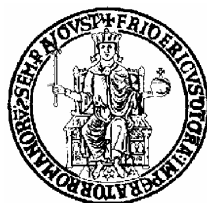


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**



**Dipartimento di Medicina Clinica, Scienze Cardiovascolari e
Immunologiche**

Direttore: Prof. M. Chiariello

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E
MEDICINA SPERIMENTALE**

Coordinatore: Prof G. Marone

XIX CICLO

**EFFETTI DELL'IPOTIROIDISMO ACUTO E CRONICO
SULLA REATTIVITA' VASCOLARE NELL'UOMO**

TUTOR

Ch.mo Prof. Luigi Sacca'

CANDIDATA

dott.ssa Valentina Angelini

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

SOMMARIO

.....	1
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI	1
FEDERICO II	1
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA	1
DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE	1
Coordinatore: Prof G. Marone	1
XIX CICLO.....	1
EFFETTI DELL'IPOTIROIDISMO ACUTO E CRONICO SULLA REATTIVITA' VASCOLARE NELL'UOMO	1
ANNO ACCADEMICO 2006-2007.....	1
SOMMARIO	2
I. INTRODUZIONE	3
II. MATERIALI E METODI	17
A. Soggetti	17
B. Procedura sperimentale	18
C. Analisi di laboratorio	20
D. Calcoli	21
III. RISULTATI	22
IV. DISCUSSIONE	25
V. BIBLIOGRAFIA	30
VI. LEGENDA ALLE FIGURE	36
VII. TABELLE E FIGURE	38

I. INTRODUZIONE

Da molti anni è noto che la tiroide svolge un ruolo importante nella regolazione delle funzioni dell'apparato cardiovascolare. Nel 1786 Parry per primo descrisse le caratteristiche cliniche di una paziente con tireotossicosi, tra esse palpitazioni, polso irregolare e dispnea. Circa cinquanta anni dopo, un medico irlandese, Graves, descrisse quattro casi di “violente e prolungate palpitazioni in donne con tireotossicosi”. Nel 1840, in Germania, C. von Basedow riportò tre casi di gozzo, cardiopalmo ed esoftalmo, sottolineando, ancora una volta, l'interessamento cardiaco nell'ipertiroidismo. Nel 1918, Zondek fu il primo a delineare i tratti salienti del cosiddetto “*cuore da mixedema*”: silhouette cardiaca dilatata, bassi voltaggi elettrocardiografici, azione cardiaca rallentata. Tali segni clinico-strumentali trovano la loro genesi nel versamento pericardico, comune nei pazienti ipotiroidei. Per un certo periodo si ritenne che le manifestazioni cardiache presenti nei disordini tiroidei originassero primitivamente dal cuore stesso (1).

La tiroide produce, sotto stimolo del TSH ipofisario, T_4 , che viene convertito perifericamente a T_3 , la forma biologicamente attiva di ormone tiroideo (1). Tale trasformazione avviene principalmente ad opera della *5' deiodinasi tipo I*, presente nel fegato, nel rene, nella tiroide stessa e in molti altri tessuti; in minor misura, contribuisce a questa conversione anche la *5' deiodinasi tipo II*, rappresentata in un numero limitato di tessuti, quali il sistema nervoso centrale, il lobo anteriore dell'ipofisi, il tessuto adiposo bruno (BAT). La *5' deiodinasi tipo I* ha un ruolo principe nella regolazione della concentrazione di T_3

circolante, l'enzima di tipo II, invece, sembra essere responsabile della modulazione della concentrazione intracellulare di T_3 , importante nei fenomeni di feedback dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (2,3,6). L'azione della T_3 è mediata dal legame a recettori nucleari, pur sussistendo un'attività extranucleare dell'ormone stesso. Si conoscono differenti tipologie di recettori nucleari. Il sottotipo α_1 è ubiquitario, mentre β_1 è presente in tessuti sensibili agli ormoni tiroidei, quali fegato, rene, cervello, cuore e la sua espressione è regolata da vari fattori, tra cui gli stessi ormoni tiroidei. Il recettore β_2 è presente soltanto in ipotalamo e ipofisi, α_2 non ha invece un T_3 *binding domain*, funzionando, così da antagonista recettoriale (2,3).

