

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO in
SCIENZE FISIOPATOLOGICHE, NEUROPSICOBIOLOGICHE E
ASSISTENZIALI DEL CICLO DELLA VITA
XXV ciclo

TESI di DOTTORATO di RICERCA
**RIDOTTA ATTIVITA' DEL SISTEMA OSSIDO NITRICO/GMP CICLICO
PIASTRINICO NELL'IPERALDOSTERONISMO PRIMARIO**

Settore disciplinare MED/09

di MARTA RESCALDANI
Matr. R08595

TUTOR: Prof. FABIO MAGRINI

COORDINATORE: Prof. ROBERTO WEINSTEIN

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

Ossido nitrico	pg.2
-Aspetti biochimici	pg.2
-GMPc come secondo messaggero di NO	pg.3
-Sistemi GMPc dipendenti	pg.3
NO e funzione endoteliale	pg.4
-Fattori di rischio cardiovascolare	pg.5
NO/GMPc e piastrine	pg.8
Aldosterone e sistema NO/GMPc:	pg.11
Scopo del Lavoro	pg.16
Materiali e Metodi	pg.17
-Pazienti	pg.17
-Protocollo	pg.17
-Analisi umorali	pg.18
-Analisi statistica	pg.19
Risultati	pg.20
Discussione	pg.22
Conclusioni	pg.25
Bibliografia	pg.26
Tabelle	pg.33
Figure	pg.35

OSSIDO NITRICO

L'ossido nitrico (NO) è una molecola gassosa, liposolubile, altamente diffusibile, che esercita numerose funzioni vasoprotettive (fig.1a).

Aspetti biochimici

NO viene sintetizzato dall'enzima NO-sintetasi (NOS) a partire dal precursore L-arginina (1).

Nei mammiferi esistono tre isoforme dell'enzima NOS (2), denominate neuronale (nNOS, NOS tipo 1), inducibile (iNOS, NOS tipo 2) e endoteliale (eNOS, NOS tipo 3).

L'isoforma eNOS è espressa costitutivamente nelle cellule endoteliali, che sono la fonte principale di NO vascolare in condizioni fisiologiche. La sintesi di NO avviene in maniera pulsatile, in conseguenza dell'aumento dell'attività dell'enzima eNOS dopo il legame con la calmodulina in presenza di concentrazioni crescenti di Ca^{2+} (1); la reazione genera NO e L-citrullina (3) (fig.2).

eNOS è espresso anche su cardiomiociti, piastrine, neuroni, cellule epiteliali del tubulo renale e sui sincizio-trofoblasti placentari (1).

GMP ciclico come secondo messaggero di NO

NO diffonde attraverso la membrana nella cellula bersaglio e interagisce con il suo recettore, la guanilil-ciclastasi solubile (NO-GC). NO-GC è un eterodimero costituito da due subunità, α e β , che catalizza la formazione del secondo messaggero GMPc (guanosina monofosfato ciclico) da GTP (guanosina trifosfato) (fig.1b).

GMPc è il mediatore degli effetti intracellulari di NO a livello della muscolatura vascolare e delle piastrine (fig.3) (4). GMPc esercita le sue funzioni interagendo con le protein chinasi, con i canali ionici e con le fosfodiesterasi (fig.4).

GMPc è idrolizzato alla sua forma inattiva 5'-GMP dalla GMPc-fosfodiesterasi (PDEs) (5).

Sistemi GMPc-dipendenti

Oltre a NO, il GMPc è il secondo messaggero di un altro importante sistema implicato nella regolazione cardiovascolare, cioè i peptidi natriuretici. A differenza di NO, che stimola la GC solubile nel citoplasma della cellula bersaglio, i peptidi natriuretici ANP, BNP e CNP interagiscono con la guanilil-ciclastasi di membrana (5, 6). I peptidi natriuretici inducono diuresi, natriuresi, vasodilatazione, inibizione della sintesi di aldosterone e della secrezione di renina e quindi hanno un ruolo importante nel controllo della volemia e della pressione arteriosa (PA). La secrezione di ANP e

BNP avviene principalmente in risposta allo stiramento del muscolo cardiaco e porta ad un'aumentata escrezione renale di acqua ed elettroliti, antagonizzando funzionalmente il RAS. A livello vascolare, i peptidi natriuretici interagiscono con la forma particolata della guanilil-ciclastasi (7), espressa in abbondanza sulla membrana delle cellule endoteliali. Da notare che le piastrine non possiedono la GC di membrana, cioè il recettore biologicamente attivo dei peptidi natriuretici.

NO e FUNZIONE ENDOTELIALE

L'endotelio è un "organo" metabolicamente attivo in grado di rilasciare numerosi fattori vasoattivi. Un endotelio integro inibisce l'adesione piastrinica e leucocitaria alla superficie vascolare e mantiene l'equilibrio tra attività profibrinolitica e protrombotica (8) (fig.5).

NO derivato dall'endotelio contribuisce a mantenere la vasodilatazione, a favorire il flusso sanguigno e a regolare la pressione arteriosa (9).

La funzione endoteliale viene valutata principalmente in termini di vasodilatazione endotelio-dipendente, di cui NO è il principale mediatore.

I principali fattori di rischio cardiovascolare come fumo, ipercolesterolemia, ipertensione, diabete, sono associati a disfunzione endoteliale, caratterizzata da uno stato pro-infiammatorio e protrombotico dell'endotelio. Queste alterazioni della funzione endoteliale rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi e

delle sue complicanze.

L'aumentato stress ossidativo presente nelle malattie vascolari favorisce la degradazione di NO tramite la sua reazione con O₂⁻; lo stress ossidativo è stato dimostrato convertire anche eNOS da un enzima produttore di NO in enzima che genera O₂⁻ (NOS uncoupling) (1).

ADMA (dimetil-L-arginina simmetrica) è un inibitore endogeno di eNOS; elevato ADMA è stato associato anche a uncoupling di eNOS; l'attività dell'enzima chiave nella produzione di ADMA PRMT tipo 1 (protein N-metiltransferasi) e dell'enzima degradante ADMA DDAH (dimetilarginina dimetilaminoidrossilasi) è redox-sensitiva: lo stress ossidativo determina un'aumentata concentrazione di ADMA (1).

Fattori di rischio cardiovascolare

I principali fattori di rischio cardiovascolare sono associati a disfunzione endoteliale, ovvero ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente e ridotto rilascio di NO (8).

Il fumo di sigaretta è associato a disfunzione endoteliale misurata come ridotta FMD (flow mediated dilation), la cui gravità è inversamente correlata alla durata del fumo (10); piastrine di fumatori di lungo corso rilasciano meno NO durante l'aggregazione indotta da collagene, originando livelli più bassi di GMPc piastrinico rispetto ai non fumatori (11).

Un progressivo peggioramento del rilascio endotelio-dipendente da acetilcolina è stato associato al progredire dell'età (12); l'attivazione di NOS3 piastrinico è ridotto in soggetti più anziani (>45 aa) rispetto a soggetti più giovani, che presentano anche livelli di GMPc piastrinico più elevati (9).

Gli estrogeni possono stimolare la produzione di NO aumentando l'espressione e l'attività di eNOS (13); questo meccanismo contribuisce alla protezione cardiovascolare nelle donne in età pre-menopausale rispetto agli uomini e alle donne in età post-menopausale. Inoltre, gli estrogeni proteggono le cellule endoteliali dalla rigidità attraverso l'attivazione dell'antiporto di membrana sodio/protoni, che non risponde a progesterone e testosterone (14). Gli estrogeni possono anche modulare l'attivazione del sistema renina-angiotensina (RAS): in animali da esperimento, le femmine sono meno responsive agli effetti ipertensivanti dell'angiotensina II rispetto ai maschi (15); il testosterone provoca up-regulation della produzione di angiotensinogeno, dell'attività reninica e dell'espressione dei recettori di tipo 1 dell'angiotensina II, potenziando in questo modo il braccio vasocostrittore del RAS (16).

Una ridotta dilatazione endotelio-dipendente è presente nell'ipercolesterolemia familiare e il grado della disfunzione è correlato ai livelli di lipoproteina(a) (17). Le specie reattive dell'ossigeno, inclusi superossido e perossido d'idrogeno, modificano le molecole di colesterolo

LDL (low-density lipoprotein) formando LDL ossidate (ox-LDL), che stimolano le cellule endoteliali ad esprimere molecole di adesione leucocitaria portando al reclutamento di monociti e linfociti T, che invadono l'intima (18). Le ox-LDL stimolano l'attivazione piastrinica riducendo il trasporto di L-arginina nelle piastrine e riducendo l'espressione di NOS3 piastrinico (19). I macrofagi derivati dai monociti ricchi di NADPH ossidasi amplificano la generazione di specie reattive dell'ossigeno e assumono ox-LDL attraverso i recettori scavenger diventando foam cells. Cellule T e macrofagi all'interno delle lesioni aterosclerotiche producono chemochine e citochine con migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari nell'intima che promuovono la formazione della matrice extracellulare e secernono metalloproteinasi, contribuendo alla patogenesi della rottura di placca (18). Le statine, farmaci inibitori della sintesi di colesterolo, hanno effetti favorevoli nelle malattie cardiovascolari, indipendenti dall'abbassamento del colesterolo, come il miglioramento della funzione endoteliale, la stabilizzazione della placca aterosclerotica, l'inibizione dello stress ossidativo e l'infiammazione e la riduzione della risposta trombogenica. Questi effetti delle statine sono in parte mediate da effetti su eNOS perché possono essere inibiti dagli inibitori di eNOS e sono assenti in topi eNOS-deficient (1); nei ratti, il trattamento con statine protegge dalla trombosi arteriosa stimolando il rilascio di NO endoteliale e piastrinico e causando up-regulation dell'espressione dell'RNA (acido

ribonucleico) messaggero di NOS 3 piastrinico (20). Il colesterolo HDL (high-density lipoprotein) può stimolare la produzione di NO (fig.6) (20). In piastrine umane isolate è stato dimostrato che HDL attiva NO sintetasi e migliora molte funzioni piastriniche (ad esempio riduce il rilascio di serotonina, inibisce la risposta aggregante ad adrenalina, riduce la formazione di trombo ex vivo); l'effetto antiplastrinico del colesterolo HDL attraverso l'attivazione del sistema NO/GMPc potrebbe fornire un meccanismo patogenetico per la relazione tra dislipidemia e aumentato potenziale trombogenico (22). E' inoltre stata dimostrata un'interazione tra il sistema NO/GMPc e HDL nell'inibire la secrezione di Aldo (23).

NO/GMPc e PIASTRINE

Le piastrine sono cellule anucleate del sangue che derivano dai megacariociti.

Le piastrine sono essenziali per l'emostasi primaria e la riparazione dell'endotelio, ma svolgono un ruolo centrale anche negli eventi aterotrombotici che sono responsabili delle principali complicanze dell'ipertensione arteriosa umana (fig 7) (24).

La trombosi arteriosa è la complicanza acuta che si sviluppa sulle lesioni croniche dell'aterosclerosi e può causare infarto miocardico e ictus, a tutt'oggi le più comuni cause di mortalità nei paesi sviluppati. Le piastrine, con la fibrina, sono componenti prominenti del trombo che può portare

all'occlusione dell'arteria, ma possono anche partecipare allo sviluppo e alla progressione della placca aterosclerotica.

Nel sito di lesione le piastrine sono attivate rapidamente; il primo evento è un cambio di conformazione: perdono la loro forma discoide e diventano sferiche con pseudopodi e irregolarità di membrana; questo cambiamento aumenta la loro attività procoagulante (9). Dopo il cambio di forma, le piastrine aderiscono alla matrice subendoteliale, esposta dopo la lesione, attraverso l'interazione di vWF (fattore di von Willebrand) con il suo recettore GPIb-IX-V, costitutivamente espresso sulla superficie piastrinica (25). Per l'aggregazione primaria è essenziale il legame del fibrinogeno con il suo recettore GPIIb-IIIa, che permette al fibrinogeno di legarsi a piastrine adiacenti portando alla formazione del trombo (9). Il reclutamento di altre piastrine avviene soprattutto grazie al rilascio del contenuto dei granuli densi (ADP e Ca^{2+}) e α -granuli (fibrinogeno) oltre che alla sintesi de novo di prostaglandine e trombossano A2 (TXA2); questo porta ad amplificazione della risposta piastrinica, con aggregazione irreversibile e formazione di un trombo stabile (9).

Tutti i componenti del sistema NO/GMPc, inclusi eNOS e guanilil-ciclastasi solubile, sono stati indentificati nel citoplasma delle piastrine (26).

Le piastrine producono NO in quantità minori rispetto alle cellule endoteliali. NOS3 piastrinica come quella endoteliale è Ca^{2+} -calmodulina

regolata e richiede NADPH (nicotinamide adenina dinucleotide fosfato) per la sua attività (9). Radomski et al (26) hanno dimostrato che L-arginina inibisce l'aggregazione piastrinica in modo dose-dipendente (fig. 8). L-NMMA (N-monometilarginina), un inibitore non-specifico di NOS, stimola l'aggregazione e inibisce la produzione di GMPc in risposta a questi agenti. NO generato dalle piastrine agisce con un meccanismo di feedback negativo che regola l'attivazione piastrinica stessa. (8).

NO stimola la forma solubile di GC nelle piastrine causando aumento di GMPc e attivazione di protein chinasi (PKG) GMPc-dipendente; questo causa inibizione dell'attivazione piastrinica attraverso vari meccanismi: PKG promuove il refilling dei depositi intrapiastrinici di Ca^{2+} SERCA- (sarco/endoplasmatic reticulum calcio-ATPasi) dipendenti, inibendo l'influsso di Ca^{2+} e altri cationi e riducendo i livelli intracellulari di Ca^{2+} (8).

NO derivato da piastrine inibisce il reclutamento di altre piastrine al trombo in formazione; questo processo è iniziato da piastrine attivate al sito di lesione vascolare grazie alla secrezione di ADP, serotonina e TXA2 e promuove la deposizione di trombina e la formazione del trombo sulla superficie piastrinica. In vitro, NO piastrinico inibisce l'aggregazione eterotipica tra leucociti e piastrine; l'inibizione di NOS3 piastrinico aumenta l'espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica dopo stimolazione con ADP, essenziale per l'interazione tra piastrine e leucociti (8) (fig.9).

