppo di una cirrosi o delle sue complicanze, tra le quali va ricordato per gravità l'epatocarcinoma (Niederau C et al 1985).

Sebbene le complicanze a livello epatico siano le più frequenti e importanti, il danno d'organo derivante dal sovraccarico di ferro si realizza anche in altri distretti. Nell'emocromatosi l'**interessamento cardiaco** è direttamente correlato all'entità del sovraccarico di ferro e rappresenta un'importante causa di mortalità e morbidità (Niderau C et al. 1996, Cecchetti G et al. 1991, Palka P et al. 2002). Tre possibili meccanismi possono essere responsabili del danno: la riduzione del numero dei miocardiociti, la comparsa di fibrosi, l'induzione di alterazioni funzionali a carico del tessuto contrattile e di conduzione (Gavin Yo et al. 2006). Al centro di questi diversi fenomeni vi è l'aumento dello stress ossidativo: studi sperimentali in vitro hanno evidenziato che l'accumulo di ferro nel miocardio si accompagna ad un aumento delle concentrazioni di malonildialdeide, un marcatore dei fenomeni lipoperossidativi di membrana. Lo stress ossidativo è correlato alla perdita di miocardiociti dovuta a un aumento dell'apoptosi secondaria alla disfunzione mitocondriale e alle modificazioni elettriche e contrattili dei miocardiociti (Templin C 2007, Oudit GY et al. 2003). In fase iniziale l'ecocardiogramma evidenzia un ispessimento del setto interventricolare e della parete del ventricolo sinistro e una dilatazione dell'atrio sinistro con una funzione ventricolare sistolica conservata (fase restrittiva). Con il progredire del sovraccarico si realizza una riduzione della funzione sistolica ventricolare, con dilatazione e assottigliamento della parete (fase dilatativa) (Cecchetti G et al. 1991). Insufficienza cardiaca e aritmie, sono tra le principali cause di morte in soggetti con emocromatosi diagnosticata e trattata tardivamente (Link G et al. 1985).

A **livello pancreatico** il sovraccarico di ferro determina lo sviluppo di una condizione

d'intolleranza glucidica che può sfociare in un diabete mellito. Ciò è determinato sia da un'aumentata resistenza insulinica correlata alla disfunzione epatocellulare sia da una ridotta produzione d'insulina da parte delle cellule β del pancreas danneggiate dal sovraccarico di ferro (Conte D et al 1986, Thielen V et al. 2004). Solo tardivamente si instaura una forma di diabete insulino-dipendente. Anche a questo livello il grado di danno d'organo correla positivamente con il sovraccarico di ferro (Niederau C et al. 1985, Conte D et al. 1986).

A **livello ipotalamo-ipofisario** l'accumulo di ferro è principalmente a livello delle cellule gonadotrope e lattotrope con conseguente sviluppo d'insufficienza funzionale gonadica. Negli stadi iniziali si può riscontrare una disfunzione gonadica preclinica, caratterizzata da bassi livelli di testosterone, LH e FSH, correlata presumibilmente a un'alterazione a livello ipotalamico (Piperno A et al. 1992). Con l'aumentare del sovraccarico di ferro si sviluppa l'insufficienza ipofisaria e infine quella gonadica. Clinicamente questo si manifesta con impotenza e perdita della libido nell'uomo e amenorrea nella donna ((Piperno A et al. 1992, Edwards CQ et al. 1981). Si può osservare anche un'osteoporosi conseguente alla riduzione dei livelli degli ormoni sessuali. Più raramente può insorgere un ipotiroidismo ipofisario.

Le alterazioni a **livello articolare** sono caratterizzate da un quadro di artrite con frequente coinvolgimento delle prime, seconde e terze metacarpofalangee e interfalanfee prossimali, con distribuzione che ricorda quello dell'artrite reumatoide (Faraawi R et al. 1993). Spesso alle manifestazioni artritiche si associano condrocalcinosi e osteoporosi. Questa è l'unica complicanza la cui gravità non sembra avere una correlazione diretta con l'entità del sovraccarico e può insorgere anche dopo la rimozione del ferro.

Anche a livello cutaneo caratteristica è l'iperpigmentazione legata ad un accumulo di melanina e ferro a livello del derma, che conferisce la particolare colorazione bronzina

all'epidermide (Scotet V et al. 2005).

Generalmente i sintomi insorgono intorno ai 50 anni, con una frequenza da 5 a 10 volte più elevata nei maschi. Inizialmente si manifesta con una sintomatologia aspecifica, quale astenia e artralgie. Con l'aumentare del sovraccarico di ferro il quadro clinico diviene sempre più complesso e severo, fino al possibile sviluppo di un danno multi-organo.

Grazie alla diagnosi precoce è sempre più raro trovare alla diagnosi manifestazioni tardive, espressione di un sovraccarico di ferro severo soprattutto in paesi dove si applicano politiche di screening.

FERRO e STRESS OSSIDATIVO

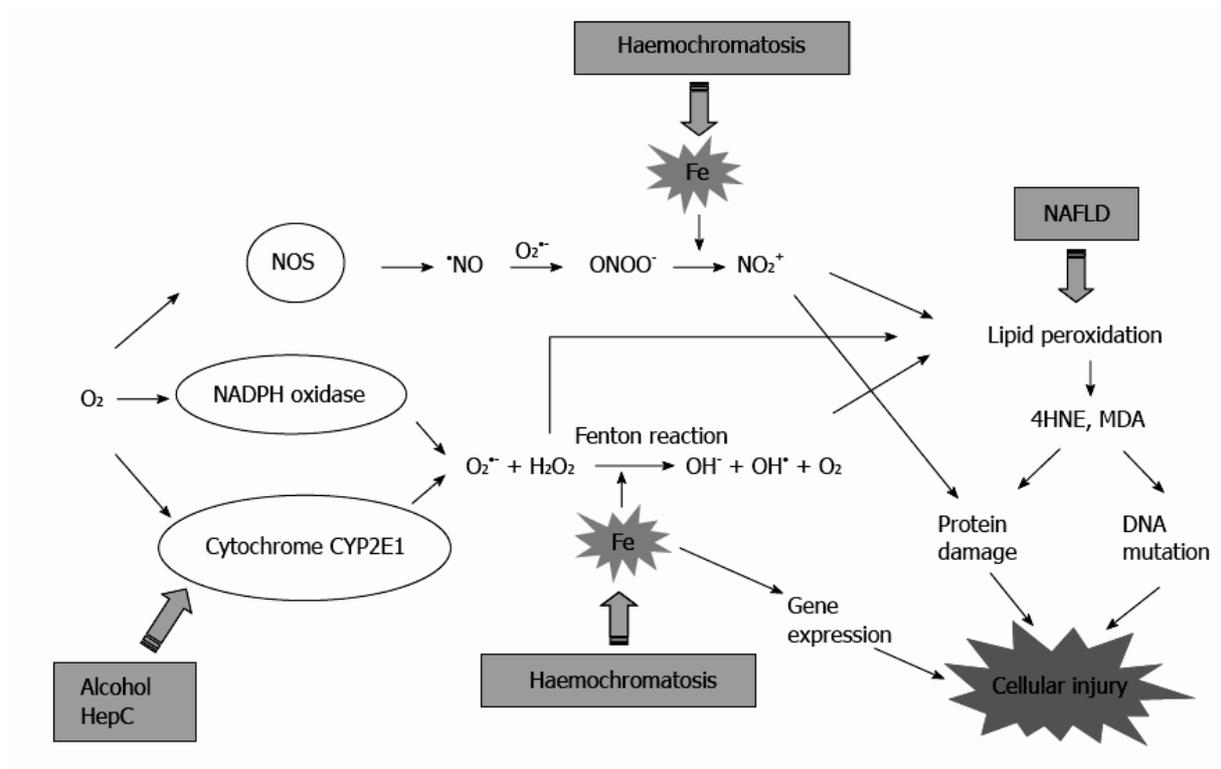
Ferro e Fegato. Il ferro all'interno della cellula si può trovare in una forma non disponibile, che comprende il ferro nei precipitati di idrossido ferrico e quello complessato con la ferritina, e in una forma disponibile alle reazioni ossidoriduttive che portano alla formazione di radicali liberi (pool labile intracitoplasmatico, LIP). In condizioni fisiologiche la generazione di questi intermedi reattivi è minimizzata da agenti anti-ossidanti enzimatici e non-enzimatici. In condizioni di sovraccarico di ferro la generazione di una quantità eccessiva di radicali liberi porta alla saturazione dei meccanismi tampone con il drammatico aumento dello stress ossidativo.

Negli epatociti e nella cellule di Kupffer il ferro catalizza la produzione di radicali idrossilici (OH°) a partire dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), radicali superossido (O_2°) e perossido di idrogeno (H_2O_2) attraverso un processo noto come *reazione di Fenton* (Figura 8). Il ferro catalizza inoltre la formazione dello ione NO_2^+ dallo ione perossinitrito. NO_2^+ ed OH° esprimono il loro potenziale patogeno attraverso l'ossidazione di numerose molecole biologiche, in particolare i lipidi. La perossidazione lipidica coinvolge gli acidi grassi polinsaturi contenenti diversi gruppi metile, particolarmente suscettibili all'ossidazione. Questi fenomeni intervengono non solo a carico della membrana plasmatica, ma aumentano anche la fragilità della membrana di numerosi organuli cellulari come ad esempio i lisosomi, che immagazzinano il ferro in eccesso. In particolare la lipoperossidazione delle membrane mitocondriali, e il brusco cambiamento delle loro caratteristiche di permeabilità, si accompagna ad una riduzione del gradiente elettrochimico necessario ai processi di respirazione aerobia e alla liberazione del citocromo C, in grado di attivare un segnale proapoptotico, delineando il fenomeno noto come “transizione di permeabilità mitocondriale” (Philippe MA et al. 2007; Bradham CA et al. 1998).

Un'ulteriore conseguenza dei processi lipoperossidativi è il danneggiamento di DNA e proteine.

La figura 5 riassume i meccanismi di coinvolgimento del ferro nello stress ossidativo e le sue conseguenze citotossiche.

Figura 5. Il coinvolgimento del ferro nello stress ossidativo e le sue conseguenze citotossiche (Philippe MA et al. 2007).