A livello cardiaco, la T_3 è responsabile della *up-regulation* di geni-bersaglio, mediante il riconoscimento di specifici siti di legame a livello dei *promoters* (TRE-Thyroid Responsive Elements), con conseguente sintesi di specifiche proteine: l'isoforma α della catena pesante della miosina, la ATPasi calcio dipendente del reticolo sarcoplasmatico (SR- Ca^{2+} ATPasi), la sodio-potassio ATPasi (Na^+/K^+ ATPasi), i recettori β adrenergici e i canali L-type del calcio. L'azione genica di T_3 si realizza con una latenza di ore o giorni (4,5).

Le azioni non-genomiche di T_3 consistono, invece, nel facilitare l'uptake di aminoacidi, zuccheri e, tramite modifiche della conduttanza di membrana, l'ingresso rapido di Ca^{2+} (1,7). In particolare, si ottengono, in vivo, riduzione delle resistenze periferiche e incremento dell'output cardiaco, entro tre minuti dalla somministrazione di ormone tiroideo (5). Da studi in vitro, sembrerebbe che tale azione non-genomica consista nella regolazione della Ca^{++} -ATPasi, dei canali del Na^+ via PKC, dei canali del K^+ via PI_3 -kinasi, della Na-K ATPasi via PKC e MAPK, dei canali del K^+ *inward rectifying*. T_3 incrementerebbe, inoltre, il Ca^{++}

contenuto nel reticolo sarcoplasmatico dei miocardiociti, con azioni inotropa e cronotropa positive non mediate da attivazione genica. È stato ipotizzato che, tramite il legame ad un *G-protein coupled membrane receptor (GPCR)*, l'ormone tiroideo attivi un *signalling* intracellulare culminante nella trascrizione genica; si tratterebbe, infatti di un'azione genomica indiretta (5). Sia gli effetti genomici diretti che quelli indiretti si traducono in rilevanti conseguenze emodinamiche.

Nei soggetti ipertiroidei si osservano: incremento della gittata e delle frequenza cardiache, delle funzioni sistolica e diastolica ventricolari e riduzione delle resistenze periferiche. Nell'ipotiroidismo, d'altro canto, si verificano una riduzione dell'indice cardiaco (circa 35%) e della gittata, mentre le resistenze periferiche risultano aumentate (7,8, 34).

Per spiegare gli esatti meccanismi con cui T_3 determina le suddette modifiche emodinamiche, molti esperimenti sono stati condotti sia su animali che nell'uomo.

L'effetto sull'inotropismo cardiaco è determinato dalla regolazione del gene dell' α miosina della $SR-Ca^{2+}$ ATPasi, ma anche dall'effetto del T_3 sulla volemia, che nell'ipotiroidismo risulta ridotta e nell'ipertiroidismo aumentata, come conseguenza della stimolazione dell'eritropoiesi, con variazione del volume plasmatico totale (2,8). Nel mixedema, inoltre, si riscontra una ridotta perfusione renale, che, nonostante la normale eliminazione del sodio, comprometterebbe la clearance dell'acqua libera, con iponatriemia da diluizione, nonché aumento del volume di distribuzione dell'albumina, cui seguono fenomeni effusivi in diverse cavità corporee, benché le proteine plasmatiche totali risultino nel range di normalità (30). Altro fattore responsabile dell'aumento della gittata cardiaca è la riduzione del

postcarico. Somministrando β bloccanti in pazienti in terapia sostitutiva con L-T₄, per carcinoma tiroideo e gozzo nodulare, è stato dimostrato che, pur riducendosi la frequenza cardiaca ed i sintomi, quali cardiopalmo e battiti atriali prematuri, nonché le dimensioni del cuore, la contrattilità ventricolare restava elevata; dimostrando che l'azione cronotropa positiva dell'ormone tiroideo è mediata dall'aumentata sensibilità alle catecolamine, mentre l'effetto inotropo è determinato dall'azione genica dell'ormone stesso (2,9,10, 34).