L'attività basale di NOS piastrinico è ridotta in condizioni patologiche caratterizzate da elevato rischio cardiovascolare come il diabete mellito (27).

Nell'ipertensione arteriosa, possono intervenire modificazioni morfo-funzionali delle piastrine (fig.10). La produzione di NO piastrinico è ridotta negli ipertesi (28); i livelli di ADMA, inibitore endogeno di eNOS, sono maggiori negli ipertesi che nei normotesi e questo può portare ad una marcata inibizione di NOS3 piastrinico negli ipertesi (9).

Nei pazienti con malattia coronarica è stata riportata una ridotta produzione endoteliale di NO, documentata come ridotta FMD rispetto a soggetti con coronarie indenni (29).

La parallela riduzione del rilascio di NO piastrinico riportata in queste condizioni contribuisce ad aggravare la tendenza trombotica presente in questi pazienti (9).

ALDOSTERONE e sistema NO/GMPc

Aldo è uno steroide con attività mineralocorticoide, prodotto nella zona glomerulosa delle ghiandole surrenali. Il classico bersaglio di Aldo è il tubulo convoluto distale renale dove agisce sui recettori mineralocorticoidi citosolici che con diversi meccanismi modulano i canali del sodio epiteliali e i canali del potassio inducendo aumentato riassorbimento di sodio ed

escrezione di potassio, regolando così il bilancio di sodio e potassio e dei fluidi.

Siti leganti Aldo ad alta affinità sono stati documentati non solo nei tubuli renali ma anche nelle cellule muscolari lisce del sistema cardiovascolare, nei leucociti mononucleari umani, nell'ippocampo e nelle ghiandole mammarie (30). L'attivazione dei recettori mineralocorticoidi (MR) da parte di Aldo porta a dissociazione dalle molecole chaperon, traslocazione nel nucleo e legame a HRE (elementi ormone-responsivi) nella regione regolatoria dei promoter del gene target che ne aumenta l'espressione. Aldo può anche esercitare rapidi effetti non genomici, soprattutto nelle cellule muscolari lisce vascolari, e molti di questi effetti non sono bloccati dall'MR antagonista spironolattone(18).

Lo stimolo principale alla sintesi di Aldo è una riduzione del fluido extracellulare e/o un abbassamento della pressione arteriosa che innesca una cascata enzimatica che in alcuni secondi porta al rilascio dell'ormone dai surreni (31). I classici bersagli di quest'ormone sono le cellule principali del dotto collettore renale in cui Aldo si lega ai recettori intracellulari mineralocorticoidi stimolando così il riassorbimento di NaCl (cloruro di sodio) dall'ultrafiltrato renale. Insieme ad altri meccanismi (come la ritenzione di acqua da parte dell'ormone antidiuretico, ADH), NaCl e acqua sono trattenuti e la pressione torna nella norma (31).

Aldo regola l'attività e l'espressione dei canali epiteliali del sodio (ENaC) nel tubulo collettore renale; attivando ENaC, Aldo stimola volume, crescita e rigidità endoteliale (31); il bloccante di questi canali, amiloride, previene il rigonfiamento cellulare e l'irrigidimento cellulare aldosterone-indotto. (32); al contrario, i glucocorticoidi non influiscono su questi parametri (31). A livello dell'endotelio agendo su ENaC Aldo può alterare l'escrezione di NO (31).

Aldo esercita molteplici effetti sui tessuti cardiaco e vascolari strettamente correlati a ciò che è definito status sodico (fig.11); ad esempio, in ratti mantenuti a dieta povera di sodio, aldosterone ad alte dosi (30 volte il normale) non causa danno vascolare o aumento pressorio (32).

Un aumento acuto della concentrazione plasmatica di sodio, pur nel range fisiologico, può alterare le proprietà meccaniche dell'endotelio vascolare; infatti la rigidità cellulare aumenta progressivamente con gli incrementi della concentrazione extracellulare di sodio ma solo quando l'endotelio è stato trattato (sperimentalmente) con Aldo (31) (fig.12).

Un'alta concentrazione di sodio extracellulare insieme ad Aldo irrigidisce le cellule endoteliali e riduce il rilascio di NO dall'endotelio vascolare (33).

Una ridotta conversione di L-arginina a NO è stata dimostrata dopo carico salino nell'endotelio vascolare renale di ipertesi. Un carico salino causa anche up-regulation di ADMA, inibitore endogeno della NO sintetasi, con conseguenti ridotti livelli di NO (32).

Il potassio è in grado di stimolare la produzione di NO endoteliale (31).

Studi in vitro mostrano che un aumento della concentrazione extracellulare di potassio riduce sensibilmente la stiffness delle cellule endoteliali e migliora il rilascio di NO (31) (fig.13); questo effetto è particolarmente evidente in presenza di basse concentrazioni di sodio e Aldo; un effetto simile è stato osservato quando le cellule sono esposte agli estrogeni (34).

Nell'animale da esperimento, supplementi di potassio sono in grado di aumentare il rilasciamento endotelio-dipendente e la produzione di NO endoteliale (35).

Studi clinici mostrano che una dieta ricca di potassio protegge l'endotelio vascolare dall'insulto ipertensivo migliorando la FMD (36) e la compliance arteriosa nell'uomo (37).

Numerosi studi dimostrano che Aldo attraverso l'attivazione dei recettori MR causa stress ossidativo, fibrosi e infiammazione vascolare. (18). Questi effetti di Aldo sono accentuati da un elevato introito di sodio in tutti i modelli animali e sono mediati da un meccanismo potassio-dipendente (18).

Blacher et al. (30) hanno dimostrato in una popolazione di ipertesi essenziali (IE) con normali livelli plasmatici di Aldo un relazione negativa tra Aldo e compliance arteriosa sistemica non influenzata da età o valori pressori.

Numerosi studi clinici e sperimentali mostrano che Aldo è in grado di inibire l'attività di NO.

In vitro, Nagata et al. (38) hanno dimostrato che Aldo inibisce l'attività di NO sintetasi endoteliale, evidenziando un'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno; questo fenomeno era abolito dal pre-trattamento con eplerenone.

In vivo, è stata dimostrata una ridotta FMD, fenomeno in cui NO è uno dei mediatori principali, in pazienti con iperaldosteronismo primario (IPA) (39); FMD migliorava dopo trattamento con spironolattone (fig 14). E' stato inoltre dimostrato che anche l'ipertensione essenziale a bassa renina, una condizione con eccesso relativo di Aldo, è associata a una ridotta vasodilatazione NO-mediata. Al contrario, nella malattia di Addison, caratterizzata da un deficit di Aldo, è stato dimostrato che l'iponatriemia, l'iperpotassiemia e l'ipotensione tipiche di questa condizione sono associate a un'aumentata produzione di NO (32).

Numerosi studi hanno dimostrato che IPA è associato a un'aumentata prevalenza di complicanze cardiovascolari (36, 38); in particolare, nei pazienti con IPA si ha un'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari trombotici, come ictus ischemico e infarto (36), rispetto a ipertesi essenziali (IE), anche a parità di valori pressori.

SCOPO DEL LAVORO

NO esercita un effetto vasodilatante e inibisce l'aggregazione piastrinica attraverso il secondo messaggero GMPc.

Lo stress ossidativo associato all'ipertensione arteriosa e ai principali fattori di rischio cardiovascolare inibisce l'attività del sistema NO/GMPc.

Aldo esercita un potente effetto pressorio con la sua azione mineralocorticoide; evidenze sperimentali e cliniche, inoltre, mostrano che Aldo aumenta lo stress ossidativo e riduce la biodisponibilità di NO endoteliale.

In base a queste premesse, lo scopo del lavoro è stato quello di valutare se i livelli di GMPc piastrinico siano inferiori nei pazienti con IPA, una condizione caratterizzata da un eccesso cronico di Aldo con valori soppressi di PRA (attività reninica plasmatica), rispetto a un gruppo di IE, sovrapponibili per età, sesso e valori di pressione arteriosa.

MATERIALI e METODI

Pazienti

Sono stati arruolati nello studio 12 pazienti con IPA, di cui 10 con iperplasia bilaterale e 2 con adenoma monolaterale, e 32 IE.

La diagnosi di IPA veniva posta in base al riscontro di valori di PRA soppressi, aldosteronemia elevata e ARR (aldosterone to renin ratio) superiore a 70, mancata soppressione della secrezione di Aldo dopo test di espansione della volemia (infusione di due litri di soluzione fisiologica NaCl 0.9% in due ore), l'esecuzione di TC (tomografia computerizzata) addominale e di scintigrafia surrenalica con I131- colesterolo.

Il gruppo di controllo era costituito da 32 ipertesi essenziali (IE) non complicati, di sesso maschile, selezionati a posteriori in base a età e valori di pressione arteriosa clinica sovrapponibili rispetto al gruppo con IPA.

Nessun paziente assumeva terapia antipertensiva, ad eccezione degli ipertesi di grado 3 che assumevano calcio-antagonisti o alfa-bloccati fino a qualche giorno prima dello studio; nessun paziente assumeva terapia con statine o antiaggreganti.

Protocollo

Gli studi sono stati eseguiti al mattino; il paziente veniva mantenuto in posizione supina per 60 minuti, al termine di questo periodo veniva

eseguito un prelievo di sangue venoso per il dosaggio dei parametri umorali: PRA, Aldo plasmatico, ANP e GMPc plasmatico e piastrinico.

Analisi umorali

Il sangue venoso era raccolto in due provette con Na₂EDTA 5 mmol/l e conservato in ghiaccio (per la determinazione di ANP e GMP plasmatico) o a temperatura ambiente (per la determinazione di PRA e Aldo); il sangue era centrifugato a 4°C e il plasma conservato a -40°C fino al dosaggio. Il GMPc plasmatico era dosato con radioimmunoassay con kit commerciale (RPR 525; Amersham International, Slough, UK). ANP plasmatico era determinato con radioimmunoassay con C18 Sep-Pak cartridges (Waters Chromatography, Milford, MA) con antisiero commerciale (α -h-ANP; Peninsula Laboratories Europe, Merseyside, UK) e un tracer (IM 185; Amersham International, Slough, UK). PRA e Aldo erano dosati con radioimmunoassay con kits commerciali (DiaSorin, Saluggia, Italia). Colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, glucosio, elettroliti, creatinina e globuli rossi erano dosati con metodi automatizzati standardizzati; LDL era calcolato con l'equazione di Friedewald.

_GMP ciclico: il GMPc piastrinico è stato dosato con metodo radioimmunoenzimatico su estratti acidi di piastrine lavate. Il sangue venoso prelevato era raccolto in una provetta con EDTA 5 mmol/l, eparina 10 U/ml, citrato sodico al 3.8% (9:1 vol/vol) e isobutilmetilxantina (IBMX)

0.55 mmol/l e centrifugato a 200 g per venti minuti a 20 °C per ottenere plasma ricco di piastrine (PRP). Poi, il PRP era centrifugato a 1000g per dieci minuti a 20 °C, il supernatante scartato e il pellet sospeso in 550 µl di soluzione di Tyrode modificata (5 mmol/l HEPES e 0.35% albumina sierica bovina a pH 7.4). Dopo aver rimosso un'aliquota di 50 µl per il conteggio manuale delle piastrine, la sospensione era precipitata con acido tricloroacetico (concentrazione finale 6%) e centrifugata a 2000 g per quindici minuti a 4 °C. Il pellet era scartato e il soprnatante lavato con etere (5×) per estrarre acido tricloroacetico e congelato a -40 °C fino al dosaggio. Il GMPc era analizzato con radioimmunoassay con kit commerciale (RPR 525; Amersham International, Slough, UK).

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media±errore standard della media (esm); le analisi sono state eseguite con il programma di statistica Statview versione 4.1 (SAS Institute, Cary, NC).

L'analisi della varianza (Anova) a una via è stata utilizzata per i confronti tra le diverse variabili e tra i due gruppi di pazienti.

Il coefficiente di correlazione è stato calcolato con il test di Pearson.

La significatività statistica è stata stabilita per valori di $p < 0.5$.

RISULTATI

Le caratteristiche cliniche dei pazienti studiati sono elencate nella tabella 1; i due gruppi non differivano per età e indice di massa corporea (IMC); la percentuale di fumatori era simile così come i valori di PA e FC clinica, di funzione renale, glicemia e quadro lipidico.

I parametri umorali sono illustrati nella tabella 2.

I valori di PRA, per definizione, erano soppressi mentre Aldo plasmatico era circa 3 volte più elevato nell'IPA rispetto a IE; di conseguenza, il rapporto aldosterone/renina in IPA era di 230, un valore nettamente superiore ai limiti di normalità di 70. Per quanto riguarda il quadro elettrolitico, la potassiemia media era ai limiti inferiori della norma in IPA e significativamente più bassa rispetto a IE. La sodiemia risultava più alta negli IPA rispetto a IE, anche se questa differenza media era solo di 1 mEq/L.

I livelli di ANP plasmatico erano più elevati nei pazienti con IPA, una condizione caratterizzata da espansione della volemia. Consensualmente anche i livelli di GMPc plasmatico tendevano ad essere maggiori nei pazienti con IPA rispetto a IE (fig.15); nel gruppo in toto, i due parametri, ANP e GMPc plasmatico, erano correlati tra loro (fig. 16)

A fronte di livelli di GMPc plasmatico più elevati nei pazienti con IPA, negli stessi soggetti GMPc piastrinico era più basso rispetto a IE (fig.17).

I due pool di GMPc piastrinico e plasmatico non erano correlati tra loro (fig. 18).

Nel gruppo in toto, i livelli di GMPc piastrinico erano direttamente correlati con la potassiemia (fig. 19) e tendevano ad essere inversamente correlati con aldosteronemia (fig. 20) e sodiemia (fig.21).

DISCUSSIONE

In questo studio, i livelli di GMPc piastrinico, secondo messaggero di NO, nei pazienti con IPA sono risultati inferiori di circa il 30% rispetto a quelli di un gruppo di controllo di IE.

La differenza di GMPc piastrinico tra i due gruppi non era imputabile a fattori in grado di influenzare l'attività del sistema NO/GMPc come età e pressione arteriosa. In base ai criteri di selezione, infatti, età e pressione arteriosa clinica era sovrapponibili tra IPA e IE. Sfortunatamente, il monitoraggio della PA nelle 24 ore, che fornisce un indice integrato dei livelli pressori di un soggetto nel corso delle 24 ore, non era disponibile nei pazienti studiati.