Nell'epatocita il ferro *per se*, o lo stress ossidativo ferro-indotto, è in grado di attivare pathways di segnalazioni che stimolano l'apoptosi e la necrosi cellulare (Czaja MJ 2002). Si verifica la sintesi di agenti pro-infiammatori come il TNF α , IL-6 e MIP-1 che alterano la funzione delle cellule di Kupffer e portano all'attivazione delle cellule stellate (Lin M et al. 1997; Cao Q et al. 2005), passo preliminare all'innesco del processo di fibrosi.

Ferro e cuore. Nei pazienti con emocromatosi ereditaria HFE correlata la cardiopatia è generalmente un evento tardivo, può essere di tipo restrittivo o dilatativo ed è caratterizzata da disfunzione ventricolare, sia diastolica sia sistolica, e dalla comparsa di aritmie (Westra WH et al. 1993, Wang Tl et al. 1994). L'accumulo di ferro nel cuore è più comune nei pazienti con sovraccarico marziale trasfusionale (Muhlestein JB 2000). In tali condizioni il ferro si deposita preferenzialmente nei miociti dell'epicardio e successivamente coinvolge tutta la parete cardiaca, prevalentemente i ventricoli ed il tessuto di conduzione. La severità della disfunzione è correlata alla quantità di ferro accumulato (Olson LJ et al. 1989, Dabestani A et al. 1984). Il ferro è un agente citotossico in grado di portare a morte i miociti (Link G et al. 1993). Se l'ischemia si aggiunge al sovraccarico marziale l'acidosi che ne consegue può indurre il rilascio di massive quantità di ferro libero dalla ferritina (Voogd A et al. 1992) con accentuazione della perossidazione lipidica. Un'ulteriore alterazione della funzione sistolica innesca alcune modificazioni adattative (ipertrofia ventricolare sinistra, aumento del rilascio catecolaminergico e conseguente attivazione del sistema renino-angiotensina-aldosterone con aumento della contrattilità) che nel tempo causano un danneggiamento (es.: espansione volume plasmatico, aumento del lavoro cardiaco e del consumo di ossigeno, ischemia) che porta fino allo scompenso cronico. Il tessuto di conduzione coinvolto va incontro a degenerazione e fibrosi, in particolare il nodo atrio-ventricolare e le fibre del Purkinje, con un effetto pro-aritmico (disturbi del ritmo o della conduzione) (Olson LJ et al. 1987, Rosenqvist M e Hultcrantz R 1989).

Ferro e aterosclerosi. Nei pazienti emocromatosici con sovraccarico marziale sono state osservate alterazioni degli indici di funzione endoteliale arteriosa ed un aumento dello spessore dell'intima e della media (Giannattasio C et al. 2000, Gaenger H et al. 2002). Controverso è il ruolo del sovraccarico di ferro nel processo

aterosclerotico (Salonen JT et al. 1992, Lauffer RB 1991, Sullivan JL. 1989, Sempos CT et al. 1994, Fox CJ et al. 2002).

Il primo meccanismo patogenetico proposto è il seguente: il ferro promuove la formazione di radicali liberi (ROS) che, tramite la lipoperossidazione, possono determinare un danno endoteliale e successivamente innescare processi aterosclerotici o facilitarne la progressione (Salonen JT et al. 1992). Studi sperimentali hanno sostenuto che l'ischemia miocardica prolungata non associata a preconditionamento (ripetute ischemie transitorie) seguita da riperfusione del tessuto ischemico genera ROS che riducono il ferro legato alla ferritina e ne causano la liberazione (Berenshtein E et al. 2002, Khaliulin I et al. 2003). Chelare il ferro equivarrebbe quindi a proteggere il miocardio dal danno ischemico (Williams RE et al. 1991). In studi sperimentali la terapia ferrochelante con desferoxamina ha dimostrato essere in grado di determinare una riduzione della progressione delle lesioni aterosclerotiche, confermando sia la relazione tra ferro ed aterosclerosi, probabilmente ROS indotta, sia il potere anti-aterosclerotico del chelante (Minqin R et al. 2003).

Un secondo meccanismo che spiega la relazione tra ferro ed aterosclerosi si basa sull'ipotesi che il ferro possa ossidare le lipoproteine a bassa densità (LDL) (Turbino Ribeiro S ML et al. 2003, Facchini FS e Saylor KL 2002) contribuendo in tal modo alla formazione della placca. La presenza di ferro nelle lesioni aterosclerotiche delle arterie umane è stata riscontrata sia all'analisi autoptica sia attraverso la RMN (Stadler N et al. 2004), inoltre l'entità dei depositi di ferro è risultata correlata con il colesterolo.

Lo studio delle sostanze adrenergiche e dell'angiotensina II (AT II) ha fornito ulteriori conoscenze circa le implicazioni del ferro nel sistema cardio-vascolare. Il meccanismo ipotizzato è che la AT II danneggi i miociti determinando il rilascio dell'eme. La somministrazione di sola AT II, di noradrenalina (NA) o di ferro non si è rivelata in grado di determinare un sovraccarico di ferro a livello della parete delle coronarie. E'

stato ipotizzato pertanto che in concomitanza con altri agenti aterosclerotici, come il danno endoteliale, l'ipertensione arteriosa, etc, il sovraccarico di ferro possa avere effetti pro-aterosclerotici (Ishizaka N et al. 2002).

SCOPO

Diverse patologie quali la cardiopatia ischemica (Graham et al. 2004), lo scompenso cardiaco cronico (Leimbach Jr WN et al. 1986), l'ipertensione arteriosa (Grassi G 1998b), l'insufficienza renale (Converse Jr RL et al. 1992), il diabete mellito (Huggett RJ et al, 2003), l'obesità (Grassi G et al. 2007), la sindrome metabolica (Grassi G et al. 2005), la sindrome delle apnee ostruttive (Narkiewicz K et al. 1997), la cirrosi epatica (Pozzi M et al. 2001) sono caratterizzate da un'attivazione del sistema nervoso adrenergico e spesso da una condizione di insulino resistenza.

Lo stato di iperinsulinemia secondario allo stato di insulino resistenza può favorire lo sviluppo di ipertono adrenergico (Scherrer U et al. 2001). Tuttavia le interazioni insulina-sistema simpatico sono complesse e non è al momento possibile definire se l'iperinsulinemia sia la causa o la conseguenza dell'ipertono adrenergico.

L'attivazione del sistema nervoso simpatico contribuisce mediante diversi meccanismi allo sviluppo del danno d'organo (rimodellamento-ipertrofia cardiaca, disfunzione endoteliale, aterosclerosi, ecc.) implicato nella progressione della malattia e del rischio cardiovascolare.

L'ossido nitrico e le specie reattive dell'ossigeno sono molecole chiave nella regolazione della trasmissione nervosa simpatica svolgendo un'azione sia a livello delle aree di regolazione centrale che a livello periferico (Fisher JP et al. 2009).

Il sovraccarico di ferro è responsabile di una quantità eccessiva di radicali liberi che causa un aumento dello stress ossidativo implicato nella patogenesi delle manifestazioni del danno d'organo correlato (Templin C 2007, Oudit GY et al. 2003, Philippe MA et al. 2007).

L'emocromatosi comprende un eterogeneo gruppo di alterazioni geneticamente determinate del metabolismo del ferro che conduce allo sviluppo di un accumulo di ferro in organi e tessuti determinando un danno con severità e reversibilità proporzionale all'entità dei depositi (Pietrangelo A 1998).

Proprio in considerazione del potente effetto del ferro come catalizzatore dei processi ossido riduttivi e della sua implicazione nella generazione di ROS, diversi studi hanno affrontato la possibile relazione tra ferro e patologia cardiovascolare e aterosclerosi. Sebbene i risultati ottenuti in modelli sperimentali cellulari e nell'animale sostengano il ruolo del ferro nell'accentuazione del danno ischemico e del processo di aterogenesi gli studi clinici hanno mostrato risultati controversi (Salonen JT et al. 1992, Lauffer RB 1991, Sullivan JL. 1989, Sempos CT et al. 1994, Fox CJ et al. 2002, Gaenzer H et al. 2002).

Lo scopo del presente studio è la valutazione, in pazienti affetti da emocromatosi HFE correlata, dell'attività nervosa simpatica attraverso l'impiego della tecnica microneurografica per esplorare l'ipotesi di un'ipertattivazione del sistema nella patologia in studio. La registrazione verrà effettuata al momento della diagnosi di sovraccarico di ferro e al raggiungimento della ferodeplezione, al fine di definire l'esistenza di un effetto diretto del ferro sul drive adrenergico.

MATERIALI e METODI

L'arruolamento dei pazienti è iniziato nel mese di settembre 2006 fino a novembre 2009.

Sono stati inclusi nello studio 15 pazienti maschi afferiti al Centro per la diagnosi e la cura dell'Emocromatosi dell'Ospedale San Gerardo di Monza con genotipo omozigote C282Y e eterozigote composto C282Y/H63D del gene *HFE* che presentavano alterazioni degli indici biochimici dello stato del ferro (ferritina > 300 µg/L e/o % saturazione della transferrina > 45%) e un sovraccarico di ferro epatico documentato attraverso risonanza magnetica (RMI) dell'addome.

Sono state escluse le forme secondarie/acquisite di sovraccarico marziale quali i disordini ematologici (talassemia major o intermedia; anemie diseritropoietiche congenite o acquisite), le pregresse terapie marziali endovena o ripetute emotrasfusioni, le epatopatie croniche virali o autoimmuni, l'abuso alcolico, la porfiria cutanea tarda. E' stata inoltre esclusa la presenza di forme ereditarie più rare di sovraccarico di ferro quali l'aceruloplasminemia e l'ipotransferrinemia ereditaria.

La presenza di cirrosi epatica, di insufficienza renale cronica, di scompenso cardiaco e di sindrome metabolica o diabete mellito, ipertensione arteriosa e obesità anche singolarmente sono stati ulteriori criteri di esclusione.

Tutti i soggetti coinvolti nello studio hanno dato il loro consenso scritto.