Le modifiche della frequenza cardiaca, di contro, dipendono non tanto dalla variazione nei livelli circolanti di catecolamine, quanto dalla sensibilità ad esse. Dunque, risulterebbero modificate la velocità di sintesi e degradazione dei recettori adrenergici. In pazienti mixedematosi, in shock emodinamico, è stata osservata, infatti, resistenza alle catecolamine esogene (2). Al contrario, nel miocardio di animali ipertiroidei, la T₃, con effetto genomico, incrementa l'mRNA per β_1 recettori adrenergici entro 30 minuti, con elevazione della densità di suddetti recettori di circa tre volte (30). La T₃, infatti, è in grado di incrementare la frequenza cardiaca, riducendo la durata del potenziale d'azione e il periodo refrattario dei miocardiociti e del sistema di conduzione atrio-ventricolare. Le conseguenze patologiche di tale azione del TH sono: elevata incidenza di tachicardia e fibrillazione atriale nell'ipertiroideo, presenza di bradicardia sinusale, BAV e rari episodi di torsione di punta negli ipotiroidei (30,34). Tuttavia alcune evidenze sperimentali sembrerebbero chiamare in causa anche un meccanismo diretto dell'ormone tiroideo nelle variazioni della frequenza cardiaca: in vitro è stata osservata un'aumentata densità di pompe del Na⁺ nei miocardiociti, con conseguente aumentata permeabilità a Na⁺ e K⁺ (11).

Anche le dimensioni del cuore risultano influenzate dall'assetto ormonale, infatti pazienti ipotiroidei o mixedematosi risultano portatori di ipertrofia asimmetrica del setto interventricolare, simile a quella osservata nella cardiomiopatia ipertrofica, anomalia reversibile con il ripristino dell'eutiroidismo e che potrebbe spiegare la disfunzione diastolica del ventricolo sinistro presente nei pazienti suddetti (33,34). La ridotta funzionalità della SR-Ca²⁺ATPasi sarebbe la base molecolare di tale alterazione (2). Nel paziente ipertiroidico, d'altra parte, si osserva una ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro, in assenza di proliferazione fibroblastica, risultato dell'azione genica di T₃, ma anche dell'aumentato carico cardiaco. E', infatti, stato dimostrato il prevalere del secondo meccanismo in studi in cui, somministrando T₃ in topi con due cuori, di cui uno escluso dal circolo, si osservava ipertrofia solo nell'organo sottoposto al carico emodinamico (12). Tale ipertrofia comporta miglioramento della gittata ma anche aumentato consumo di ossigeno da parte del miocardio, con precoce esaurimento del muscolo cardiaco e progressione verso lo scompenso nel disordine cronico (30,34).

Di notevole interesse risultano gli studi condotti sugli effetti dell'ormone tiroideo sul circolo periferico. L'ipertiroidismo è associato alla riduzione delle resistenze periferiche che bilancia l'aumento della gittata con effetto minimo sulla pressione arteriosa media, mentre nell'ipotiroidismo si assiste ad un incremento di esse e conseguente innalzamento dei valori pressori diastolici. Le prime ipotesi, volte a spiegare il substrato fisiopatologico di tale fenomeno, riguardavano la vasodilatazione locale, indotta dall'accumulo di cataboliti derivanti, a loro volta, dall'accelerato metabolismo tissutale, presente nell'ipertiroidismo (2,7). Un secondo meccanismo ipotizzato, considera

l'effetto di TH sul flusso di Na^+ e K^+ nelle cellule muscolari lisce (SMC): modificando tale flusso ionico, si otterrebbe una riduzione nella contrattilità muscolare (7). Dati sperimentali ottenuti da studi in vitro, hanno dimostrato la presenza dell'enzima *5' deiodinasi tipo II*, anche nelle SMC, oltre che nel SNC, nell' ipofisi e nel tessuto adiposo bruno. Tale enzima, regolato dalla stessa T_3 , è responsabile della conversione locale di T_4 , nella più attiva T_3 . L'ormone, con meccanismo cAMP dipendente, sarebbe in grado di bloccare la chinasi della catena leggera della miosina, impedendo la contrazione della muscolatura liscia vascolare (6). Coesisterebbe, inoltre, l'incremento del numero di capillari, dunque del letto vascolare, con caduta della resistenza (*legge di Hagen-Poiseuille*), come osservato in topi ipertiroidei (13,14).