La differenza di GMPc piastrinico tra i due gruppi non era attribuibile neppure all'effetto degli estrogeni, che notoriamente stimolano la produzione di NO endoteliale (13), in quanto tutti i pazienti arruolati erano di sesso maschile.

Anche un altro fattore di protezione cardiovascolare in grado di stimolare la produzione di NO come il colesterolo HDL (20) era simile tra i due gruppi.

I livelli più elevati di ANP plasmatico in IPA rispetto a IE erano correlabili con l'espansione della volemia che caratterizza l'ipertensione da mineralocorticoidi.

I peptidi natriuretici sono un importante sistema implicato nella regolazione cardiovascolare che, come NO, agisce attraverso il secondo messaggero GMPc.

Studi sperimentali e clinici indicano che il GMPc plasmatico deriva principalmente dall'endotelio, per interazione dei peptidi natriuretici con il loro recettore biologicamente attivo, guanilil-ciclastasi di membrana (7); la significativa correlazione tra i livelli di ANP e GMPc plasmatico osservata nel nostro studio è compatibile con queste osservazioni. A differenza di ANP, NO interagisce con la forma solubile dell'enzima, presente nel citoplasma delle piastrine, che peraltro non esprimono sulla loro membrana il recettore particolato per ANP.

L'assenza di correlazione tra il GMPc plasmatico e piastrinico osservata nel nostro studio supporta ulteriormente l'ipotesi che i due pool sono espressione di due sistemi diversi, il GMPc plasmatico dei peptidi natriuretici e il GMPc piastrinico di NO.

Gli studi negli animali knock-out per l'enzima NO-GC solubile provano in maniera definitiva che GMPc è il mediatore degli effetti intrapiastrinici di NO (4). Nei topi GCKO, l'aggregazione piastrinica non era inibita da donatori di NO e si associava ad una pronunciata riduzione del tempo di sanguinamento in vivo per assenza di NO signaling nelle piastrine (4).

I nostri dati non chiariscono se la ridotta attività del sistema NO/GMPc piastrinico sia da attribuire ad un effetto diretto (non-genomico) di Aldo su

cellule anucleate come le piastrine o se esso sia mediato dalle alterazioni elettrolitiche tipiche di questa condizione, in particolare la riduzione della potassiemia e l'aumento della sodiemia.

Evidenze sperimentali mostrano che entrambe queste alterazioni elettrolitiche sono in grado di inibire la produzione di NO in cellule endoteliali. (31,33).

La correlazione significativa tra potassiemia e GMPc piastrinico osservata nel nostro gruppo in toto supporta l'ipotesi che l'ipopotassiemia sia responsabile in ultima analisi della ridotta produzione di NO piastrinico negli IPA.

Dalla correlazione inversa tra GMPc piastrinico e aggregazione da Adrenalina osservato in un precedente studio, possiamo calcolare che una riduzione del 30% di GMPc piastrinico si associ ad un aumento di circa il 12% della aggregazione indotta da adrenalina (40).

Una iperattività piastrinica conseguente al deficit di NO/GMPc può essere responsabile dell'eccesso di eventi cardiovascolari, principalmente di natura trombotica, osservato nei pazienti affetti da IPA rispetto ai controlli (36).

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio mostrano che i livelli di GMPc piastrinico nei pazienti con IPA erano inferiori di circa il 30% rispetto a quelli di IE sovrapponibili per età, sesso e valori pressori.

Questo dato è compatibile con una ridotta attività del sistema NO/GMPc piastrinico nell'iperaldosteronismo primario rispetto all'ipertensione essenziale.

L'aumento dell'aggregabilità piastrinica conseguente al deficit del sistema NO/GMPc può rappresentare un importante meccanismo patogenetico per spiegare la maggiore incidenza di eventi trombotici nei pazienti con IPA.

BIBLIOGRAFIA

1. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33: 829-837
2. Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 2006; 355 (19): 2003-2011
3. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593–615
4. Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1343–1352
5. Takimoto E. Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. *Circ J* 2012; 76: 1819 – 1825
6. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2006;69 (2): 318-328
7. Blaise V, Wolf JP, Regnard J, Berthelay S. Characterization of human platelet receptors for atrial natriuretic peptide: evidence for clearance receptors. *Cell Mol Biol* 1996; 42:1173–1179
8. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial Function: a critical determinant of atherosclerosis? *Circulation* 2004; 109 (suppl II): II 27- II

9. Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-Derived Nitric Oxide Signaling and regulation. *Circ Res* 2007; 101: 654-662
10. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette Smoking Is Associated With Dose-Related and Potentially Reversible Impairment of Endothelium-Dependent Dilation in Healthy Young Adults. *Circulation* 1993; 88 (11): 2149-2155
11. Ichiki K, Ikeda H, Haramaki N, Ueno T, Imaizumi T. Long-term smoking impairs platelet-derived nitric oxide release. *Circulation* 1996; 94: 3109–3114
12. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Basile Fasolo C, Sudano I, Salvetti A. Aging and Endothelial Function in Normotensive Subjects and Patients With Essential Hypertension. *Circulation* 1995; 91: 1981-1987
13. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Jonhston A, Benjamin N, Ritter JM. Evidence for a Difference in Nitric Oxide Biosynthesis Between Healthy Women and Men. *Hypertension* 1998; 32: 730-734
14. Oberleithner H, Callies C, Kusche-Vihrog K, Schillers H, Shahin V, Riethmüller C, Macgregor GA, de Wardener HE. Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(8): 2829-2834

15. Sullivan JC, Bhatia K, Yamamoto T, Elmarakby AA. Angiotensin (1-7) receptor antagonism equalizes angiotensin II-induced hypertension in male and female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2010; 56 (4): 658-666
16. Sampson AK, Jennings GLR, Chin-Dusting JPF. Y Are Males So Difficult to Understand? : A Case Where "X" Does Not Mark the Spot. *Hypertension* 2012; 59: 525-531
17. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of Endothelium-dependent Dilation Is an Early Event in Children with Familial Hypercholesterolemia and Is Related to the Lipoprotein(a) Level. *J Clin Invest* 1994; 93(1): 50-55
18. Brown NJ. Aldosterone and Vascular Inflammation. *Hypertension* 2008; 51: 161-167
19. Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996; 93: 1740 –1746
20. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98 (11): 1352-1364

21. Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Katoh A, Imaizumi T. HMG-CoA reductase inhibitor protects against in vivo arterial thrombosis by augmenting platelet-derived nitric oxide release in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 375–381
22. Brewer HB. Increasing HDL cholesterol levels. *N Engl J Med* 2004; 350: 1491–1494
23. Goodfriend TL, Egan B, Stepniakowski K, Ball DL. Relationships among plasma aldosterone, high-density lipoprotein cholesterol, and insulin in humans. *Hypertension* 1995; 25: 30–36
24. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008; 359 (9): 938-949
25. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289 –297
26. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193–5197
27. Martina V, Bruno GA, Trucco F, Zumpano E, Tagliabue M, Di Bisceglie C, Pescarmona G. Platelet cNOS activity is reduced in patients with IDDM and NIDDM. *Thromb Haemost* 1998; 79: 520-522

28. Camilletti A, Moretti N, Giacchetti G, Faloia E, Martarelli D, Mantero F, Mazzanti L. Decreased nitric oxide levels and increased calcium content in platelets of hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2001; 14: 382-386
29. Anderson T, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrang D, Lieberman EH, Ganz P, Creager M, Yeung AC, Selwyn AP. Close Relation of Endothelial Function in the Human Coronary and Peripheral Circulations. *JACC* 1995; 26 (5): 1235-1241
30. Blacher J, Amah G, Girerd X, Kheder A, Ben Mais H, London GM, Safar ME. Association Between Increased Plasma Levels of Aldosterone and Decreased Systemic Arterial Compliance in Subjects With Essential Hypertension. *Am J Hypertens* 1997; 10: 1326–1334
31. Oberleithner H. Aldosterone makes human endothelium stiff and vulnerable. *Kidney Int.* 2005;67(5): 1680-1682
32. Oberleithner H. Is the vascular endothelium under the control of aldosterone? Facts and hypothesis. *Eur J Physiol* 2007; 454: 187–193
33. Oberleithner H, Riethmuller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(41):16281-16286

34. Hillebrand U, Lang D, Telgmann RG, Hagedorn C, Reuter S, Kliche K, Stock CM, Oberleithner H, Pavenstädt H, Büsse-maker E, Hausberg M. Nebivolol decreases endothelial cell stiffness via the estrogen receptor beta: a nano-imaging study. *J Hypertens* 2009; 27(3): 517-526
35. Zhou MS, Kosaka H, Yoneyama H. Potassium augments vascular relaxation mediated by nitric oxide in the carotid arteries of hypertensive Dahl rats. *Am J Hypertens* 2000; 13 (6): 666-672
36. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an Increased Rate of Cardiovascular Events in Patients With Primary Aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1243–1248
37. He FJ, Marciniak M, Carney C, Markandu ND, Anand V, Fraser WD, Dalton RN, Kaski JC, MacGregor GA. Effects of potassium chloride and potassium bicarbonate on endothelial function, cardiovascular risk factors, and bone turnover in mild hypertensives. *Hypertension* 2010; 55 (3): 681-688
38. Nagata D, Takahashi M, Sawai K, Tagami T, Usui T, Shimatsu A, Hirata Y, Naruse M. Molecular Mechanism of the Inhibitory Effect of Aldosterone on Endothelial NO Synthase Activity. *Hypertension* 2006; 48: 165-171

39. Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfro KY, Calhoun DA. Impaired Endothelium-Dependent Flow-Mediated Vasodilation in Hypertensive Subjects With Hyperaldosteronism. *Circulation* 2004; 109: 2857-2861
40. Sala C, Rescaldani M, Santin E, Bolla G, Cuspidi C. Clinical and Functional Correlates of Platelet Cyclic GMP in Essential Hypertensives. *Am J Hypertens* 2009; 22: 674-679

	IE (n=32 M)	IPA (n=12 M)	p
Età	51 ± 2	52 ± 3	ns
IMC, kg/m ²	28 ± 1	29 ± 1	ns
Fumatori, %	19	16	ns
PAS clinica, mmHg	157 ± 2	158 ± 5	ns
PAD clinica, mmHg	105 ± 1	106 ± 2	ns
FC, bt/min	73 ± 2	74 ± 4	ns
eGFR, ml/min	82 ± 2	81 ± 7	ns
Glicemia, mg/dl	94 ± 2	93 ± 6	ns
Colesterolo tot., mg/dl	208 ± 7	211 ± 13	ns
HDL colesterolo, mg/dl	43 ± 2	42 ± 4	ns
Hb, g/dl	15.2 ± 1	14.9 ± 1	ns
PLT, x 10 ³ /μl	218 ± 9	223 ± 19	ns

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti con ipertensione essenziale (IE) e iperaldosteronismo primario (IPA).

IMC: indice di massa corporea, PAS: pressione arteriosa sistolica, PAD: pressione arteriosa diastolica, FC: frequenza cardiaca, eGFR: filtrato glomerulare stimato, HDL: high-density lipoprotein, Hb: emoglobina, PLT: conta piastrinica

	IE (n=32 M)	IPA (n=12 M)	p
PRA, ng/ml/h	0.4 ± 0.1	0.1 ± .01	0.05
Aldosterone, ng/dl	8.1 ± 0.7	25.5 ± 8.8	<0.01
ARR	31 ± 4	230 ± 90	<0.01
Potassiemia, mEq/l	4.1 ± 0.5	3.5 ± 0.2	<0.01
Sodiemia, mEq/l	142 ± 0.4	143 ± 1.2	0.05
ANP, pmol	21 ± 2	28 ± 4	0.06
GMPc pl, nmol/l	6.3 ± 0.5	7.5 ± 0.8	ns
GMPc plt, pmol/10 ⁹ cell	7.1 ± 0.5	5.1 ± 0.4	<0.05

Tabella 2. Quadro umorale nei pazienti con IE e IPA.

PRA: attività reninica plasmatica, ARR: aldosterone to renin ratio, ANP: peptide natriuretico atriale, GMPc pl: guanosin-monofosfato ciclico plasmatico, GMPc plt: GMPc piastrinico

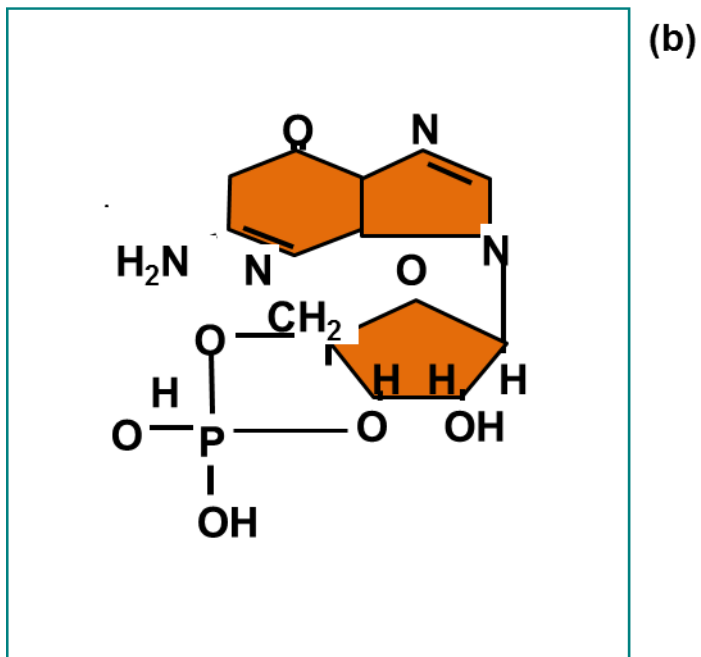
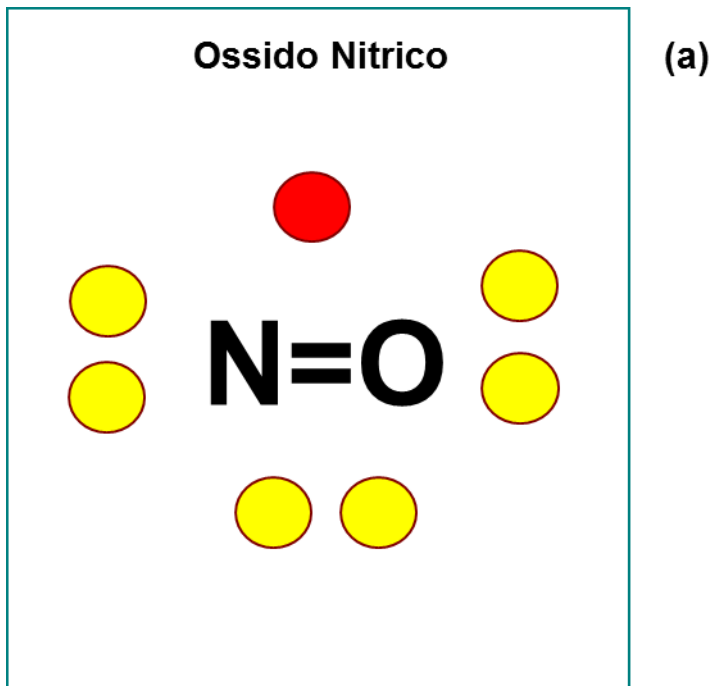


Figura 1.