Lo studio ha previsto una valutazione basale che coincideva con la diagnosi di sovraccarico marziale e un'ulteriore valutazione finale al raggiungimento della ferropdeplezione. In 14 pazienti la rimozione del ferro è stata eseguita attraverso salasso terapia (400mL) personalizzata a cadenza variabile (da un minimo di 7 giorni a un

massimo di 30 giorni). Un paziente è stato arruolato in un trial multicentrico di fase I-II ed ha intrapreso la terapia chelante per os con deferasirox. La ferrodeplezione viene definita dal raggiungimento di un valore di ferritina $\leq 50 \mu\text{g/L}$ e una percentuale di saturazione della transferrina $< 45\%$.

La valutazione finale è stata condotta a distanza di almeno 30 giorni dall'ultimo salasso per escludere possibili interferenze correlate alle modificazioni cardiovascolari ed ematologiche conseguenti alla procedura. Durante il periodo di trattamento i pazienti non hanno modificato il proprio stile di vita (alimentazione, attività fisica, abitudini voluttuarie).

Entrambe le valutazioni hanno previsto per ogni paziente la raccolta dei seguenti parametri:

- antropometrici: età (anni): sono stati considerati i pazienti tra 20 e 75 anni, BMI (Peso(kg)/Altezza(m²)): sono stati considerati BMI < 30 Kg/m²
- anamnestici: consumo alcolico giornaliero (etanolo g/die): sono stati inclusi pazienti con introito alcolico < 60g/die per gli uomini, < 40 g/die per le donne); fumo (pacchetti di sigarette/anno)
- metabolici: i valori di normalità sono stati definiti in base al US National Cholesterol Education Program ATPIII: circonferenza vita ≤ 102 cm nei maschi e ≤ 88 cm nelle femmine; trigliceridi ≤ 150 mg/dL, colesterolo HDL ≥ 40 mg/dL nei maschi e ≥ 50 mg/dL nelle femmine; pressione arteriosa $\leq 135/85$ mmHg; glicemia a digiuno < 110 mg/dL.
- di insulino sensibilità: definita dall'indice HOMA che è stato calcolato secondo la formula: (glicemia a digiuno x insulinemia a digiuno x 0.0555)/22.5. Un valore di HOMA minore di 2.77 è considerato normale.
- dello stato del ferro: ° biochimici: sideremia, transferrina e ferritina misurati usando metodi standard. La percentuale di saturazione della transferrina è

stata calcolata con la seguente formula: (sideremia/transferrina)/1.42X100. I valori di normalità considerati sono: ferritina sierica <100µg/L per le donne in età fertile e <200µg/L per quelle in menopausa e <300µg/L negli uomini; saturazione della transferrina ≤45%. La quantità di ferro rimosso mediante salasso terapia (IR) è stata determinata considerando il numero e l'entità del salasso alla ferropienezza (1ml di sangue=0,5 mg di ferro)

°concentrazione intraepatica del ferro (LIC) valutata attraverso RMI (1.5 Tesla) quantitativa del ferro epatico secondo Gandon (Gandon Y et al. 2004) (algoritmo di calcolo secondo Gandon: www.radio.univ-rennes1.fr).

Valori inferiori a 36 µmol/g rappresentano la condizione fisiologica. Valori inferiori a 100 µmol/g sono indicativi di lieve sovraccarico marziale mentre valori superiori a 300 µmol/g di severo sovraccarico.

L'analisi molecolare è stata condotta su DNA genomico estratto da leucociti periferici, le mutazioni C282Y e H63D sono state identificate usando una reazione di polimerizzazione a catena (Feder et al. 1996).

La presenza delle complicanze correlate al sovraccarico di ferro (diabete, cardiopatia, ipogonadismo, artropatia) è stata valutata secondo i criteri usuali (Piperno et al. 1996).

- di attività nervosa simpatica

L'attività nervosa simpatica è stata registrata mediante metodica diretta: la microneurografia (Vallo AB et al. 1979). In ciascun soggetto, posto in posizione supina, è stata effettuata la registrazione dell'attività nervosa post-ganglionare simpatica afferente ad un nervo peroneale. La registrazione del traffico nervoso simpatico (TNS) è stata ottenuta mediante l'inserimento di un microelettrodo in tungsteno a livello del nervo peroneale, posteriormente alla testa fibulare. Un elettrodo di riferimento è stato posizionato nel tessuto sottocutaneo ad una distanza da 10 a 30mm dall'elettrodo

registrante, servendo come terra. Dopo amplificazione ed integrazione con un sistema di analisi "ad hoc" (Bioengineering Department, University of Iowa, Iowa City) l'attività nervosa è stata monitorizzata attraverso un altoparlante, visualizzata su un oscilloscopio a memoria e registrata su un poligrafo ad inchiostro insieme alla pressione arteriosa (battito-battito mediante tecnica finapress e sfigmomanometrica) e alla frequenza cardiaca (mediante ECG). L'analisi del tracciato microneurografico prevede l'identificazione delle singole scariche simpatiche post-ganglionari, il calcolo della loro frequenza nell'unità di tempo (min) e del loro numero corretto per la frequenza cardiaca e la valutazione della loro ampiezza. Nel presente studio, il traffico nervoso simpatico è stato quantificato come numero di scariche nell'unità di tempo (scariche/minuto) e come numero di scariche corretto per i valori di frequenza cardiaca (scariche/100 battiti cardiaci) (Grassi G. et al 1995, 1998, 2003, 2005).

La pressione arteriosa è stata valutata mediante un dispositivo fotoplethimografico digitale (Finapress 2300, Ohmeda) in grado di fornire accurati valori di PA sistolica diastolica battito-a-battito. La frequenza cardiaca è stata registrata in modo continuo in corso di registrazione microneurografica attraverso un cardiotacometro tarato sull'onda R di una derivazione elettrocardiografia.

In concomitanza della registrazione microneurografica, è stato raccolto un campione di sangue per il dosaggio plasmatico di adrenalina e noradrenalina. Il campione di sangue è stato prelevato da cannula posizionata in una vena del braccio dopo che i soggetti sono rimasti a riposo per 30' in posizione supina. I valori di noradrenalina sono stati determinati mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (Hjemdahl P et al. 1979).

E' stato inoltre selezionato un gruppo di controllo di soggetti sani. Tutti i soggetti di controllo sono stati sottoposti a studio microneurografico.

Analisi statistica

Tutte le variabili sono state espresse come mediana (range), le frequenze come numero (%).

La significatività statistica (arbitrariamente fissata ad un livello di 0.05) delle differenze osservate tra le misurazioni medie dei diversi gruppi è stata saggiata attraverso la costruzione di test T di Student. Per le correlazioni è stato utilizzato il coefficiente di correlazione lineare di Bravais-Pearson che misura l'intensità del legame lineare e il verso di tale legame.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte ricorrendo al software statistico Prism 3.02 (GrafPad Software, San Diego, California, 1999).

RISULTATI

Lo studio è stato condotto su 15 pazienti maschi afferiti al Centro per la diagnosi e la cura dell'Emocromatosi dell'Ospedale San Gerardo di Monza con genotipo HFE a rischio di sovraccarico di ferro. 8 pazienti erano omozigoti C282Y e 7 eterozigoti composti C282Y/H63D. La popolazione studiata presentava un'età di 42 (26-58), quella dei controlli era 42 (26-56).

La tabella 1 riassume le caratteristiche generali espresse come mediana della popolazione al momento della diagnosi di emocromatosi.

TABELLA 1. Principali dati metabolici dei pazienti alla diagnosi

PARAMETRI	DIAGNOSI (n=15)
BMI (Kg/m ²)	24.1 (21.3-28.6)
Circonferenza addominale (cm)	91 (73-115)
PAS (mmHg)	126 (116-141)
PAD (mmHg)	69 (59-82)
Frequenza cardiaca (battiti/min)	68 (49-99)
Glicemia (mg/dL)	88 (75-101)
Insulinemia (mU/L)	5.85 (3.9-13.8)
HOMA index	1.49 (0.83-3.26)
Numero di alterazioni metaboliche	
0	12 (80%)
1	2 (13%)
2	1 (7%)
Saturazione della transferrina (%)	50 (31-87)
Ferritina (µg/L)	717 (334-1372)
Concentrazione intraepatica del ferro (µmol/g)	210 (150-310)

I dati sono espressi come mediana (range) e numero (%)

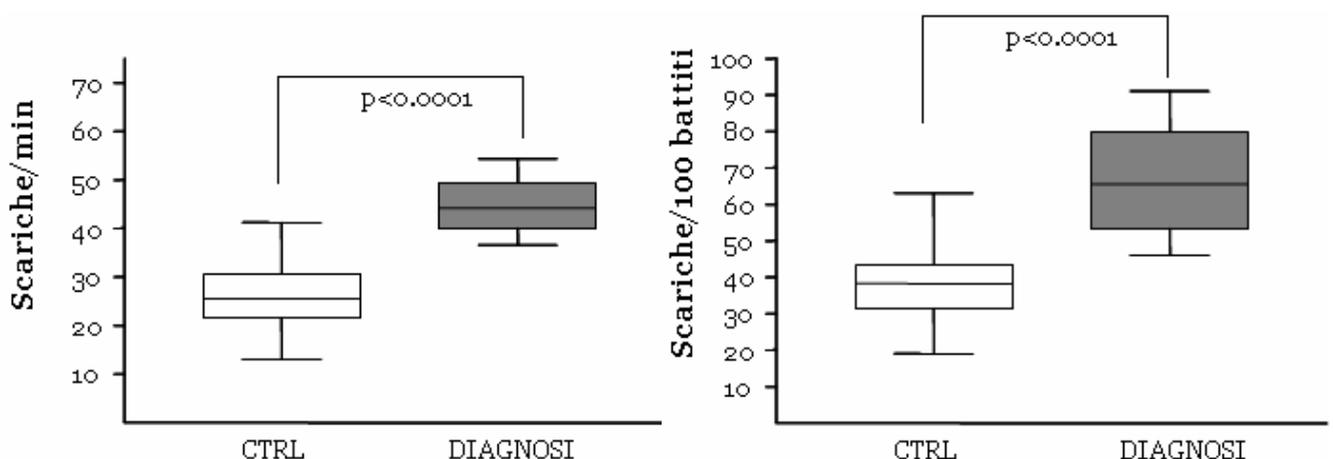
La maggior parte dei pazienti non presentava un sovraccarico marziale severo; solo due pazienti (13%) mostravano un sovraccarico marcato ($LIC \geq 300 \mu\text{mol/g}$), i restanti un sovraccarico moderato. Un paziente non è stato sottoposto a risonanza magnetica per claustrofobia, pertanto non è disponibile l'entità del sovraccarico marziale.