Con il proliferare delle conoscenze circa l'endotelio e le sue funzioni, è stato studiato il nesso esistente tra ipotiroidismo/ipertiroidismo e funzionalità endoteliale. In esperimenti su cavie, si osservava che la risposta vasocostrittrice alla norepinefrina (NE) e quella vasodilatatoria all'acetilcolina (ACh), risultavano aumentate in anelli vascolari ottenuti da topi ipertiroidei, solo se l'endotelio era intatto (14). Bloccando poi la produzione di ossido nitrico (NO) con L-NAME (Nitro-L-Arginina methyl estere), la maggior parte dell'effetto vasodilatante della acetilcolina veniva a mancare (13,14). Tali risultati sono stati riprodotti anche in esperimenti sull'uomo.

Iperitiroidei cronici, affetti da *Morbo di Graves*, avevano, infatti, allo studio pletismografico, un flusso basale ed una risposta alla acetilcolina marcatamente aumentati, rispetto ai controlli sani. Mentre la risposta al nitroprussiato di sodio (NP) non era significativamente differente nei due sottogruppi. La soppressione del flusso con L-NMMA (NG-monomethyl- L-arginina) , poi, dimostrava in maniera

inequivocabile il ruolo centrale dell'NO nelle modifiche della reattività vascolare nei soggetti ipertiroidei. Inoltre, come osservato in vitro su anelli vascolari di topi ipertiroidei, la sensibilità alle catecolamine dei pazienti in questione era aumentata, verificandosi una marcata vasocostrizione durante l'infusione di norepinefrina. Il ripristino dell'eutiroidismo, dopo terapia con metimazolo, infine, riportava a livelli normali il flusso basale (15). Dunque la riduzione delle resistenze periferiche nell'ipertiroidismo sarebbe dovuta proprio all'aumentata produzione di NO, derivante dall'up-regulation della ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) in risposta all'esposizione ad elevate concentrazione di T₃.

Tale effetto nucleare dell'ormone tiroideo, è stato dimostrato in vitro e in vivo. In particolare, l'infusione in avambraccio di T₃, in volontari sani, sortiva effetto vasodilatante NO dipendente, dopo circa 120 minuti (16).

Per lungo tempo l'endotelio è stato ritenuto una semplice barriera tra interstizio e lume vascolare: E' invece chiaro oggi che esso ha un ruolo importante nella regolazione della funzione vascolare, tramite la produzione di sostanze con effetto sia vasodilatatore che vasocostrittore. Tale organo, costituito da 10¹⁴ cellule endoteliali, è di fondamentale importanza per la protezione dall'aterosclerosi e dai fenomeni trombotici. La difesa principale dal danno vascolare è data dall'ossido nitrico (NO), un gas dotato di innumerevoli attività biologiche. Esso è prodotto dalle cellule endoteliali, a partire da L-arginina e ossigeno molecolare, in risposta a varie sostanze ad azione vasodilatatoria (acetilcolina e bradichinina) e a stimoli meccanici (shear stress). L'enzima deputato alla produzione di NO è la ossido nitrico sintasi (NOS), di cui esistono tre differenti isoforme. La NOS inducibile

(iNOS), la NOS endoteliale (eNOS) e la NOS neuronale (nNOS). Tali isoforme sono espresse in tessuti e cellule specifiche: la iNOS, dopo alcune ore di esposizione a citochine e prodotti microbici, aumenta in cellule infiammatorie, cellule endoteliali ed endocardiche, cellule muscolari lisce, in fibroblasti e cardiomiociti.

La eNOS, detta anche cNOS (costitutiva), è presente nell'endotelio, a livello cardiaco e periferico, nonché nei cardiomiociti e in cellule del sistema di conduzione cardiaco (17). La nNOS è stata, invece, identificata, esclusivamente all'interno dei gangli parasimpatici intracardiaci ed in neuroni del sistema autonomo.