Struttura molecolare di ossido nitrico (NO) (a) e del secondo messaggero guanosin-monofosfato ciclico (GMPc) (b), mediatore degli effetti intracellulari di NO.

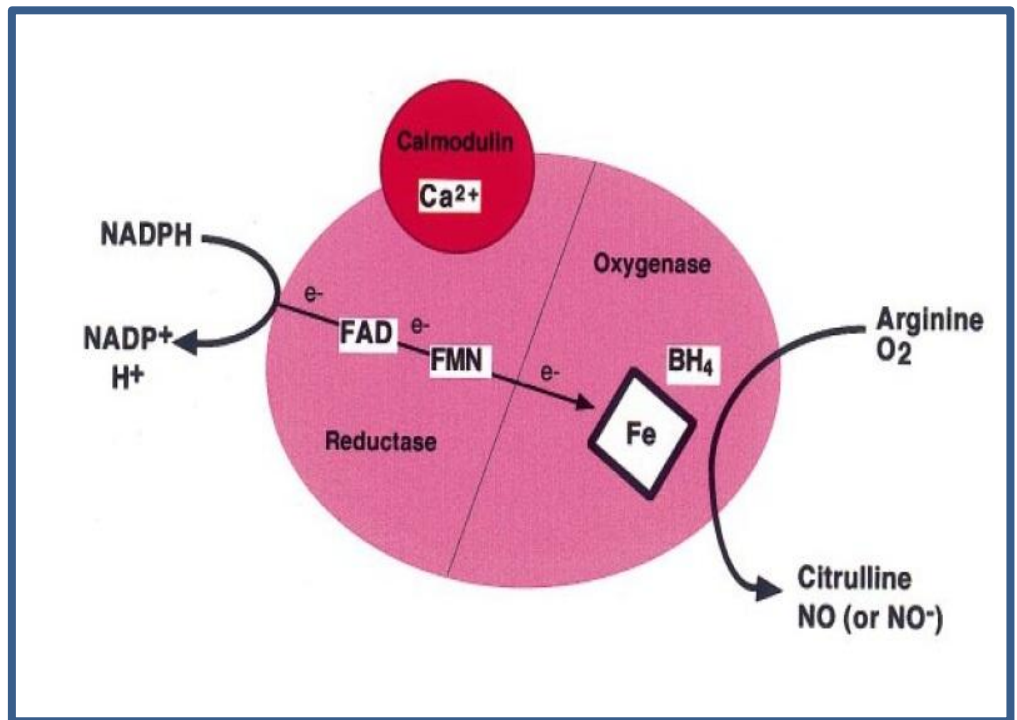


Figura 2. Sintesi di NO catalizzata dall'enzima NO sintetasi (Alderton)

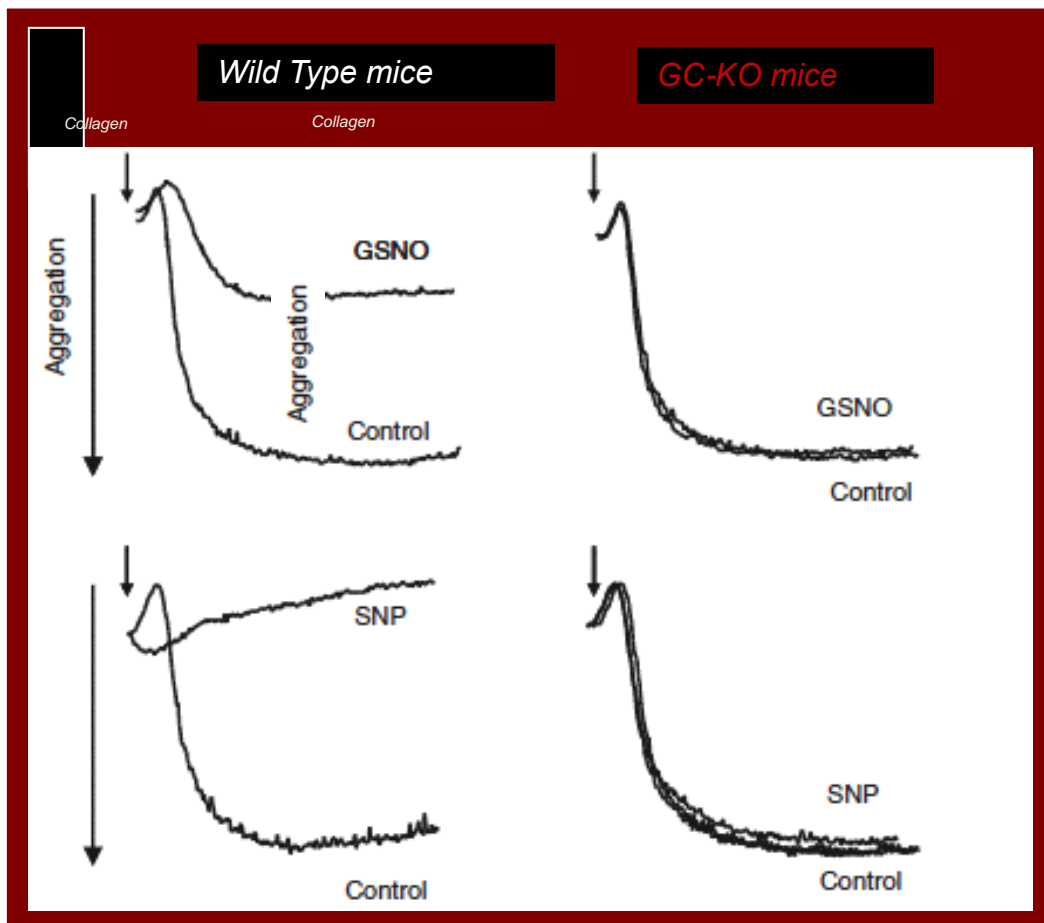


Figura 3.

Evidenza sperimentale che il GMPc è il principale mediatore degli effetti intra-piastrinici di NO

Negli animali knock-out per l'enzima guanilil-ciclastasi solubile, recettore intracellulare di NO, la somministrazione di donatori di NO (GSNO e Sodio nitroprussiato, SNP) non è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica, a differenza di quanto osservato negli animali wild-type. (ref.4)

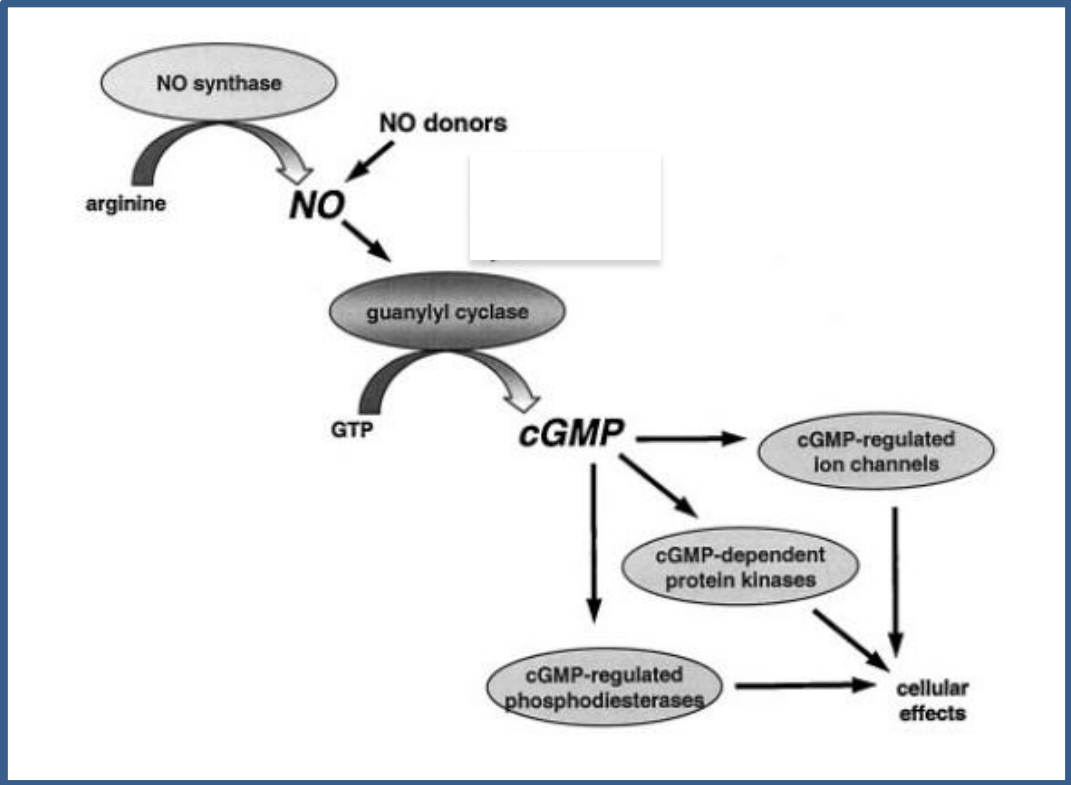
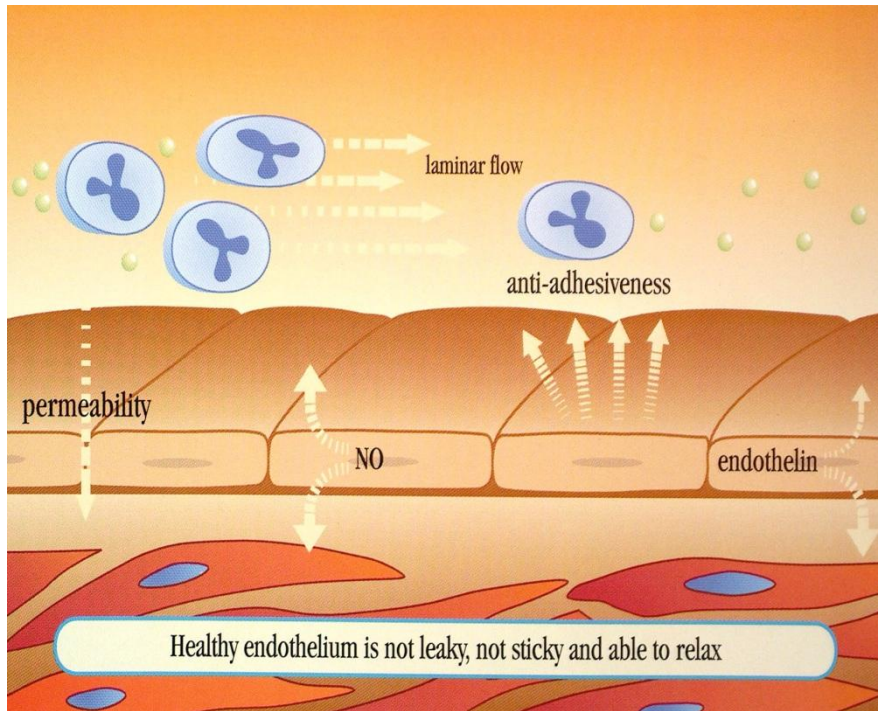


Figura 4. Sequenza di reazioni del sistema NO/GMPc .

(a)



(b)

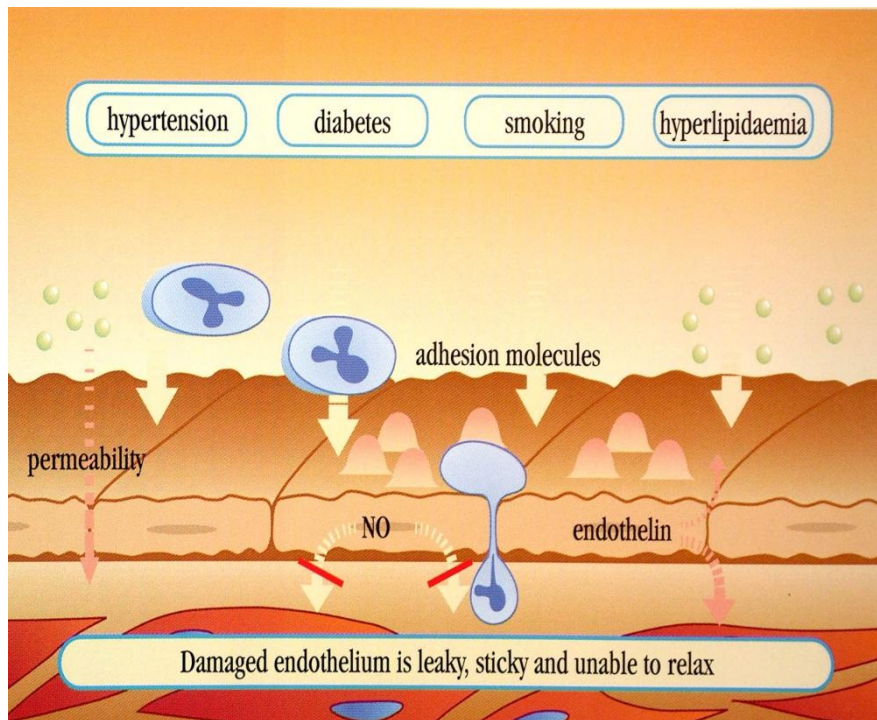


Figura 5. Caratteristiche funzionali dell' Endotelio in condizioni fisiologiche (a) e patologiche (b)