In tutti i pazienti la valutazione del danno d'organo ferro correlato non ha evidenziato alcuna manifestazione. In tre pazienti, di cui due con sovraccarico severo e uno con sovraccarico moderato e ipertransaminasemia, persistente abbiamo ritenuto opportuna l'esecuzione della biopsia epatica al fine di valutare la presenza di fibrosi. L'istologia confermava il sovraccarico marziale severo e evidenziava la presenza di iniziale fibrosi (portale) nei due pazienti con accumulo marcato mentre documentava una fibrosi di grado intermedio (setti porto-portali) nell'altro paziente biopsiato (Ishak K et al. 1995).

Alla diagnosi la maggior parte (80%) dei soggetti non presentava alterazioni metaboliche caratterizzanti la sindrome metabolica; il 13% dei soggetti presentava un HOMA aumentato.

La registrazione microneurografica basale ha evidenziato un aumento significativo dell'attività nervosa simpatica (MSNA) in tutti i pazienti rispetto ai controlli (mediana 44 vs 25 scariche/min, 65 vs 38 scariche/100 battiti)

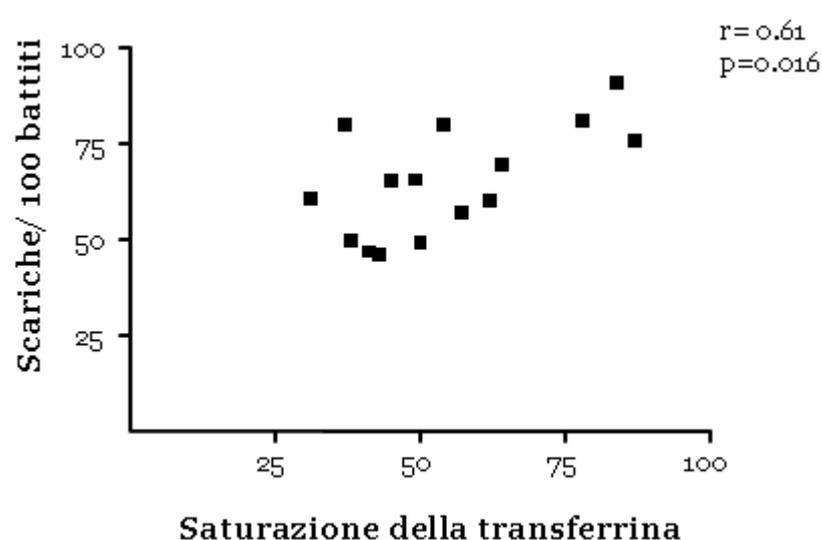
FIGURA 6. Attività nervosa simpatica (MSNA) nei pazienti alla diagnosi rispetto al gruppo di controllo



Pur consapevoli dei limiti della numerosità del campione, abbiamo rianalizzato i dati dividendo i pazienti in base al genotipo HFE senza osservare alcuna differenza significativa tra gli omozigoti C282Y e gli eterozigoti C282Y/H63D.

I valori dell'attività simpatica corretta per la frequenza cardiaca è risultata correlata in modo significativo alla percentuale della saturazione della transferrina ($r=0.61$; $p=0.016$) e al limite della significatività con la sideremia ($r=0.51$; $p=0.053$).

FIGURA 7. Correlazione tra attività nervosa simpatica (MSNA) e saturazione della transferrina (%) alla diagnosi



Tutti i pazienti hanno intrapreso la terapia depletiva, 14 attraverso salassi periodici e uno attraverso terapia chelante per os con deferasirox. Undici soggetti hanno completato la terapia raggiungendo la ferrodplezione. Per i 10 che sono stati sottoposti alla salassoterapia è stato possibile calcolare la quantità di ferro rimosso, pari a 3.25 ± 2.3 g di ferro in un tempo medio di 10 ± 4.3 mesi.

Al conseguimento della ferrodplezione i pazienti sono stati sottoposti alla valutazione finale che prevedeva la raccolta di dati biochimici/metabolici e microneurografici. Un paziente ha rifiutato di sottoporsi nuovamente all'indagine microneurografica a causa

della comparsa di una nevralgia dell'arto indagato conseguentemente alla prima registrazione; di tale paziente sono disponibili esclusivamente i parametri metabolici.

Alla ferropdeplezione nessun paziente mostrava alterazioni dei parametri metabolici significativamente differenti rispetto alla diagnosi. La tabella 2 riassume i principali dati metabolici dei pazienti che hanno concluso la terapia depletiva e sono stati sottoposti a registrazione microneurografica.

TABELLA 2. Principali dati metabolici dei pazienti che hanno raggiunto la ferropdeplezione

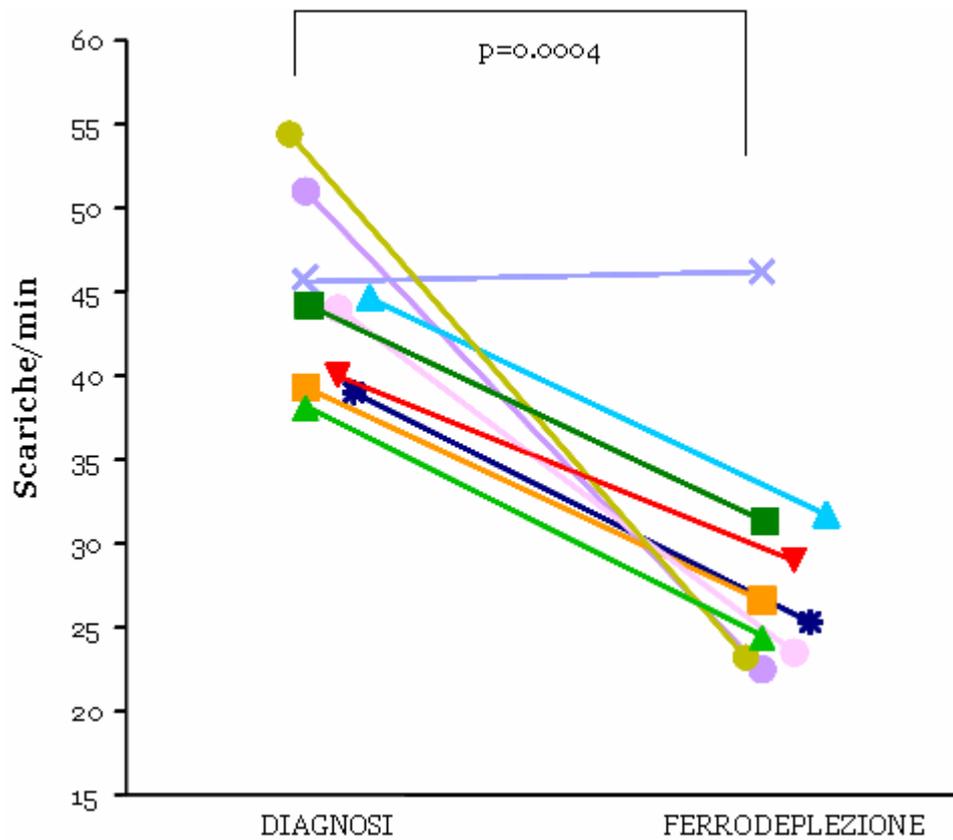
PARAMETRI	DIAGNOSI (10)	FERRODEPLEZIONE (10)
BMI (Kg/m ²)	24.2 (21.3-28.6)	24.7 (22.5-29.4)
Circonferenza addominale (cm)	86 (73-115)	87 (79-115)
PAS (mmHg)	126 (118-141)	125 (115-144)
PAD (mmHg)	70 (61-82)	73 (60-84)
Frequenza cardiaca (battiti/min)	68 (54-85)	73 (55-88)
Glicemia (mg/dL)	88 (80-101)	88 (75-103)
Insulinemia (mU/L)	5.5 (3.9-12.2)	7.5 (2.6-17.5)
HOMA index	1.30 (0.83-2.65)	1.62 (0.48-4.45)
Colesterolo totale (mg/dL)	185 (128-235)	184 (163-250)
Colesterolo HDL (mg/dL)	60 (39-95)	65 (38-93)
Trigliceridi (mg/dL)	93 (43-131)	68 (34-156)

I dati sono espressi come mediana (range) e numero (%)

Alla ferropdeplezione il 30% dei pazienti presentava un HOMA oltre i limiti di norma; il 50% ha un'insulinemia incrementata almeno del 30% rispetto al basale .

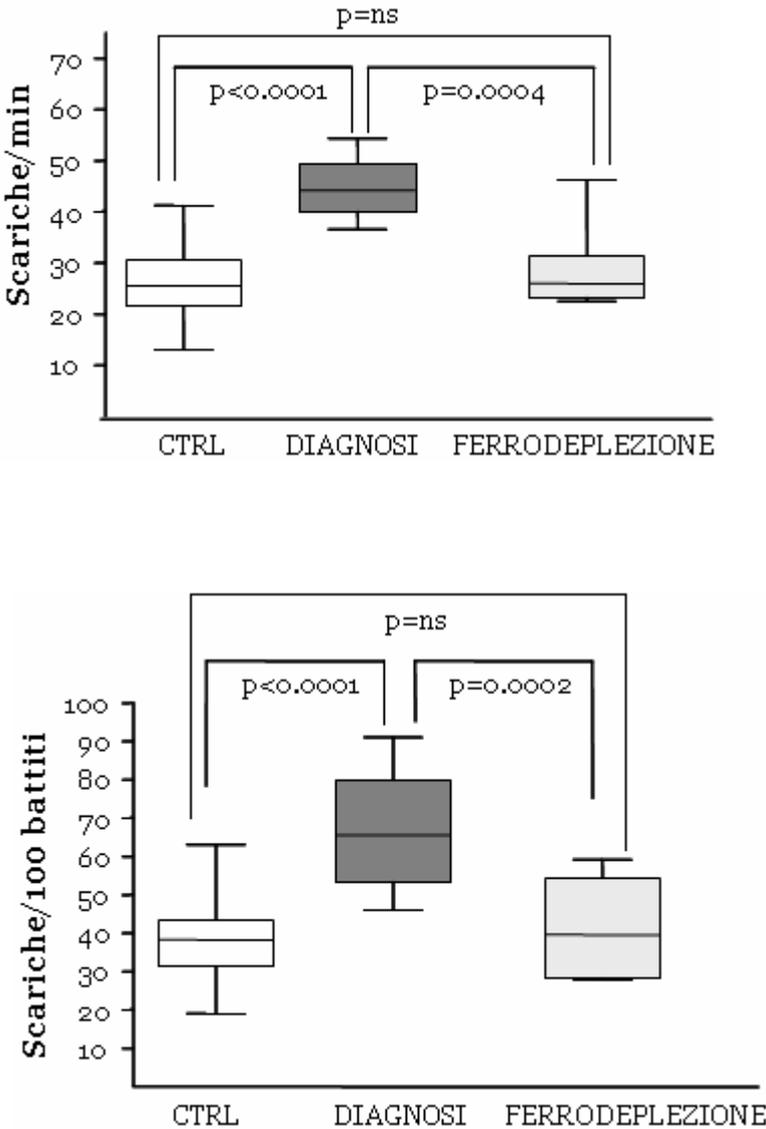
I risultati della registrazione microneurografica alla ferropdeplezione hanno evidenziato in tutti i pazienti, tranne uno, una significativa riduzione dell'attività nervosa simpatica rispetto al momento della diagnosi (mediana 44 vs 26 scariche/min) con una riduzione media del 35% rispetto al valore basale.