L'NO, prodotto dalla eNOS, è rilasciato nell'interstizio e diffonde rapidamente esercitando diverse attività biologiche. Tra esse, la principale è l'attivazione della guanilato-ciclastasi (GC), enzima che catalizza la reazione di trasformazione di GTP in cGMP che, inducendo una diminuzione del calcio nelle cellule muscolari lisce del vaso, determina il rilassamento delle cellule stesse, dunque vasodilatazione. L'NO rilasciato nel lume vascolare, poi, ha un'importante attività di inibitore dell'aggregazione e dell'adesione piastrinica; inoltre inibisce l'adesione dei leucociti alla parete vascolare, sopprimendo l'espressione di CD11/18, responsabili del legame delle cellule infiammatorie all'endotelio (17). Essendo, dunque, l'adesione dei leucociti il *primum movens* dell'aterosclerosi, l'NO assume un ruolo protettivo in tal senso. È stato ancora osservato che l'NO avrebbe un ruolo nella soppressione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, prevenendo anche step successivi dell'aterogenesi.

Una condizione clinica associata a infiammazione cronica è *l'ipotiroidismo subclinico* (sHT), definito dalla presenza di elevati livelli di TSH ($> 3.6 \mu\text{UI/ml}$) e normali concentrazioni di fT_3 e fT_4 . Nella

maggior parte dei casi l'ipotiroidismo subclinico consegue alla *Tiroidite di Hashimoto* ed i pazienti portatori di tale condizione, pur non avendo sintomi, hanno disfunzione endoteliale, basso grado di flogosi cronica, aumentata incidenza di aterosclerosi e di eventi cardiovascolari (33,35). In questo disordine, molto comune in donne di mezza età, si ritrovano disfunzione diastolica cardiaca a riposo e deficit sistolico, slatentizzato dallo sforzo, con ridotta resistenza all'esercizio fisico (30,35).

Il profilo lipidico alterato tipicamente presente in questi pazienti risulta solo parzialmente responsabile dell'anomala reattività endoteliale osservata. Infatti, da studi di reattività endoteliale, condotti con la tecnica dell'avambraccio, su pazienti affetti da ipotiroidismo subclinico, risultava che la risposta endoteliale era ridotta nei pazienti con ipotiroidismo subclinico a causa sia delle anomalie lipidemiche che della carenza di T₃ (19). In questi stessi soggetti, la terapia sostitutiva migliorava la reattività vascolare, incrementando la risposta all'acetilcolina, effetto non ascrivibile al solo miglioramento del quadro lipidico, poiché lo stesso risultato si osservava anche nei pazienti con ipotiroidismo subclinico e normocolesterolemici (19).

Ulteriori studi relativi alla flogosi di basso grado, presente nei disordini della funzionalità tiroidea, hanno valutato le modifiche della reattività vascolare in pazienti affetti da *Tiroidite di Hashimoto*, durante e dopo la somministrazione di antinfiammatori inibitori della COX.

I risultati di tali studi, hanno mostrato come gli inibitori selettivi della COX2, assunti per via sistemica, migliorino la risposta endoteliale all'acetilcolina, dopo due ore circa dalla somministrazione. Effetto simile veniva osservato facendo assumere ai pazienti vitamina C (20). Il meccanismo che determina disfunzione endoteliale nella *Tiroidite di Hashimoto* sembra essere quello della flogosi sistemica di basso grado,

risultando infatti elevati i livelli di PCR e IL-6 nei pazienti suddetti. Tuttavia, altre ipotesi vengono suggerite dalle evidenze sperimentali. Lo stress ossidativo ha sicuramente un ruolo importante, infatti la somministrazione di COX-ib riduce i livelli di LDL ossidate aterogeniche e ripristina la disponibilità di NO, così come la Vitamina C, dotata di attività antiossidante. Probabilmente quest'ultima, favorendo il recoupling della eNOS ripristinerebbe la funzionalità endoteliale. Infine, il TSH elevato, stimolando rilascio di TNF α dal midollo osseo, aggraverebbe il quadro di flogosi sistemica.