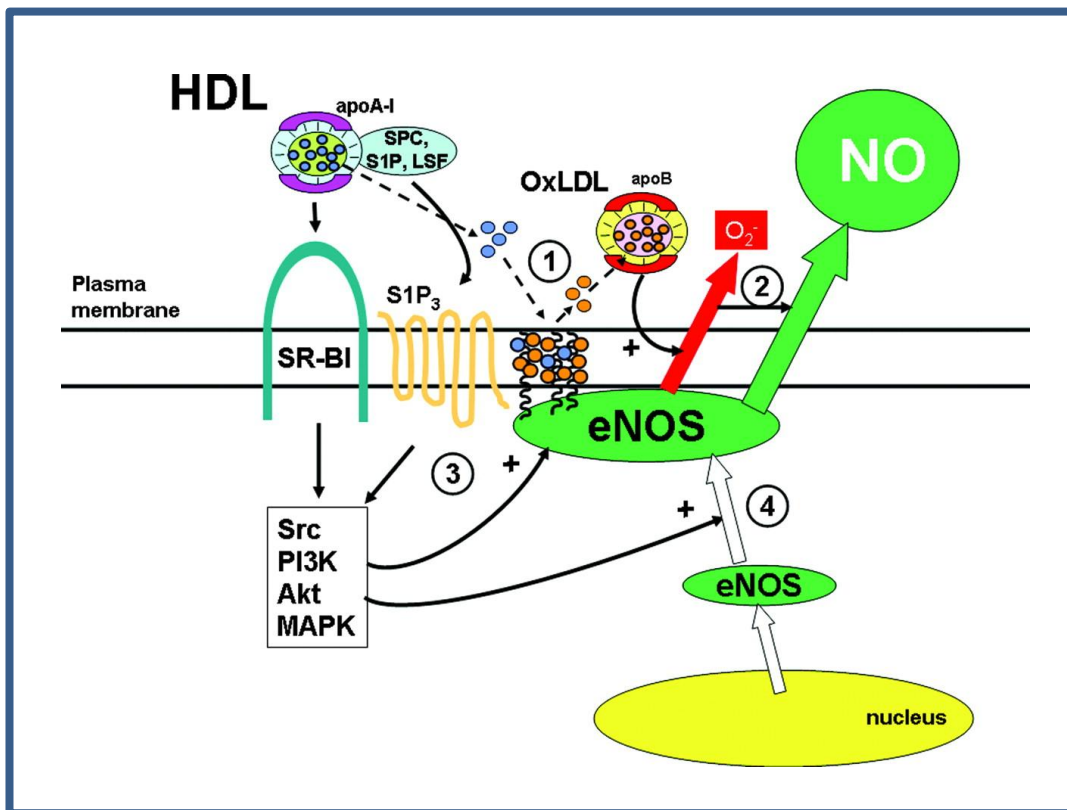


Figura 6. HDL stimola la produzione di NO (ref.20)

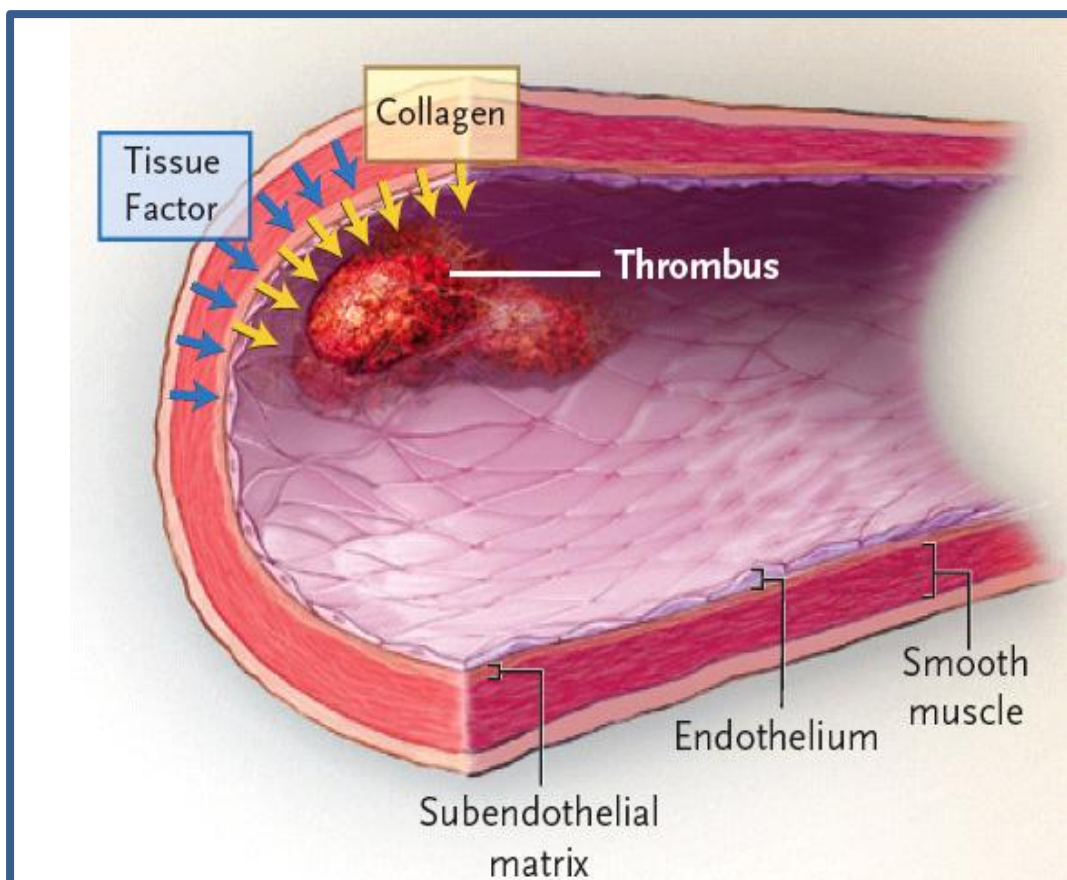
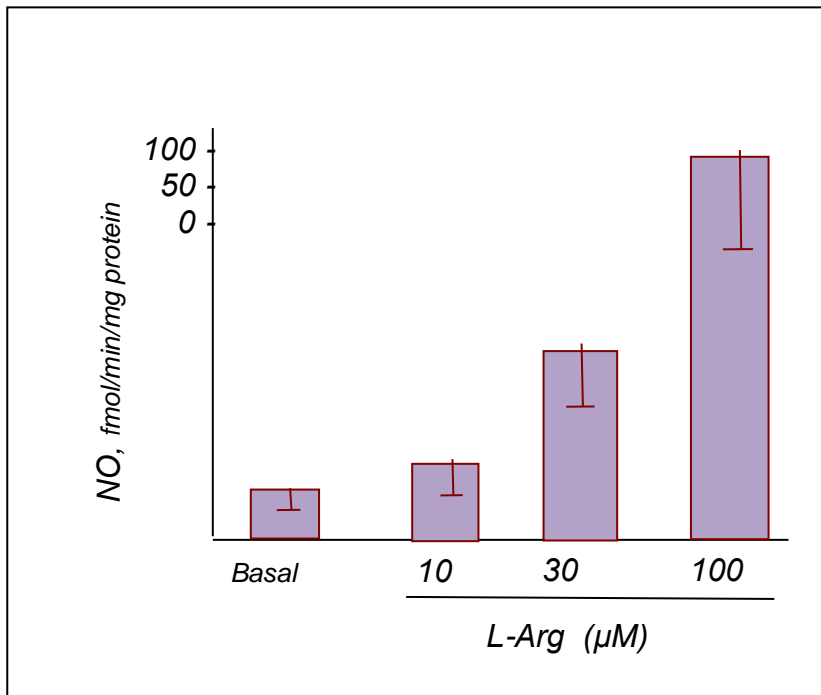


Figura 7. Le piastrine esercitano un ruolo fondamentale nella patologia cardiovascolare. La formazione del trombo piastrinico su una placca aterosclerotica costituisce l'evento precipitante nelle sindromi ischemiche cardiache e cerebrali. (ref.24)

(a)



(b)

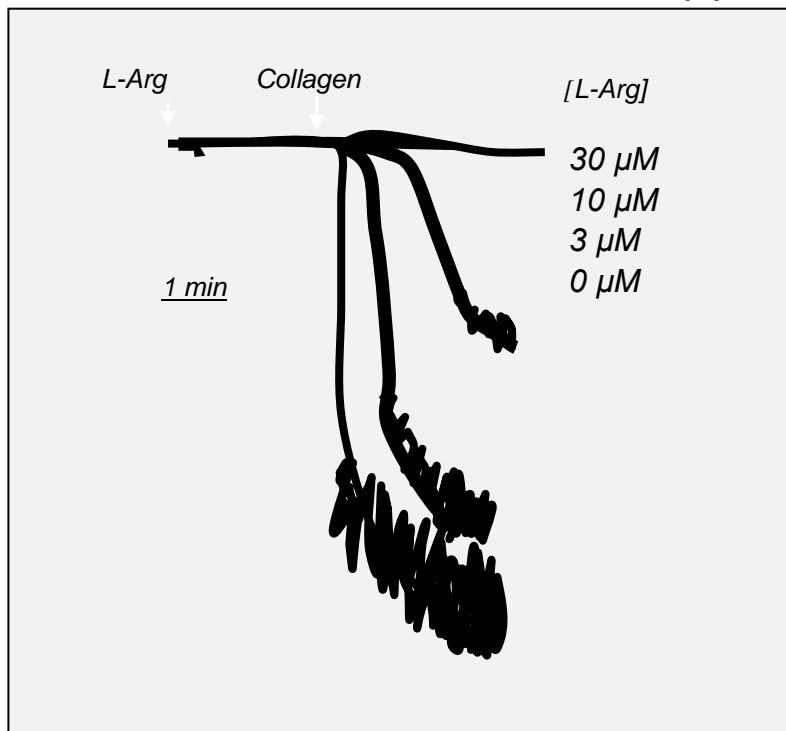


Figura 8.

Effetti di concentrazioni crescenti di L-Arginina sulla produzione di NO intrapiastrinico (a)

Inibizione della aggregazione piastrinica indotta da collagene in presenza di concentrazioni crescenti di L-arginina, precursore di NO (ref. 26)