FIGURA 8. Attività nervosa simpatica (MSNA) dei singoli pazienti alla diagnosi e alla ferropdeplezione



Alla ferropdeplezione l'attività nervosa simpatica nei pazienti non era significativamente differente rispetto ai controlli (mediana 26 vs 25 scariche/min, 40 vs 38 scariche/100 battiti).

FIGURA 9. Attività nervosa simpatica (MSNA) dei pazienti alla diagnosi e alla ferropdeplezione rispetto al gruppo di controllo



Al raggiungimento della ferropenia si confermava la correlazione positiva tra i valori dell'attività simpatica corretta per la frequenza cardiaca e la percentuale della saturazione della transferrina ($r=0.69$; $p=0.029$) e si evidenziava anche una significatività con la sideremia ($r=0.77$; $p=0.0093$).

DISCUSSIONE

L'iperattività del sistema nervoso simpatico è una caratteristica di diverse patologie cardiovascolari quali la cardiopatia ischemica (Graham LN et al. 2004), lo scompenso cardiaco cronico (Leimbach Jr WN et al. 1986) e l'ipertensione (Grassi G 1998) e di altre patologie quali l'insufficienza renale (Converse Jr RL et al. 1992), il diabete mellito (Huggett RJ et al. 2003), l'obesità (Grassi G et al. 2007), la sindrome metabolica (Grassi et al. 2005), la sindrome delle apnee ostruttive (Narkiewicz K et al. 1997) che, pur non potendosi considerare vere e proprie patologie cardiovascolari, coinvolgono nel loro decorso clinico il cuore e il sistema cardiocircolatorio. In alcune di queste condizioni morbose l'entità della compromissione della funzione autonoma risulta essere proporzionale alla gravità clinica della malattia, influenzandone negativamente la prognosi e condizionandone il decorso (Vinik AI 1999).

L'insulino resistenza è una componente spesso presente nella maggioranza delle condizioni associate a un aumentato drive adrenergico. E' stato altresì documentato che lo stato di iperinsulinemia secondario allo stato di insulino resistenza può favorire lo sviluppo di ipertono adrenergico. Tuttavia le interazioni insulina-simpatico sono complesse, in quanto è stato osservato che una condizione di attivazione simpatica può favorire lo sviluppo di insulino resistenza (Jamerson KA et al. 1993).

Proprio in considerazione del potente effetto del ferro come catalizzatore dei processi ossido riduttivi e della sua implicazione nella generazione di ROS, diversi studi hanno affrontato la possibile relazione tra ferro e patologia cardiovascolare e aterosclerosi. Sebbene i risultati ottenuti in modelli sperimentali cellulari e nell'animale sostengano il ruolo del ferro nell'accentuazione del danno ischemico e del processo di aterogenesi gli studi clinici hanno mostrato risultati controversi (Salonen JT et al. 1992, Lauffer RB

1991, Sullivan JL. 1989, Sempos CT et al. 1994, Fox CJ et al. 2002, Gaenger H et al. 2002).

Il nostro studio è stato disegnato e condotto al fine di chiarire il ruolo/coinvolgimento del ferro nell'attivazione simpatica che è ampiamente coinvolta nello sviluppo e progressione della malattia cardiovascolare. La valutazione è stata condotta su una popolazione di pazienti affetti da emocromatosi senza alcuna complicanza clinica o patologia associata, scelta come puro modello di accumulo sistemico di ferro.

Questo studio rappresenta la prima valutazione con metodica diretta dell'attività nervosa simpatica in una popolazione affetta da emocromatosi. E' la prima evidenza dell'esistenza di un'iperattività adrenergica nel paziente con sovraccarico di ferro che si basa in prima istanza sulla dimostrazione di una più elevata attività adrenergica rispetto ai controlli sani e di una normalizzazione dell'attività nervosa al raggiungimento della completa rimozione dei depositi marziali.

I criteri di esclusione sono stati restrittivi al fine di eliminare tutte le altre possibili condizioni associate a un'iperattività simpatica, in particolare la sindrome metabolica. Interessante osservare che l'unico caso in cui non si è osservata una modificazione del drive adrenergico era anche l'unico che presentava un'obesità centrale, condizione di per se sufficiente a giustificare l'alterazione simpatica. Complessivamente si può affermare che il ruolo dell'insulino resistenza sull'iperattività simpatica nei pazienti studiati sia marginale data l'assenza di una variazione significativa dei valori di HOMA e di insulinemia alla diagnosi e alla ferro deplezione. D'altro canto nell'emocromatosi sono presenti due condizioni che determinano un effetto opposto sul valore di insulinemia: il sovraccarico di ferro a livello epatico favorirebbe uno stato di insulino resistenza, mentre quello pancreatico determinerebbe la riduzione della secrezione di insulina da parte della beta cellula. La presenza dei due fenomeni potrebbe sussistere nello stesso paziente e rendere difficoltosa l'interpretazione/utilizzo dell'HOMA test

come indice di insulino resistenza in questi pazienti. Non è chiaro se la salassoterapia con il raggiungimento della ferropdeplezione sia efficace nel ripristino della fisiologica condizione di insulino sensibilità e secrezione. Alcuni studi hanno dimostrato il miglioramento di alcuni parametri metabolici dopo la rimozione del ferro in pazienti con sovraccarico di ferro non ereditario (Piperno A et al. 2004, Valenti L et al. 2007). Tuttavia, uno studio specificatamente condotto in soggetti con emocromatosi ha evidenziato un incremento della produzione di insulina, ma non un miglioramento dell'insulino sensibilità al raggiungimento della deplezione marziale (Abraham D et al. 2006).

I risultati del presente studio suggeriscono quindi un ruolo del ferro sull'attivazione simpatica, un effetto che potrebbe essere mediato dall'azione ossido-riduttiva del metallo e dall'aumentata produzione di ROS indotta dalla presenza di ferro "libero" (non-transferrin bound iron: NTBI o labile iron pool: LIP). Ciò è confermato dai nostri risultati che evidenziano una significativa correlazione tra attività nervosa simpatica e percentuale di saturazione della transferrina. E' noto infatti, che la presenza di NTBI/LIP nel sangue è strettamente correlata alla percentuale di saturazione della transferrina: maggiore la saturazione della transferrina, maggiore la concentrazione di NTBI/LIP nel plasma (LeLan C et al. 2005; Cabantchik ZI et al. 2005). Nell'emocromatosi l'aumentata quantità di LIP (circolante e intracitoplasmatico) funge da catalizzatore per le reazioni ossido-riduttive che portano alla formazione di radicali liberi a cui consegue la saturazione dei meccanismi tampone e l'aumento dello stress ossidativo che coinvolge soprattutto i lipidi. Nell'emocromatosi l'iperattivazione simpatica ferro indotta potrebbe inoltre concorrere all'insorgere dell'ipertrofia ventricolare associandosi al danno ossidativo del ferro sui miociti.

L'aumento dei ROS è in grado di attivare o sensibilizzare direttamente i neuroni simpatici attraverso alterazioni della funzione dei canali ionici di membrana (Peterson

JR et al. 2006, Zimmerman MC et al. 2004) ma anche attraverso uno spiazzamento dell'ossido nitrico. L'ossido nitrico non è solo un vasodilatatore endoteliale ma è anche coinvolto nell'inibizione della trasmissione simpatica centrale (Lepori M et al. 1998, Patel KP et al. 2001). Lo spiazzamento dell'ossido nitrico mediato dai ROS ha quindi come effetto finale l'aumento della trasmissione nervosa simpatica efferente dal sistema nervoso centrale.

Precedenti studi (Failla M et al. 2000, Gaenger et al 2002) hanno dimostrato che il ferro favorendo i processi ossidativi sia in grado di determinare la disfunzione endoteliale e hanno evidenziato che la rimozione del ferro sia in grado di ripristinare la normale funzionalità endoteliale ristabilendo l'omeostasi ossido riduttiva. I nostri risultati contribuiscono ad approfondire il meccanismo attraverso cui il ferro influisce negativamente sull'apparato cardiocircolatorio. L'evidenze ottenute hanno dimostrato una diretta correlazione fra sovraccarico marziale ed in particolare della concentrazione del ferro circolante e iperattività adrenergica come noto implicata nell'istaurarsi del danno cardiovascolare. Ulteriore conferma è la riduzione del drive adrenergico al raggiungimento dello stato ferodepletivo. Curiosamente anche dopo la ferodeplezione si osserva una significativa correlazione tra l'attività adrenergica e la percentuale di saturazione della transferrina e le concentrazioni di ferro circolante. Poiché i pazienti ferodepleti presentavano valori nei limiti o leggermente superiori alla norma, tale risultato sembrerebbe suggerire un effetto diretto del ferro e/o del complesso ferro-transferrina circolanti sull'attività simpatica, un'osservazione che apre scenari assai più ampi di quelli specificatamente legati alle patologie di sovraccarico di ferro, cioè di un possibile ruolo del ferro nella modulazione dell'attività simpatica nella popolazione generale.