La relazione tra ipotiroidismo clinicamente manifesto e disfunzione endoteliale è stata indagata solo da studi su animali. In corso di esperimenti condotti su topi con endotelio intatto, veniva osservata una ridotta risposta contrattile alla norepinefrina (NE) e alla fenilefrina (PHE). Il ridotto numero di recettori α_1 , riscontrato in tessuti vascolari di cavie ipotiroidee, spiegava la diminuita sensibilità alla fenilefrina. La terapia sostitutiva riportava alla normalità la reattività vascolare agli agonisti adrenergici (21,22). Per motivare la attenuata risposta ai vasocostrittori, si era ipotizzato che nei ratti ipotiroidei vi fosse up-regulation di NOS. Poche evidenze mostrano, in effetti, un incremento della NOS in fegato e muscolo scheletrico di animali da esperimento (23), mentre la maggioranza degli studi evidenzia down-regulation di eNOS, in tutti i tessuti (14). Infatti, è riscontrabile un'altrettanto compromessa risposta agli agenti vasodilatatori. In preparati vascolari, prelevati da diversi distretti corporei di ratti ipotiroidei, l'acetilcolina elicitava un blando effetto vasodilatatore, per compromissione, dunque, della risposta endotelio-mediata (24). Suddetta sostanza, infatti, legando i recettori M_3 , attiva la via della PLC/proteina Gq, stimolando la produzione di NO da parte dell'endotelio, al contrario, la papaverina,

agendo in maniera endotelio-indipendente, determinava normale vasodilatazione. Anche la risposta all' isoprenalina risultava ridotta, parallelamente alla diminuita concentrazione di β_2 recettori nei vasi di animali studiati (14). Tali dati fornirebbero una possibile spiegazione per l'incremento delle resistenze periferiche, proprio della condizione di ipotiroidismo .

Al fine di risolvere l'apparente contraddizione esistente tra ridotta risposta ai vasocostrittori ed aumento delle resistenze periferiche nei soggetti ipotiroidei, sono stati chiamati in causa l'alterata produzione di EDHF (endothelial derived hyperpolarizing factor) ed anomalie dei canali del K^+ . EDHF è un fattore solubile ed agisce aprendo i canali del K^+ , evocando vasodilatazione prevalentemente nelle arteriole di resistenza. La produzione di EDHF viene inibita da TEA (tetraetilammonio) ed elevate concentrazioni di K^+ . E' stato osservato che la distruzione dell'endotelio e la somministrazione di TEA ed L-NAME aumentavano la risposta ai vasocostrittori (25), per abolizione della produzione sia di NO che di EDHF; d'altra parte, l'esposizione a T_3 incrementava i livelli di EDHF e NO, nonché la concentrazione di canali del K^+ voltaggio dipendenti, diminuendo le resistenze periferiche (26).

Nell'uomo è stato dimostrato, mediante studi pletismografici in pazienti ipertiroidei cronici, che l'infusione di L-NMMA in avambraccio, comportava una drastica caduta del flusso, abolendo la vasodilatazione endotelio-mediata, ovvero il meccanismo responsabile della riduzione delle resistenze periferiche dei pazienti ipertiroidei. Inoltre, somministrando L-NMMA durante l'infusione diretta di T_3 in avambraccio, si otteneva una riduzione del FBF molto più marcata rispetto ai controlli, evidenziando come l'ormone tiroideo sia direttamente responsabile dell'aumentata disponibilità di NO (15,16).

L'ipotiroidismo, sia conclamato che subclinico, è associato ad incremento del rischio cardiovascolare (33). A tal proposito, dati dirimenti circa pazienti con ipotiroidismo subclinico, vengono dal *Rotterdam Study*. Lo studio, condotto su un campione randomizzato di 1149 donne, di età uguale o superiore a 55 anni, evidenziava una maggiore prevalenza di aterosclerosi aortica (OR=1,9) e infarto del miocardio (OR=2,3), nelle pazienti affette da ipotiroidismo subclinico, rispetto a donne eutiroidee. Ovviamente, suddetta analisi prevedeva una normalizzazione dei due campioni per età, BMI, valori di HDL, pressione arteriosa e anamnesi positiva per fumo di sigaretta. Al fine di chiarire, poi, quale fosse il meccanismo alla base delle patologie in questione, venivano effettuate ulteriori valutazioni. Soggetti con anticorpi anti-tireoperossidasi positivi, senza anomalie ai test di funzionalità tiroidea, avevano prevalenza di aterosclerosi e IMA sovrapponibile a quella di donne eutiroidee, senza anticorpi. Sugerendo, questi ultimi dati, che l'aterosclerosi fosse determinata dal deficit di ormone tiroideo, piuttosto che dal disordine immunologico (32).