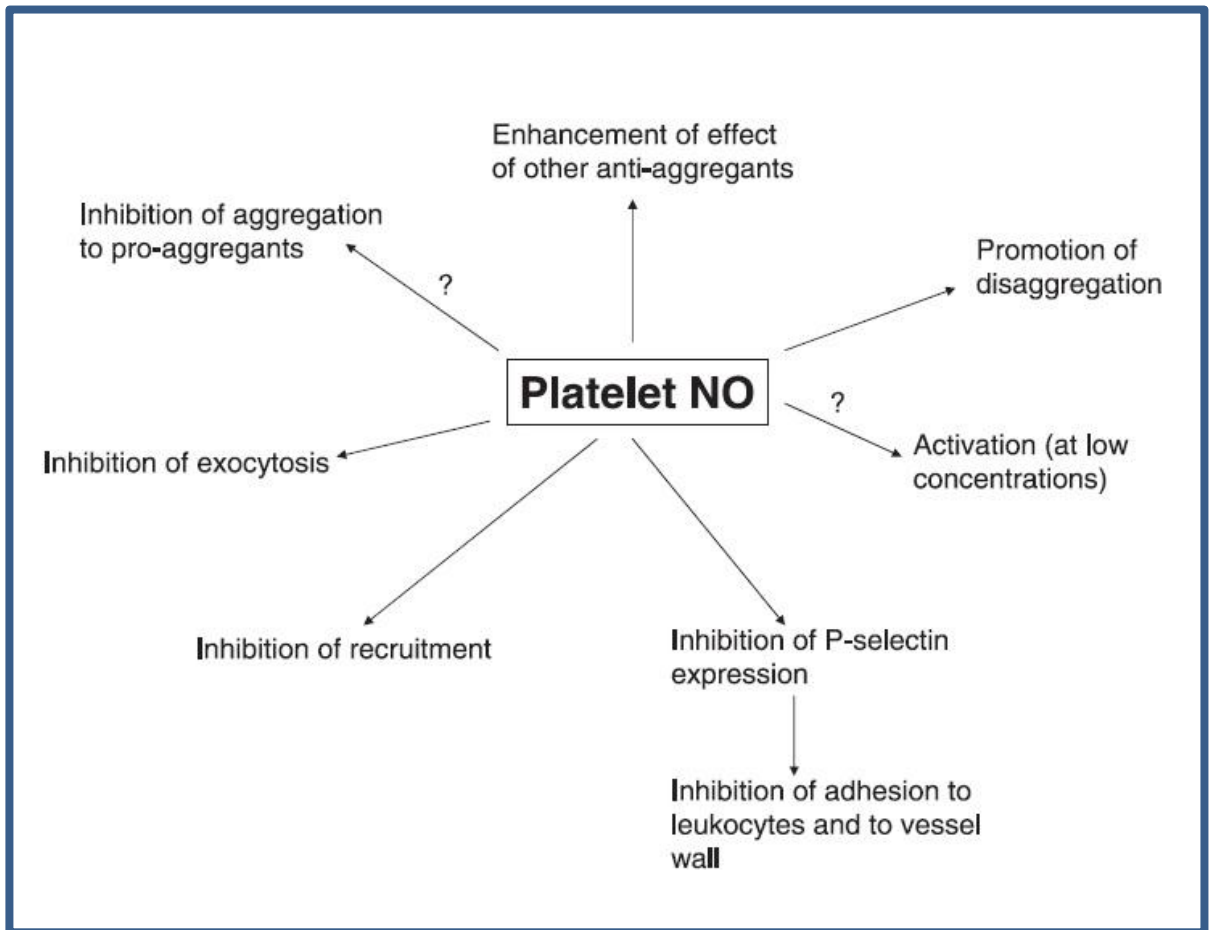


Figura 9. Effetti di NO sulla attività piastrinica

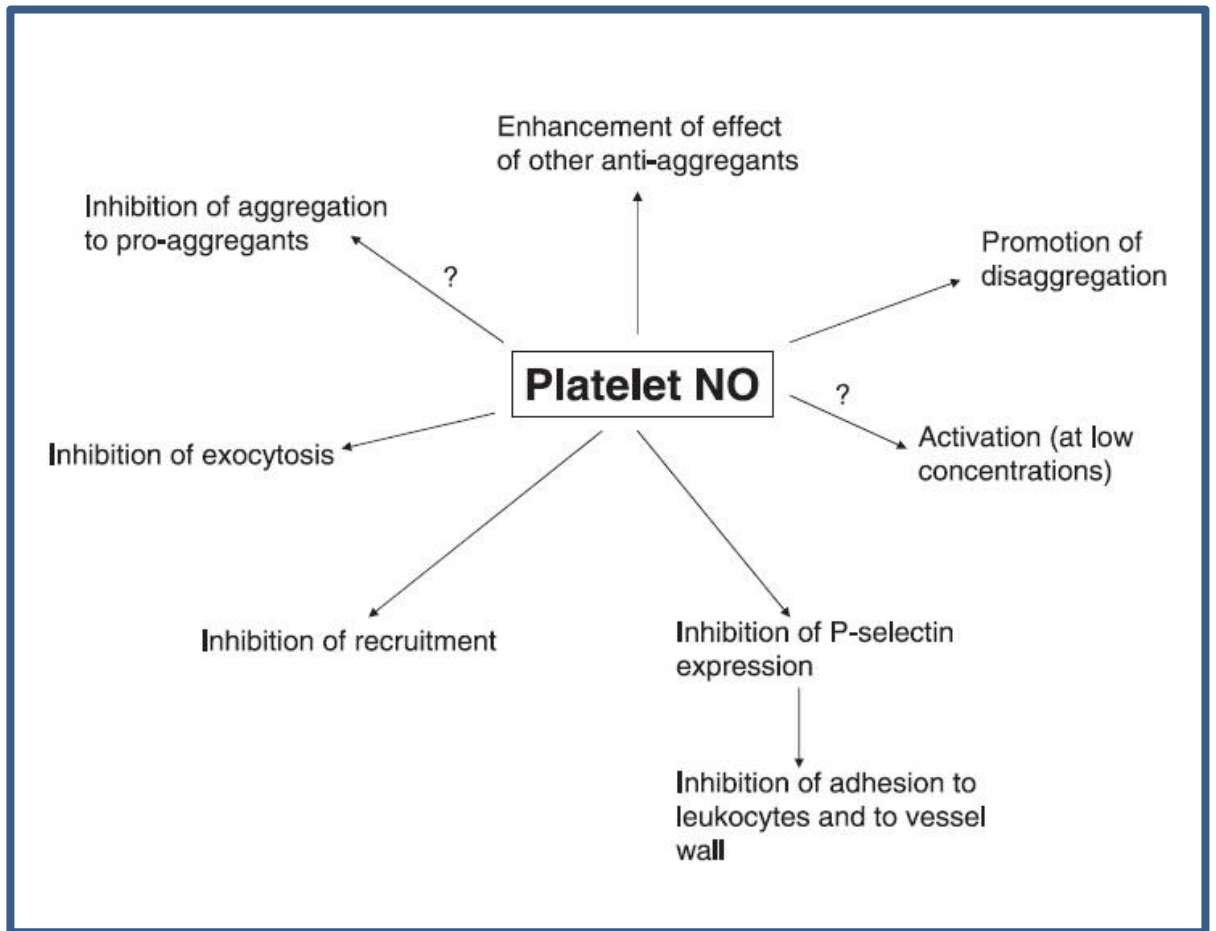


Figura 10. Effetti di NO sulla attività piastrinica

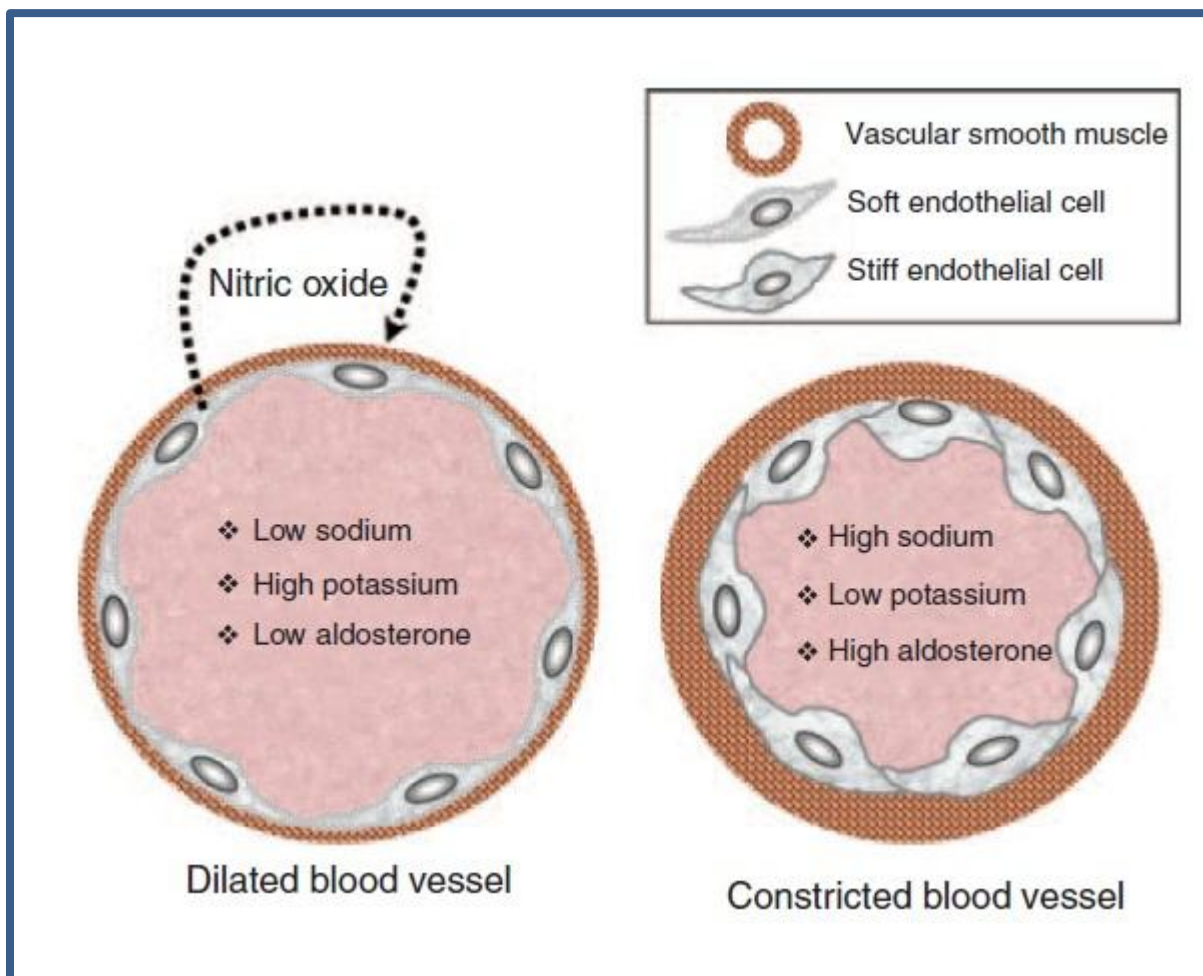


Figura 11. Possibili meccanismi con cui Sodio, potassio e Aldo contribuiscono alla regolazione del tono vascolare (31)

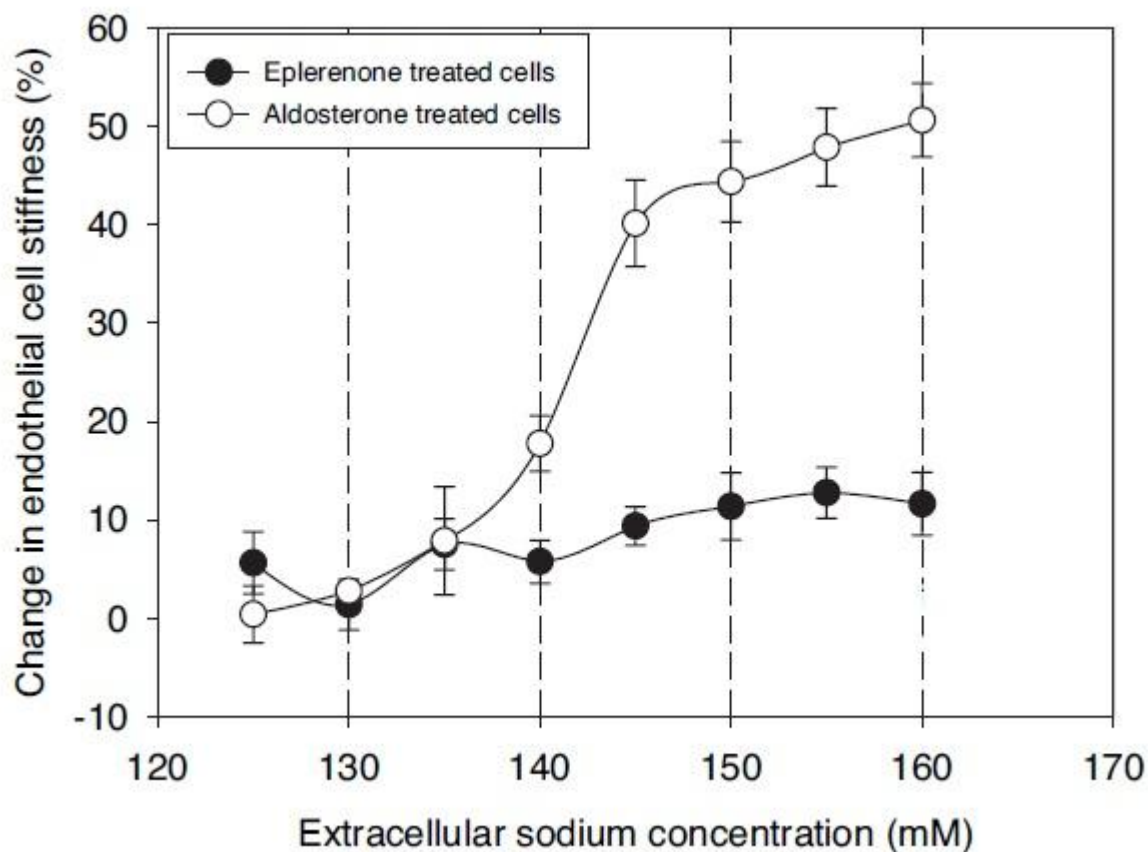


Figura 12. Aumento della rigidità delle cellule endoteliali indotto da Aldosterone in presenza di concentrazioni crescenti di sodio extracellulare. L'effetto viene abolito dal pretrattamento con l'antagonista dei recettori mineralocorticoidi eplerenone. (ref.33)

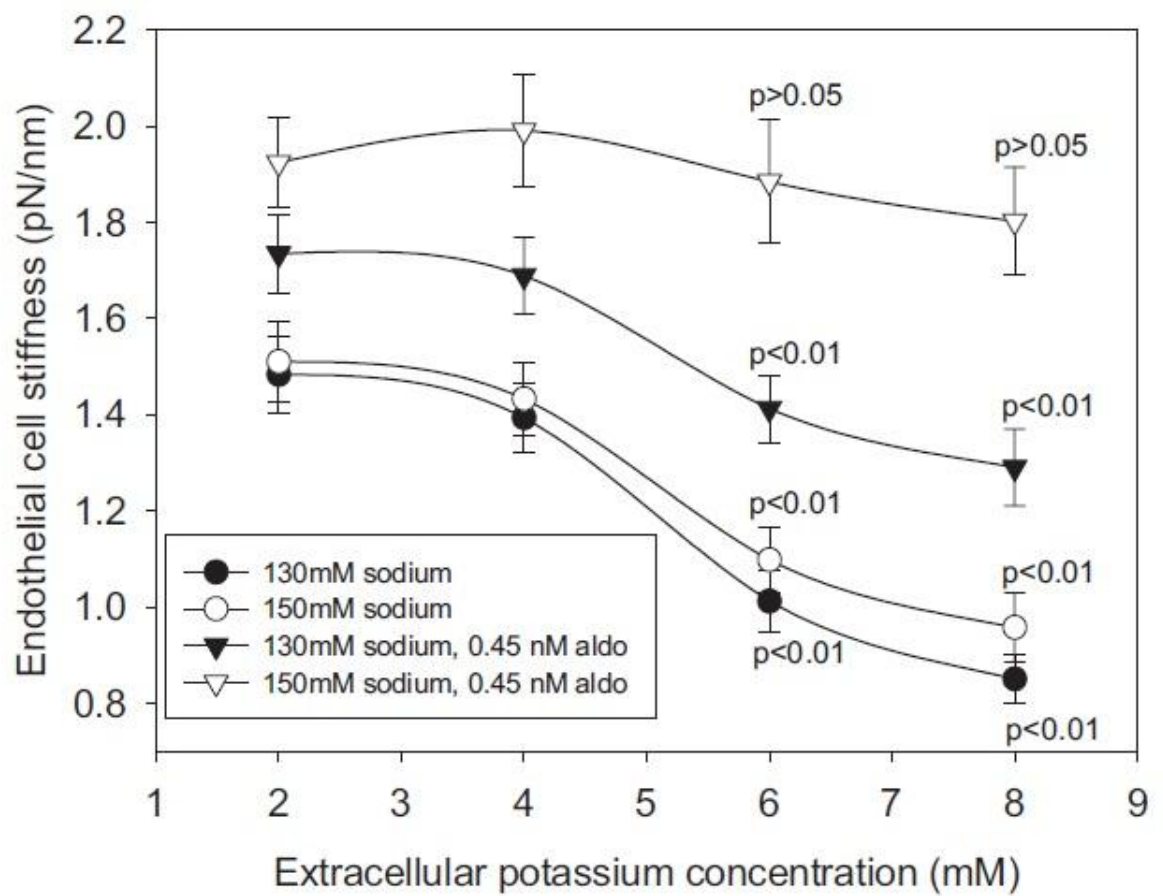


Figura 13. Relazione tra concentrazione extracellulare di potassio e rigidità delle cellule endoteliali (ref,14)