L'accumulo progressivo di metalli pesanti, tra cui il ferro, è stato ipotizzato essere coinvolto nello sviluppo dell'ipertensione (Schroeder HA 1967, Lockett CJ e Arbuckle D

1987, Navas-Acien A et al 2008, Houston MC 2007), un'ipotesi supportata dall'evidenza che agenti chelanti siano in grado di ridurre l'ipertensione (Schroeder HA 1967). E' possibile quindi ipotizzare che l'iperattivazione simpatica ferro indotta concorra al rischio di sviluppo dell'ipertensione arteriosa e delle complicanze ad essa associate.

BIBLIOGRAFIA

- Abboud FM. *The sympathetic system in hypertension. State-of-the-art review.* Hypertension 1982; 4: 208-25.
- Abraham D et al. *Increased insulin secretory capacity but decreased insulin sensitivity after correction of iron overload by phlebotomy in hereditary haemochromatosis.* Diabetologia 2006; 49: 2546-51.
- Adamczak M et al. *Kidney and hypertension.* Kidney Int Suppl 2002; 62-7.
- Adams PC. *Is there a threshold of hepatic iron concentration that leads to cirrhosis in C282Y hemochromatosis?* Am J Gastroenterol 2001; 96: 567-69.
- Alvarez GE et al. *Sympathetic neural activation and vasodilatation in normal humans.* Circulation 2002; 106: 2533-6.
- Anderson EA et al. *Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans: evidence for direct intraneural recordings.* Hypertension 1989; 14: 177-83.
- Anderson EA et al. *Hypeinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilatation in normal healthy subjects.* J Clin Invest 1991; 87: 2246-52.
- Bacon BR. *Hemochromatosis: diagnosis and management.* Gastroenterology 2001;120:718-25.
- Barton DA et al. *Sympathetic activity in major depressive disorder: identifying those at increased cardiac risk?* J Hypertens 2007; 25: 2117-24.
- Basset ML et al. *Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis.* Hepatology 1986; 6: 24-9.
- Beaton M et al. *Noninvasive prediction of cirrhosis in C282Y-linked hemochromatosis.* Hepatology 2002; 36: 673 –8.
- Berne C et al. *The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects.* Diabetologia 1992; 35: 873-9.
- Beutler E et al. *The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic.* Ann Intern Med 2000; 133 : 329-37.
- Berenshtein E et al. *Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart.* Mol Cell Biochem 2002; 234-235: 283-92.
- Bevan RD. *Trophic effects of peripheral adrenergic nerves on vascular structure.* Hypertension 1984; 6: III19-26.

Bianchi C et al. *Non-traditional markers of atherosclerosis of atherosclerosis potentiate risk of coronary heart disease in patients with type 2 diabetes mellitus.* Nutr Metab Cardiovasc Dis 2008; 18: 31-8.

Bichet DG et al. *Potential role of increased sympathetic activity in impaired sodium and water excretion in cirrhosis.* N Engl J Med 1982; 307:1552-57.

Bradham CA et al. *The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release.* 1998; 18: 6353-64.

Burns J et al. *Relationship between central sympathetic drive and magnetic resonance imaging-determined left ventricular mass in essential hypertension.* Circulation 2007; 115: 1999-2005.

Cabantchik ZI et al. *LPI-labile plasma iron in iron overload.* Best Pract Res Clin Haematol 2005; 18: 277-87.

Camaschella C et al. *Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders.* Blood 2005; 106: 3710-7.

Campese VM et al. *Downregulation of neuronal nitric oxide synthase and interleukin-1 β mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity.* Hypertension 2002; 39: 519-24.

Cao Q et al. *Cytochrome P4502E1 primes macrophages to increase TNF-alpha production in response to lipopolysaccharide.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 289: G95-107.

Cecchetti G et al. *Cardiac alteration in 36 consecutive patients with idiopathic hemochromatosis: polygraphic and echocardiographic evaluation.* Eur Heart J 1991; 12: 224-30.

Chen PY et al. *L-arginine abrogates sal-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats.* J Clin Invest 1991; 88: 1559-67.

Cohn JN et al. *Adverse mortality effect of central sympathetic inhibition with sustained-release monoxine in patients with heart failure (MOXCON).* Eur J Heart Fail 2003; 5: 659-67.

Conte D et al. *Clinical, Biochemical and histological features of primary haemochromatosis: a report of 67 cases.* Liver. 1986, 6: 310-5.

Converse RL Jr et al. *Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves.* Physiol Rev 1979; 59: 919-57.

Converse JR RL et al. *Sympathetic overactivity in patients with chronic renal failure.* N Engl J Med 1992; 327: 1912-8.

Cook S e Scherrer U. *Insulin resistance, a new target for nitric oxide-delivery drugs.* Science Fundamental & Clinical Pharmacology 2002; 16: 441-53.

Correia ML et al. *Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab 2006; 8: 603-10.

Czaja MJ. Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. Antioxid Redox Signal 2002; 4: 759-67.

Dabestani A et al. *Primary hemochromatosis: anatomic and physiologic characteristics of the cardiac ventricles and their response to phlebotomy*. Am J Cardiol 1984; 54 :153-9.

De Simone G et al. *Assessment of left ventricular function by the midwall fractional shortenig/end-systolic stress relation in human hypertension*. J Am Coll Cardiol 1994; 23: 1444-51.

Deugnier Y et al. *Pathology of hepatic iron overload*. World J Gastroenterol 2007; 21: 4755-60.

Devereux RB et al. *Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic valifation of the method*. Curculation 1977; 55: 613-6.

Ebert TJ et al. *Effects of aging on baroflex regulation of sympathetic activity in humans*. Am J Physiol 1992; 263: H798-803.

Edwards CQ et al. *Hereditary hemochromatosis. Contribution of genic analyses*. Progress in Hematology. 1981;12:43-71.

Egan B et al. *Mechanisms of increased alpha-adrenergic vasoconstriction in human essential hypertension*. J Clin Invest 1987; 80: 812-7.

Esler M. *Sympathetic activity in experimental and human hypertension*. In Zanchetti A, Mancia G eds. Handbook of Hypertension Vol 17, Pathophysioogy of Hypertension. Amsterdam; Elsevier; 1997; 628-73.

Faber JE et al. *Neural contribution to renal hypertension following acute renal artery stenosis in conscious rats*. Hypertension 1983; 5: 155-64.

Facchini FS, Saylor KL. *Effect of iron depletion on cardiovascular risk factors: studies in carbohydrate-intolerant patients*. Ann N Y Acad Sci 2002; 967 :342-51.

Failla M et al. *Sympathetic tone retrains arterial distensibility of healthy and atherosclerotic subjects*. J Hypertens 1997; 30: 1085-8.

Failla M et al. *Radial Artery wall alteration in genetic hemochromatosis before and after iron depletion teraphy*. Hepatology 2000; 32: 569-73.

Faraawi R, Harth M, Kertesz A, Bell D. *Arthritis in hemochromatosis*. J. Rheumatol. 1993; 20: 448-52.

Fard A et al. *Acute elevations of plasma asymetric dimethylarginine and impaired endiothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2039-44.

- Feder JH et al. *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis*. *Nature Genetics* 1996; 13: 399-408.
- Fisher PJ et al. *Central sympathetic overactivity: Maladies and mechanisms*. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2009; 148: 5-15.
- Fleming R E et al. *Mouse strain differences determine severity of iron accumulation in HFE knockout model of hereditary hemochromatosis*. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 2707-11.
- Fleming RE, Sly WS. *Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis*. *Annu Rev Physiol* 2002;64:663-80.
- Fleming RE et al. *Orchestration of iron homeostasis*. *New Engl J Med* 2005; 352: 1741-4.
- Floras JS et al. *Increased sympathetic outflow in cirrhosis and ascites: direct evidence from intraneural recordings*. *Ann Intern Med* 1991; 114: 373-80.
- Folkow B. *Hypertensive structural changes in systemic precapillary resistance vessels: how important are they for in vivo hemodynamics?* *J Hypertens* 1995; 13: 1546-9.
- Fox CJ et al. *Effects of body iron stores and haemochromatosis genotypes on coronary heart disease outcomes in the Busselton health study*. *J Cardiovasc Risk* 2002; 9: 287-93.
- Furlan R et al. *Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R224-32.
- Gadegbeku CA et al. *Raising lipids acutely reduces baroflex sensitivity*. *Am J Hypertens* 2002; 15: 479-85.
- Gaenzer H et al. *Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis*. *JACC* 2002; 40: 2189-94.
- Gandon Y et al. *Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI*. *Lancet* 363:357-362, 2004
- Gansevoort RT et al. *Antiproteinuric effect of blood-pressure-lowering agents: a meta-analysis of comparative trials*. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1963-74.
- Gavin YO et al. *Role of L-type channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy*. *J Mol Med* 2006; 84: 349-364.
- Giannattasio C et al. *Effects of acute changes in blood viscosity on radial artery flow mediated dilation in hemochromatosis patients*. Tenth European meeting on Hypertension, Goteborg, Sweden, ESH 2000. *Journal of Hypertension*: 2000, 18 (suppl 2): 183.
- Gochee PA et al. *A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation*. *Gastroenterology* 2002; 122: 646-51.

Graham LN et al. *Sympathetic drive in anterior and inferior uncomplicated acute myocardial infarction*. *Circulation* 2004; 109: 2285-9.

Grassi G. *Role of the sympathetic nervous system in human hypertension*. *J Hypertens* 1998b; 16: 1979-87.

Grassi G et al. *Cardiopulmonary reflex before and after regression of left ventricular hypertrophy in essential hypertension*. *Hypertension* 1988; 12: 227-37.

Grassi G et al. *Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure*. *Circulation* 1995; 92: 3206-11.

Grassi G et al. *Sympathetic nervous system*. In: Wilson PA et al. (eds) "Heart failure". New York: Churchill Livingstone 1997; 199-214.

Grassi G et al. *Baroflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension*. *Hypertension* 1998a; 31: 68-72.