La ridotta funzionalità tiroidea si associa ad una modifica del pattern dei fattori di rischio (27, 33). Tra essi, assume particolare rilievo il profilo lipidico: si osservano, infatti, incremento delle LDL colesterolo, dei trigliceridi e della Lipoproteina a (Lp-a), con decremento della frazione HDL colesterolo (28). I meccanismi che sottendono tali cambiamenti sono stati ampiamente studiati: per quanto riguarda l'elevazione delle LDL, è stata documentata ridotta espressione di recettori per LDL in studi in vivo e in vitro, e indagini di biologia molecolare dimostrano che esisterebbe un TRE a livello del promoter del gene del recettore delle LDL (29). Tali lipoproteine a bassa densità, sarebbero poi particolarmente aterogene per la spiccata tendenza

all'ossidazione (LDL piccole e dense). La ridotta attività della lipoprotein lipasi, della lipasi epatica e della *cholesterol ester transfer protein* (CETP), deputata al trasporto inverso del colesterolo, spiegherebbero, rispettivamente, l'incremento dei trigliceridi e la riduzione del colesterolo HDL (27). Anche a livello dei promoter dei geni della lipasi epatica e della apolipoproteina A1, esistono, infatti, specifici *TRE* (30). Per quanto riguarda i fattori di rischio cosiddetti non-tradizionali, da alcuni studi emerge una relazione tra ipotiroidismo e iperomocisteinemia, con miglioramento dei livelli plasmatici di omocisteina dopo terapia sostitutiva. Inoltre, sussisterebbe un legame tra riduzione del TH circolante ed elevazione della CRP (proteina C reattiva), sia nell'ipotiroidismo conclamato, che nel disordine subclinico (31).

Infine, fattore di rischio indipendente dall'alterazione del profilo lipidico sembra essere proprio la *disfunzione endoteliale*, legata a fattori indipendenti dal quadro lipidico.

Benché i pazienti ipotiroidei presentino un aumentato profilo di rischio cardiovascolare, una valutazione della reattività endoteliale in pazienti con ipotiroidismo conclamato non è mai stata effettuata. Inoltre, se è presente una disfunzione vascolare in questi soggetti, rimane da chiarire se essa sia legata ad una carenza cronica dell'ormone tiroideo o se bastino perturbazioni di breve periodo dei livelli circolanti a determinare variazioni della funzione vascolare, come suggerito da studi su volontari sani (16). Mentre sembra chiaro che elevazioni dei livelli circolanti di ormoni tiroidei, sia in soggetti sani che in pazienti ipertiroidei, non inducano variazioni nella funzionalità delle SMC, non sono presenti dati in letteratura che chiariscano se la esposizione a livelli

ridotti di ormone tiroideo danneggi la parete muscolare dei vasi sanguigni (15,16).

Il lavoro di questa tesi si prefigge numerosi scopi: 1) chiarire se i pazienti affetti da ipotiroidismo primitivo presentino disfunzione vascolare; 2) chiarire se tale disfunzione vascolare richieda, per istaurarsi, un lungo periodo di carenza ormonale o sia sufficiente un breve periodo di ipotiroidismo per indurre un difetto nelle funzioni vascolari; 3) indagare i meccanismi della alterata funzione vascolare nell'ipotiroidismo, chiarendo il ruolo svolto dall'endotelio e dalle SMC nel determinismo di tale difetto.