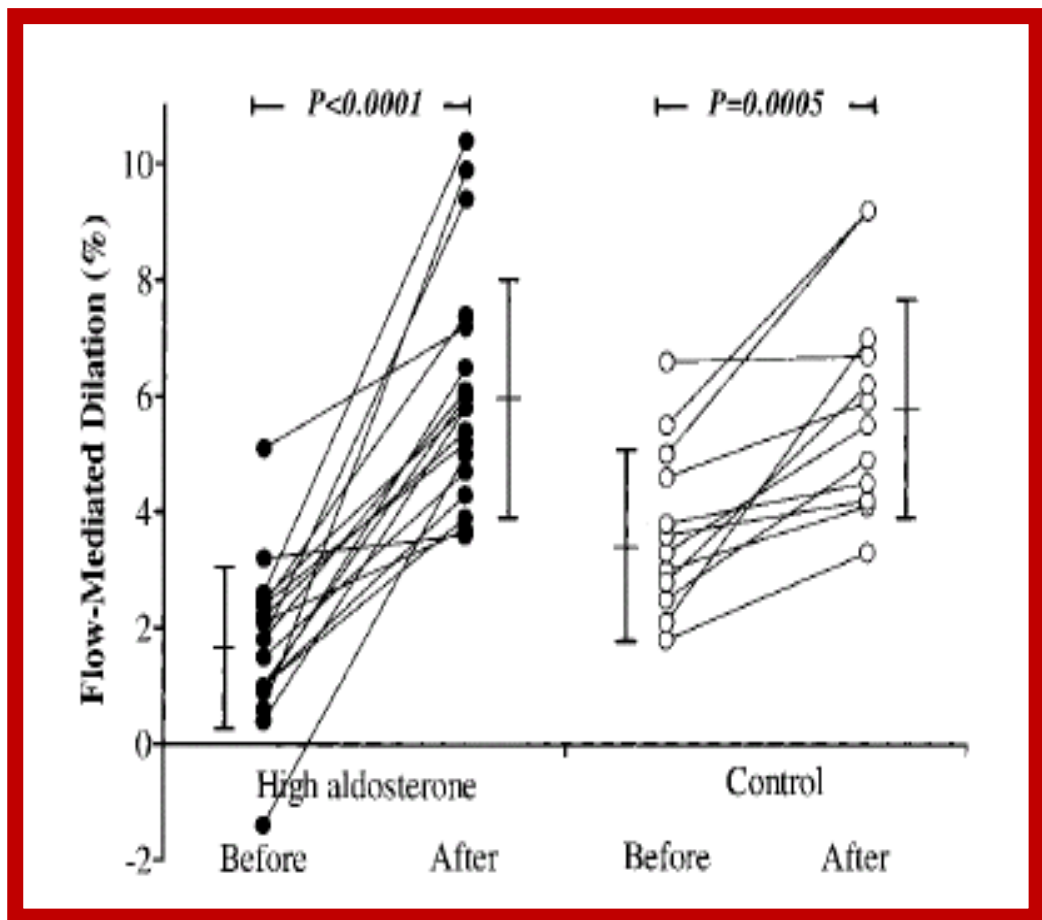


Figura 14. Incremento della vasodilatazione flusso mediata dopo trattamento antialdosteronico con spironolattone in soggetti con iperaldosteronismo e in ipertesi essenziali (ref.39)

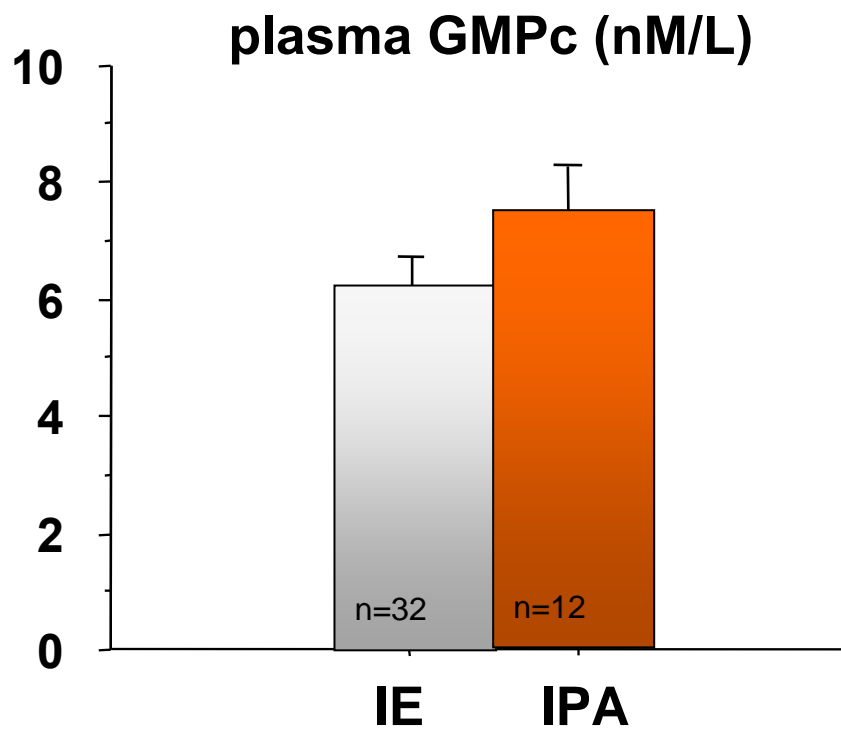
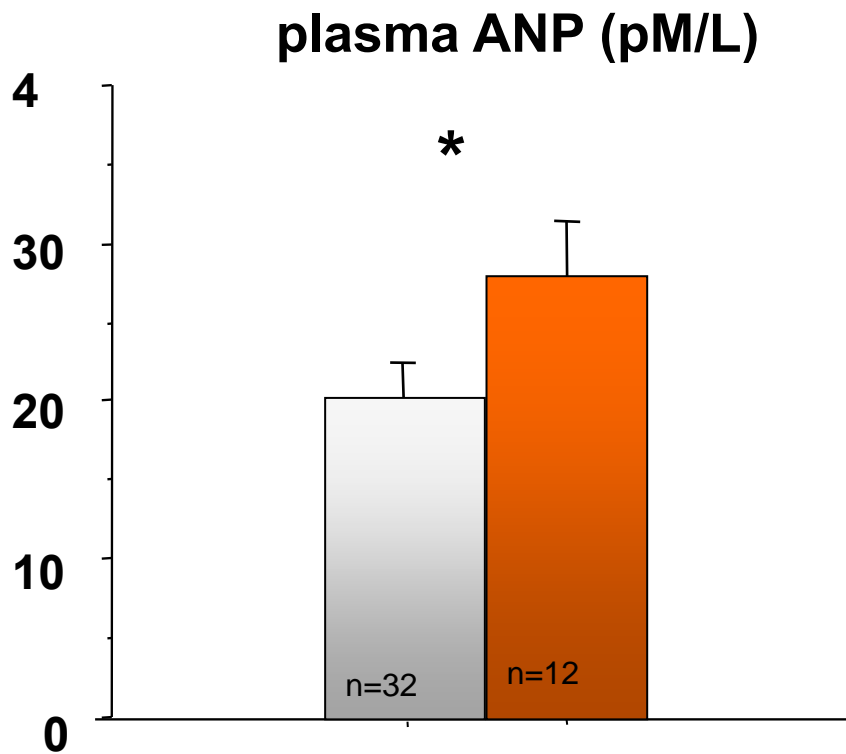


Figura 15. Livelli plasmatici di peptide natriuretico atriale (ANP) e GMPc in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale (IE) e con iperaldosteronismo primario (IPA).
Medie=esm; * $p < 0.05$

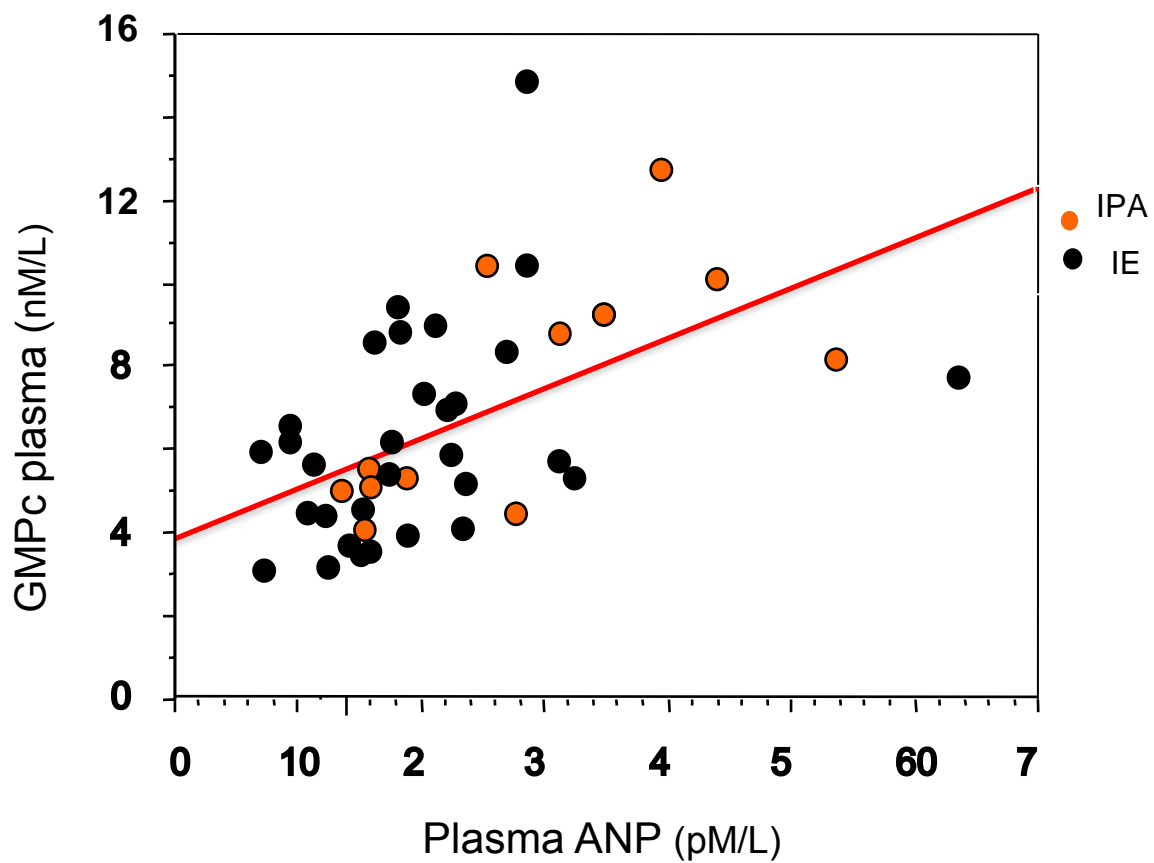


Figura 16. Correlazione tra i livelli plasmatici di ANP e di GMPc in ipertesi essenziali (IE) e pazienti con iperaldosteronismo primario (IPA)

GMPc piastrinico (pM/10⁹ cell)

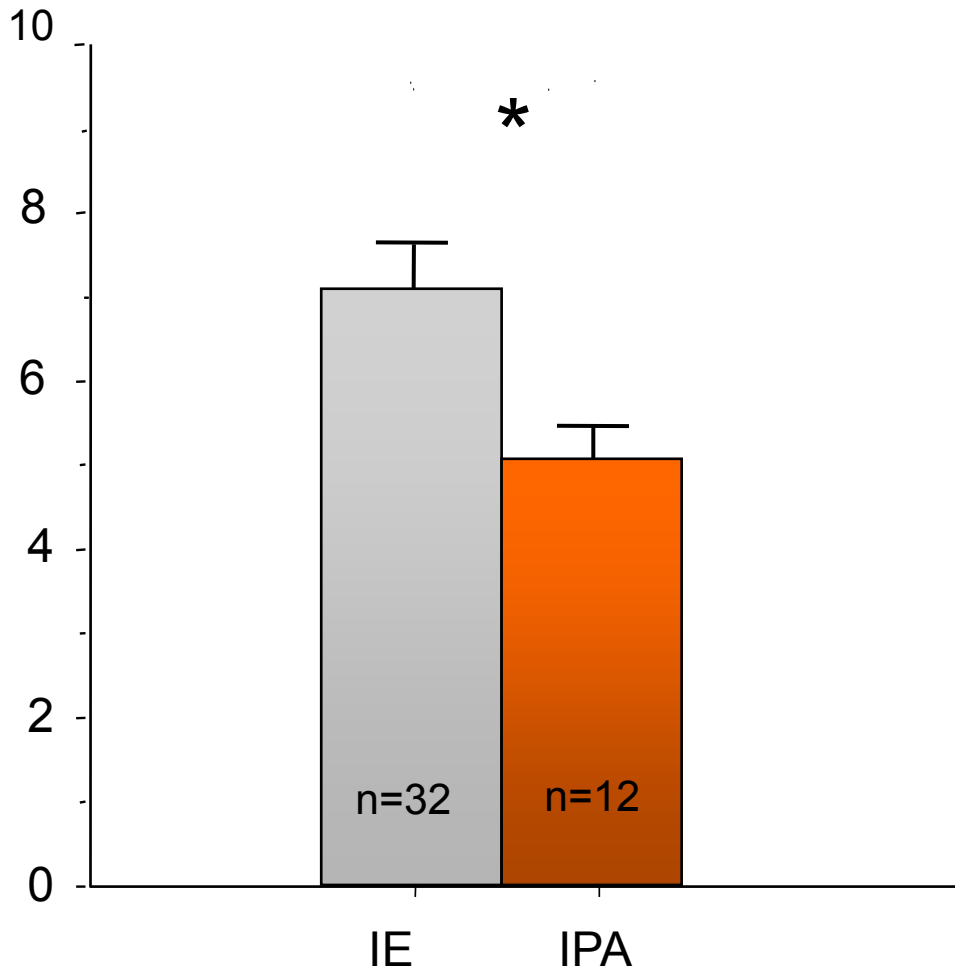


Figura 17. Livelli plasmatici di GMPc piastrinico in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale (IE) e con iperaldosteronismo primario (IPA).
Medie=esm; * p<0.05