Grassi G. et al. *Body weight reduction, sympathetic nerve traffic, and arterial baroreflex in obese normotensive humans*. *Circulation* 1998b; 97: 2037-42.

Grassi G et al. *How to assess sympathetic activity in humans*. *J Hypertens* 1999; 17: 719-34.

Grassi G. *Renin-angiotensin-sympathetic crosstalks in hypertension: reappraising the relevance of peripheral interactions*. *J Hypertens* 2001; 19: 1713-6.

Grassi G e Mancia G. *Sistema nervoso simpatico e ipertensione*. Monografie di aggiornamento sull'ipertensione. Ed. Primula 2002.

Grassi G. et al. *Effects of hypertension and obesity on the sympathetic activation of heart failure patients*. *Hypertension* 2003; 108: 560-65.

Grassi G. *Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004a; 13: 513-9.

Grassi G. *Sympathetic and baroreflex function in hypertension: implications for current and new drugs*. *Curr Pharm Des* 2004b; 10: 3579-89.

Grassi G et al. *Effect of central and peripheral fat distribution on sympathetic and baroflex function in obese normotensive*. *J Hypertens* 2004c; 22: 2363-9.

Grassi G et al. *Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome*. *Diabetologia* 2005; 48: 1359-65.

Grassi G et al. *Excessive sympathetic activation in heart failure with obesity and metabolic syndrome: characteristics and mechanisms*. *Hypertension* 2007; 49: 535-41.

Grassi G et al. *Sympathetic and baroflex cardiovascular control in hypertension-related left ventricular dysfunction*. *Hypertension* 2009; 53: 205-9.

Greenwood JP et al. *The magnitude of sympathetic hyperactivity in pregnancy-induced hypertension and preeclampsia*. Am J Hypertens 2003; 16: 194-9.

Greenwood JP et al. *Hypertensive left ventricular hypertrophy: relation to peripheral sympathetic drive*. J Am Coll Cardiol 2001; 38: 1711-7.

Guyader D et al. *Noninvasive Prediction of Fibrosis in C282Y Homozygous Hemochromatosis*. Gastroenterology 1998; 115: 929-36.

Henriksen JH et al. *Reduced central blood volume in cirrhosis*. Gastroenterology 1989; 97: 1506-13.

Henriksen JH et al. *The sympathetic nervous system in liver disease*. J Hepatol 1998; 29: 328-41.

Hjemdahl P et al. *Determination of plasma catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison with a radioenzymatic method*. Life Sci 1979; 25: 131-38.

Houston MC. *The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction*. Altern Ther Health Med 2007; 13: S128-S133.

Huang PL et al. *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature 1995; 377: 239-42.

Huggett RJ et al. *Impact of type 2 diabetes mellitus on sympathetic neural mechanism in hypertension*. Circulation 2003; 108: 3097-101.

Ishak K et al. *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. J Hepatol 1995; 22: 696-99.

Ishii M et al. *Elevated plasma catecholamines in hypertensive with primary glomerular disease*. Hypertension 1983; 5: 545-51.

Ishizaka N et al. *Iron overload augments angiotensin II-induced cardiac fibrosis and promotes neointima formation*. Circulation. 2002; 106 :1840-6.

Ito A et al. *Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylaminohydrolase*. Circulation 1999; 99: 3092-5.

Jamerson KA et al. *Reflex sympathetic activation induces acute insulin resistance in the human forearm*. Hypertension 1993; 21: 618-23.

Johansson M et al. *Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension*. Circulation 1999; 99: 2537-42.

Karayannis G et al. *Left atrial remodeling contributes to the progression of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction to chronic symptomatic heart failure*. Heart Fail Rev 2008; 13: 91-8.

- Kasiske BL et al. *Effect of antihypertensive therapy on the kidney in patients with diabetes: a meta-regression analysis.* Ann Intern Med 1993; 118: 129-38.
- Katholi RE et al. *Decrease in peripheral sympathetic nervous system activity following renal denervation or upclipping in the one-kidney one-clip Goldblatt hypertensive rat.* J Clin Invest 1982; 69: 55-62.
- Katholi RE et al. *Intrarenal adenosine produces hypertension by activating the sympathetic nervous system via the renal nerves in the dog.* J Hypertens 1984; 2: 349-59.
- Katholi RE et al. *Intrarenal adenosine produces hypertension via renal nerves in the one-kidney, one clip rat.* J Hypertens 1985; 7: 188-93.
- Kelm M et al. *Left ventricular mass is linked to cardiac noradrenaline in normotensive and hypertensive patients.* J Hypertens 1996; 14: 1357-64.
- Khaliulin I et al. *Cardioprotective and antioxidant effects of apomorphine.* Free Radic Res 2003; 37: 721-30.
- Koomans HA et al. *Sympathetic hyperactivity in chronic renal failure: a wakeup call.* J Am Soc Nephrol 2004; 15:524-37.
- Kotanko P. *Cause and consequences of sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease.* Blood Pur 2006; 24: 95-9.
- Klein IH et al. *Sympathetic activity is increased in polycystic kidney disease and is associated with hypertension.* J Am Soc Nephrol 2001; 12:2427-33.
- Krukoff TL. *Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions.* Brain Res Brain Res Rev 1999; 30: 52-65.
- Lamarche B et al. *The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects.* Diabetes Metab 1999; 25: 199-211.
- Laasko M et al. *Decreased effect of insulin to stimulate muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance.* J Clin Invest 1990; 85: 1844-52.
- Laasko M et al. *Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM.* Diabetes 1992; 41: 1076-83.
- Lauffer RB. *Iron stores and the international variation in mortality from coronary artery disease.* Med Hypotheses 1991; 35: 96-102.
- Le Lan C et al. *Redox active plasma iron in C282Y/C282Y hemochromatosis.* Blood 2005; 105: 4527-31.
- Leenen FH. *Brain mechanisms contributing to sympathetic hyperactivity and heart failure.* Circ Res 2007; 64: 437-47.

- Leimbach Jr WN et al. *Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patient with heart failure.* Circulation 1986; 73: 913-9.
- Lembo G et al. *Abnormal sympathetic overactivity evoked by insulin in the skeletal muscle of patients with essential hypertension.* J Clin Invest 1992; 90: 24-9.
- Lepori M et al. *Haemodynamic and sympathetic effects of inhibition of nitric oxide synthase by systemic infusion of N(G)-monomethyl-L-arginine into humans are dose dependent.* J Hypertens 1998; 16: 519-23.
- Lin M et al. *Role of iron in NF-kappa B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages.* Am J Physiol 1997; 272: G1355-G64.
- Lindley TE et al. *Superoxide is involved in the central nervous system activation and sympathoexcitation of myocardial infarction-induced heart failure.* Circ Res 2004; 94: 402-9.
- Link G et al. *Iron loading of cultured cardiac myocytes modifies sarcolemmal structure and increases lysosomal fragility.* J Lab Clin Med 1993; 121: 127-34.
- Link G, Pinson A, Hershko C. *Hearth cell in culture: A model of myocardial iron overload and chelation.* J. Lab. Clin. Med.1985;106:147-153.
- Lockett CJ e Arbuckle D. *Lead, ferritin, zinc, and hypertension.* Bull Environ Contam Toxicol 1987; 38: 975-80.
- Long CS et al. *Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of culutred rat herat muscle cells.* J Clin Invest 1989; 83: 1078-82.
- Lopes HF et al. *The pressor response to acute hyperlipidemia is enhanced in lean normotensive offspring of hypertensive parents.* Am J Hypertens 2001; 14: 1032-7.
- Mancia G et al. *Arterial baroflex in humans.* IN: Shepherd JT, Abboud FM (eds) "Handbook of Physiology". Bethesda: Am J Physiol Society 1983; 755-93.
- Mancia G et al. *Intractions between the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system.* In Laragh GH, Brenner BH (eds). "Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management". New York: Raven Press 1996; 399-409.
- Mancia G. *The Bjorn Folkow Awards lecture. The sympathetic nervous system in hypertension.* J Hypertens 1997; 15: 1553-65.
- Mancia G et al. *Reflex control of the circulation in experimental and human hypertension.* In Zanchetti A, Mancia G eds. Handbook of Hypertension Vol 17, Pathophysioogy of Hypertension. Amsterdam; Elsevier; 1997; 568-601.
- Mancia G et al. *Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage.* Hypertension 1999; 34: 724-8.

- Mancia G. *Le applicazioni cliniche delle metodiche di valutazione del sistema nervoso autonomo*. It Heart J 2001; 2: 823-30.
- Mancia G et al. *The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome*. J Hypertens 2007; 25: 909-20.
- Mangoni AA et al. *Effect of sympathectomy on mechanical properties of common carotid and femoral arteries*. Hypertension 1999; 34: 724-8.
- McGrath BP et al. *Catecholamines in peripheral venous plasma in patients on chronic hemodialysis*. Clin Sci Mol Med 1978; 55: 89-96.
- Minqin R et al. *Correlation of iron and zinc levels with lesion depth in newly formed atherosclerotic lesions*. Free Radic Biol Med 2003; 34: 746-52.
- Miyamoto Y et al. *Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension*. Hypertension 1998; 32: 3-8.
- Monami M et al. *IDF and ATP-III definitions of metabolic syndrome in the prediction of all-cause mortality in type 2 diabetic patients*. Diabetes Obes Metab 2007; 9: 350-3.
- Moncada S et al. *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Eng J Med 1993; 329:2002-12.
- Montosi G et al. *Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene*. J Clin Invest 2001; 108: 619-23.
- Muhlestein JB. *Cardiac abnormalities in hemochromatosis*. In: Hemochromatosis. Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. Ed Janes C Barton and Corwin Q Edwards 2000; 297-311.
- Muntzel MS et al. *Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity*. Am J Physiol 1994; 267: R1350-5.
- Narkiewicz K et al. *The sympathetic nervous system and obstructive sleep apnea: implications for hypertension*. J Hypertens 1997; 15: 1613-9.
- Navas-Acien A et al. *Bone lead levels and blood pressure endpoints: a meta-analysis*. Epidemiology 2008; 19: 496-504.
- Neunteufl T et al. *The sympathetic nervous system is related to the extent and severity of coronary artery disease*. Atherosclerosis 1997; 129: 111-8.
- Niederau C et al. *Survival and cause of death in cirrhotic and non-cirrhotic patients with primary hemochromatosis*. New Engl J Med 1985; 313: 1256-62.
- Niederau C et al. *Long term survival in patients with hereditary hemochromatosis*. Gastroenterology 1996; 110: 1107-9.
- Nolte W et al. *Glucose metabolism and liver cirrhosis*. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1995; 103: 63-74.