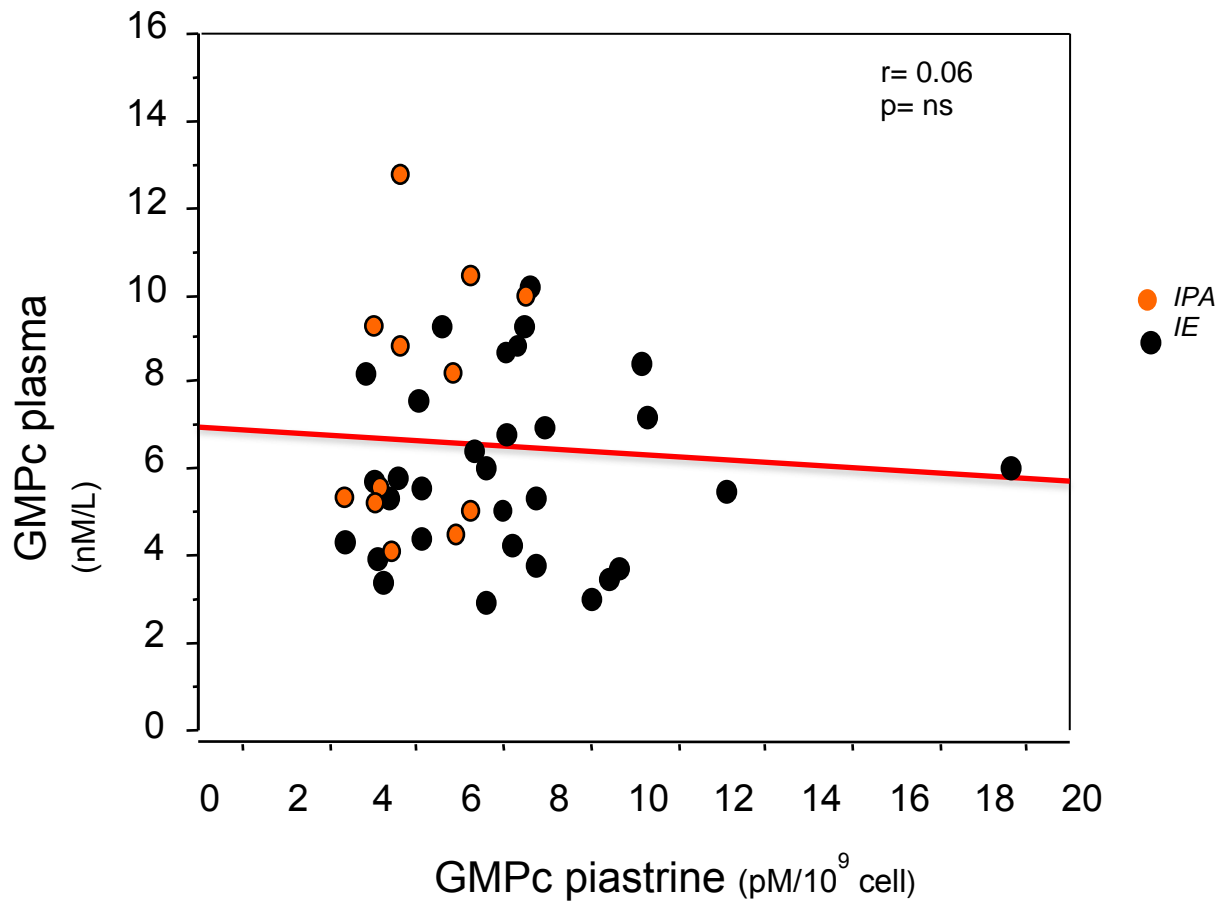


Figura 18. GMPC piastrinico NON correla con GMPC plasmatico in pazienti con Iperensione essenziale (IE) e Iperaldosteronismo primario (IPA)

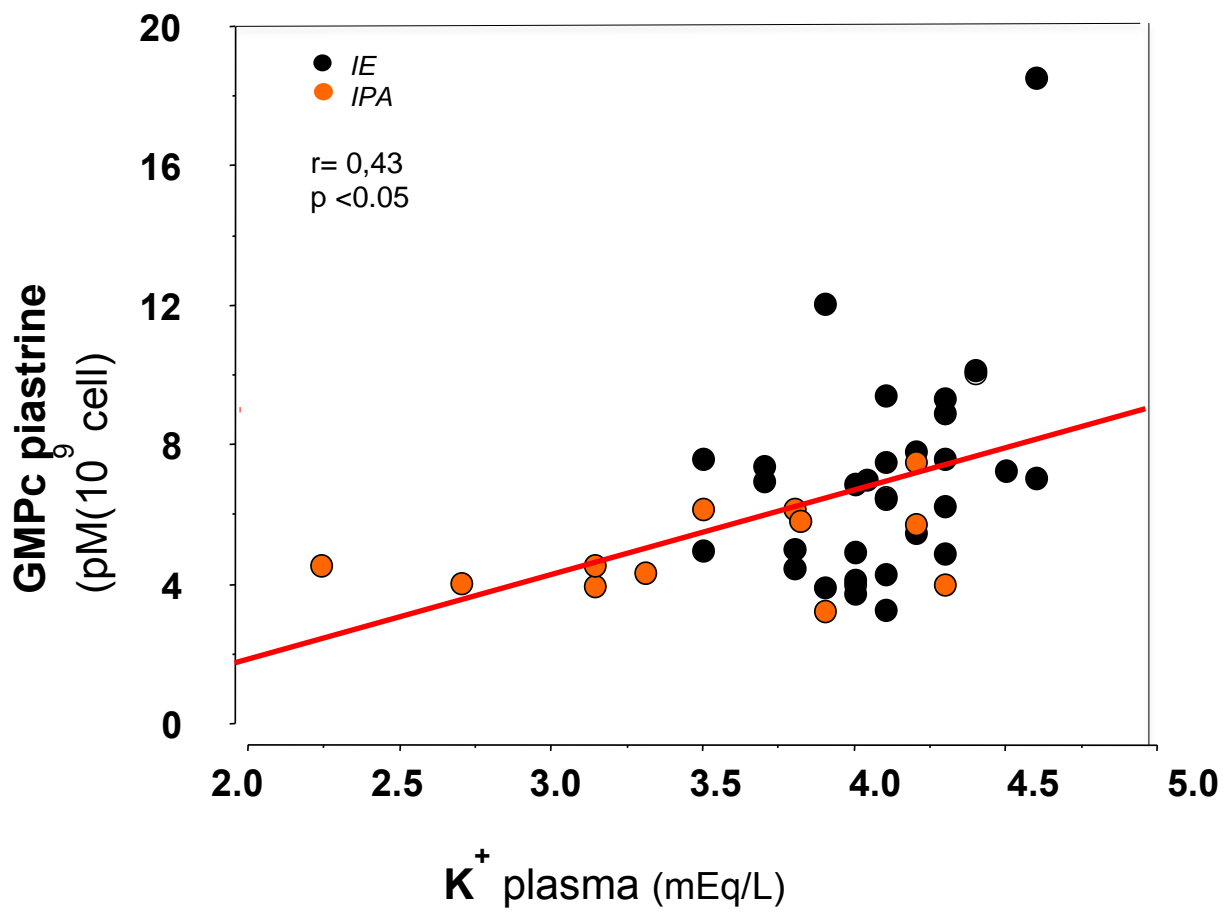


Figura 19. Correlazione tra GMPC₇ piastrinico e potassio plasmatico (K⁺) in pazienti con Iperensione essenziale (IE) e Iperaldosteronismo primario (IPA)

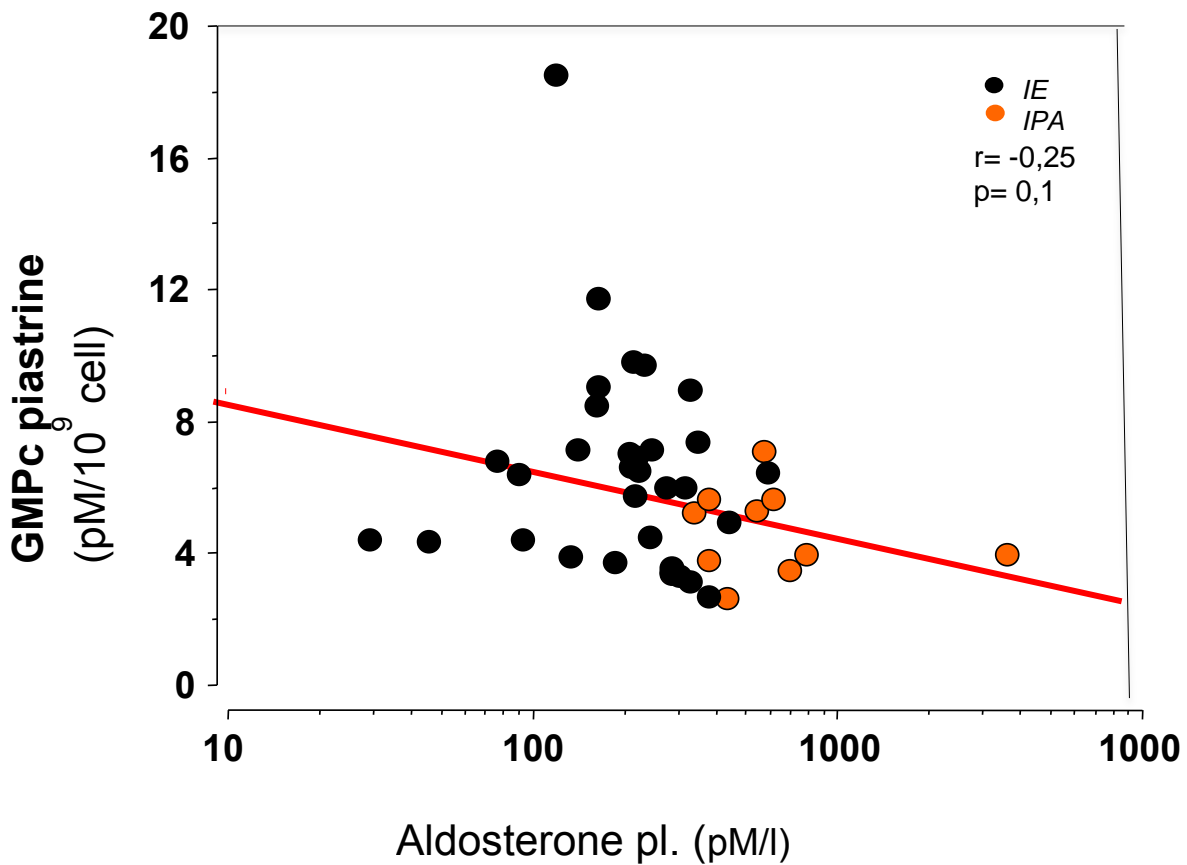


Figura 20. Correlazione tra GMPC₇ piastrinico e aldosterone in pazienti con Iperensione essenziale (EH) e Iperaldosteronismo primario (IPA)

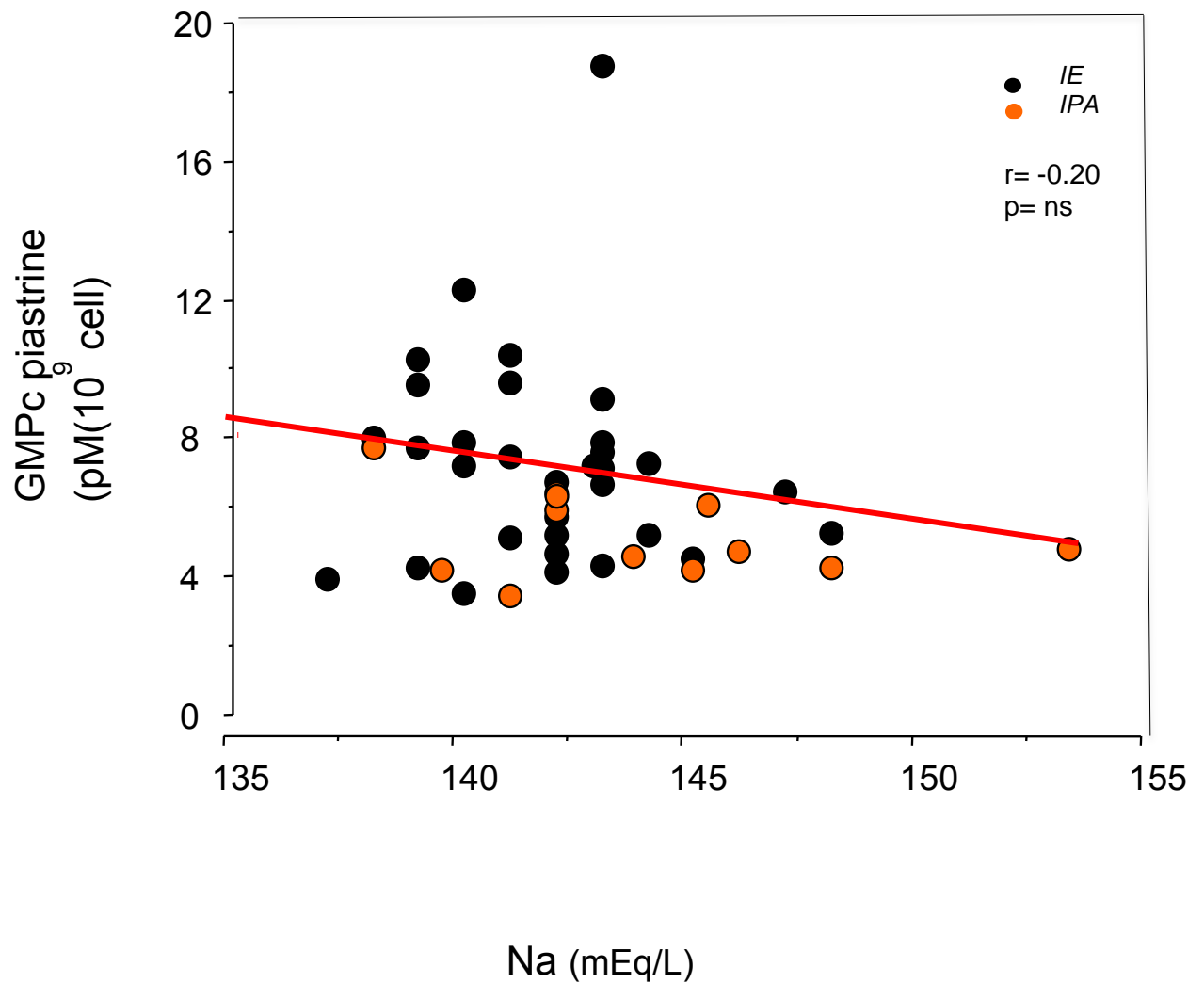


Figura 21. Correlazione tra GMPC₉ piastrinico e sodio extracellulare (Na) in pazienti con Iperensione essenziale (EH) e Iperaldosteronismo primario (IPA)