- O'Hare JA et al. *Effect of insulin on plasma norepinephrine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in obese men.* Metabolism 1989; 38: 322-9.
- Olson LJ et al. *Cardiac iron deposition in idiopathic hemochromatosis: histologic and analytic assessment of 14 hearts from autopsy.* J Am Coll Cardiol 1987 ;10: 1239-43.
- Olson LJ et al. *Endomyocardial biopsy in hemochromatosis: clinicopathologic correlates in six cases.* J Am Coll Cardiol 1989; 13 :116-20.
- Oudit GY et al. *L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry in cardiomyocytes in iron overload cardiomyopathy.* Nat Med 2003; 9: 1187-94.
- Palka P et al. *The role of doppler left ventricular filling indexes and doppler tissue echocardiography in the assessment of cardiac involvement in hereditary hemochromatosis.* J Am Soc Echocardiogr 2002; 15: 884-90.
- Paolisso G et al. *Elevated plasma fatty acid concentrations stimulate the cardiac autonomic nervous system in healthy subjects.* Am J Clin Nutr 2000; 72: 723-30.
- Patel MB et al. *Altered structure and function of the heart in dogs with chronic elevation in plasma norepinephrine.* Circulation 1991; 84: 2091-100.
- Patel KP et al. *Role of nitric oxide in central sympathetic outflow.* Exp Biol Med 2001; 226: 814-24.
- Pepper GS et al. *Sympathetic activation in heart failure and its treatment with beta-blockade.* Arch Int Med 1999; 159: 225-34.
- Peterson JR et al. *Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension.* Curr Hypertens Rep 2006; 8: 232-41.
- Petrie JR et al. *Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease.* Circulation 1996; 93: 1331-3.
- Philippe MA et al. *Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle.* World J Gastroenterol 2007; 13: 4746-54.
- Pietrangelo A. *Hemochromatosis 1998: is one gene enough?* Journal of Hepatology.1998. 29: 502-9.
- Pietrangelo A. *Non-HFE hemochromatosis.* Hepatology 2004a; 39: 21-29.
- Pietrangelo A et al. *Mechanism of disease: the role of hepcidin in iron homeostasis-implication for hemochromatosis and other disorders.* Nat Clin Pract Gastroenterol Hepathol 2004b; 1: 39-45.
- Pietrangelo A. *Hemochromatosis: a new look to an hold disease.* N Engl J Med 2004c; 350: 2383 – 2397.

- Piperno A et al. *Preclinical hypogonadism in genetic hemochromatosis in early stage of the disease: evidence of hypothalamic dysfunction*. J Endocrinol Invest 1992; 15: 423-8.
- Piperno A et al. *The ancestral hemochromatosis haplotype is associated with a severe phenotype expression in Italian patients*. Hepatology 1996; 24: 43-6.
- Piperno A et al. *Heterogeneity of hemochromatosis in Italy*. Gastroenterology 1998; 114: 996-1002.
- Piperno A et al. *Two novel missense mutations of HFE in five unrelated patients with Hemochromatosis*. Gastroenterology 2000; 119: 441-5.
- Piperno A et al. *Effects of venesections and restricted diet in patients with the insulin-resistance hepatic iron overload syndrome*. Liver Int 2004; 24: 471-6.
- Pozzi M et al. *Patterns of regional sympathetic nerve traffic in preascitic and ascitic cirrhosis*. Hepatology 2001; 34: 1113-18.
- Randin D et al. *Effects of adrenergic and cholinergic blockade on insulin-induced stimulation of calf blood flow in humans*. Am J Physiol 1994; 266: R809-16.
- Reaven GM. *Role of insulin resistance in human disease(syndrome X): an expanded definition*. Ann Rev Med 1993; 44: 121-31.
- Reid IA. *Interaction between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure*. Am J Physiol 1992; 262: E763-78.
- Ritz E et al. *New insights into mechanisms of blood pressure regulation in patients with uraemia*. Nephrol Dial Transplant 1996; 11: S52-9.
- Rodrigo J et al. *Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain*. Philos Trans R Soc Lond B Biol 1994; 345: 175-221.
- Rosenqvist M e Hulcrantz R. *Prevalence of a haemochromatosis among men with clinically significant bradyarrhythmias*. Eur Heart J 1989; 10: 473-8.
- Ryan J et al. *Impaired reactivity of the peripheral vasculature to pressor agents in alcoholic cirrhosis*. Gastroenterology 1993; 105: 1167-72.
- Sahn DJ et al. *Recommendations regarding quantification in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements*. Circulation 1978; 58: 1076-83.
- Salonen JT et al. *High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men*. Circulation 1992; 86 :803-11.
- Sartori C et al. *Insulin as a vasoactive hormone. At the crossroad of metabolic and cardiovascular regulation*. J Hyperten 1999; 17: 1517-25.
- Scherrer U et al. *Suppression of insulin induced sympathetic activation and vasodilatation by dexamethasone in humans*. Circulation 1993; 88: 388-94.

Scherrer U et al. *Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans.* J Clin Invest 1994a; 94: 2511-5.

Scherrer U et al. *Body fat and sympathetic nerve activity in healthy subjects.* Circulation 1994b; 89: 2634-40.

Scherrer U et al. *Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity.* Circulation 1997; 96: 4104-13.

Scherrer U e Sartori C. *Insulina s a vascular and sympathoexcitatory hormone.* Circulation 1997; 96: 4104-13.

Scherrer U et al. *Defective nitric oxide synthesis: a link between metabolic insuli resistance, sympathetic overactivity and cardiovascular morbidity.* Eur J Endocrinol 2000; 142: 315-23.

Schiller NB et al. *Reccomendations for quantification of the left ventricle by two-dimensionall echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standars, Subcommittee on Quantification of Two-Dimensional Echocardipograms.* J Am Soc Echocardiogr 1989; 2: 358-67.

Schlaich MP et al. *Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy.* Circulation 2003; 108: 1711-7.

Schlaich MP et al. *Sympathetic activation in chronic renal failure.* J Am Soc Nephrol 2009; 20: 933-9.

Schohn D et al. *Norepinephrine-related mechanism in hypertension accompanying renal failure.* Kidney Int 1985; 28: 814-22.

Schroeder HA. *Cadmium, chromium, and cardiovascular disease.* Circulation 1967; 35: 570-82.

Scotet V et al. *Impact of HFE genetic testing on clinical presentation of hereditary hemochromatosis: new epidemiological data.* BMC Med Genet. 2005; 6: 24.

Sempos CT et al. *Body iron stores and the risk of coronary heart disease.* N Engl J Med. 1994; 330: 1119-24.

Serne EH et al. *Microvascular function relates to insulin sensitivity and blood pressure in normal subjects.* Circulation 1999; 99: 896-902.

Shesely EG et al. *Elevated blood pressure in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.* Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 1317681.

Shoji M et al. *Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan.* Life Sci 2000; 66: 2557-62.

- Smith PA et al. *Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension*. Am J Hypertens 2004; 17: 217-22.
- Stadler N et al. *Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 949-54.
- Straznický NE et al. *Effect of dietary weight loss on sympathetic activity and cardiac risk factors associated with the metabolic syndrome*. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 5998-6005.
- Sullivan JL. *The iron paradigm of ischemic heart disease*. Am Heart J 1989; 117: 1177-88.
- Tarazi RC et al. *The multifactorial role of catecholamines in hypertensive cardiac hypertrophy*. Eur Heart J 1982; 3: A103-10.
- Templin C et al. *Cardiac hemochromatosis*. Int J Cardiol. 2007; 116:e109-10.
- Tentolouris N et al. *Perturbed autonomic nervous system function in metabolic syndrome*. Neuromol Med 2008; 10: 169-78.
- Thielen V et al. *Hematochromatosis and diabetes*. Rev Med Liege. 2004 ;59: 29-31.
- Tripodskiadis F et al. *The sympathetic nervous system in heart failure*. JACC 2009; 54: 1747-62.
- Trueb L et al. *Insulin resistance evoked by orthostasis-induced sympathetic activation is α -adrenergically mediated*. Diabetes 1996; 45: 97A.
- Turbino Ribeiro S ML et al. *Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure*. J Nutr 2003; 133: 15-20
- Valenti L et al. *Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study*. Am J Gastroenterol 2007; 102: 1251-8.
- Vallbo AB et al. *Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves*. Physiol Rev 1979; 59: 919-957.
- Vinik AI. *Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy*. Am J Med 1999; 175-265.
- Vollenweider P et al. *Impaired insulin-induced sympathetic neural activation and vasodilatation in skeletal muscle in obese humans*. J Clin Invest 1994; 2354-71.
- Voogd A et al. *Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts*. J Clin Invest 1992; 90: 2050-5.
- Wang Tl et al. *Sick sinus syndrome as the early manifestation of cardiac hemochromatosis*. J Electrocardiol 1994; 27 :91-6.

- Watson AM et al. *Mechanisms of sympathetic activation in heart failure*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2006; 33: 1269-74.
- Westra WH et al. *Progressive hemochromatotic cardiomyopathy despite reversal of iron deposition after liver transplantation*. Am J Clin Pathol 1993; 99 :39-44.
- Williams RE et al. *Treatment with desferroxamine ischemia improved functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts*. Circulation 1991; 83: 1006-14.
- Xu H et al. *Nitric oxide-independent effects of tempol on sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281: H975-80.
- Yamada Y et al. *Impaired baroflex control of sympathetic changes in muscle sympathetic nerve activity in adolescents who have a history of essential hypertension*. J Hypertens 1988; 6: S525-8.
- Yoshimura T et al. *Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia*. J Soc Gynecol Investing 2000; 7: 238-41.
- Zanzinger J et al. *Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide*. Am J Physiol 1995; 268:R958-62.
- Zhang J et al. *Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA*. Am J Physiol 1998; 275: R728-34.
- Zimmerman MC et al. *Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function*. Progr Biophys Mol Biol 2004; 84: 125-49.