II. MATERIALI E METODI

A. Soggetti

Sono stati studiati 3 gruppi di soggetti, le cui caratteristiche cliniche sono riportate in Tabella I. Il primo costituito da 10 volontari sani. Il secondo gruppo includeva 10 pazienti con ipotiroidismo cronico primario (ipotiroidi cronici), mentre il terzo era costituito da 8 pazienti divenuti ipotiroidi a seguito di tiroidectomia chirurgica o radioterapica per carcinoma tiroideo (ipotiroidi acuti). Tutti i partecipanti hanno sottoscritto un consenso informato, dopo essere stati adeguatamente edotti circa le procedure cui si sarebbero sottoposti ed i rischi connessi allo studio. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico della “Università Federico II” di Napoli.

B. Procedura sperimentale

Tutti gli studi sono stati eseguiti al mattino, dopo una notte di digiuno, con soggetti in posizione supina, in una camera tranquilla, fornita di impianto di condizionamento, tale da mantenere la temperatura tra i 22° e i 24° C. Dopo aver misurato il volume dell'avambraccio, sotto anestesia locale (Xylocaina 2%), una piccola ago-cannula da 20 gauge è stata inserita nell'arteria brachiale dell'arto non dominante, per poter infondere localmente le sostanze-test, per monitorare la pressione arteriosa sistemica e la frequenza cardiaca e per ottenere campioni di sangue arterioso. E' stata, inoltre, incannulata una vena antecubitale omolaterale, per prelevare campioni di sangue venoso refluo dalla muscolatura dell'avambraccio. L'avambraccio veniva adagiato su supporti, in maniera da trovarsi poco sopra il livello de cuore. Il flusso di sangue dell'avambraccio (FBF) è stato misurato, da entrambi i lati, mediante pletismografia strain-gauge, mediante strain-gauge in silastic-mercurio, applicati all'avambraccio e collegati ad un pletismografo (Hokanson 045 EC4; PMS Instruments). Un minuto prima di ciascuna misurazione del FBF e di ciascun prelievo, la circolazione della mano veniva esclusa, gonfiando intorno al polso uno sfigmomanometro pediatrico ad una pressione superiore di circa 100mmHg rispetto alla PAS.

Ogni soggetto è stato sottoposto all'infusione delle seguenti sostanze: 1) acetilcolina (Ach) alla dose di 15, 30, 45 e 60 µg/litro di avambraccio/minuto, al fine di valutare la vasodilatazione endotelio mediata; 2) sodio nitrprussiato (SNP) alla dose di 1, 3 e 9 µg/litro di avambraccio/minuto, con lo scopo di valutare la vasodilatazione non-endotelio mediata; 3) norepinefrina (NE) alla dose di 140, 280 e 560

ng/litro di avambraccio/minuto, per esaminare la vasocostrizione adrenergica; 4) L-N-Monometilarginina (L-NMMA), analogo competitivo e inattivo della L-arginina, alla velocità di 1mg/litro di avambraccio/minuto, per studiare il ruolo dell'NO, rilasciato dall'endotelio, nel mantenimento del tono vascolare basale. Ciascuna sostanza è stata mantenuta in infusione per 5,5 minuti per ciascuna dose e il FBF è stato misurato durante gli ultimi 1,5 minuti di infusione. Al fine di ottenere un wash-out e di riportare il FBF ai valori basali, un intervallo di almeno trenta minuti è stato rispettato dopo l'infusione di ciascuna sostanza e prima di cominciare la successiva infusione. La velocità di infusione delle sostanze-test è stata corretta per il volume dell'avambraccio di ogni soggetto, in maniera da determinare effetti solo nell'avambraccio studiato senza modificare i parametri sistemici. Il FBF è stato misurato in entrambi gli arti superiori, per assicurarsi che non ci fossero effetti sistemici dovuti all'infusione di sostanze vasoattive. La pressione sanguigna è stata misurata, durante tutto l'esperimento, attraverso il catetere arterioso connesso ad un trasduttore di pressione. Ogni valore di FBF rappresenta la media di sei misurazioni consecutive effettuate ad intervalli di dieci-quindici secondi. I campioni di sangue sono stati raccolti simultaneamente dall'arteria e dalla vena incannulate, in condizioni basali e durante l'infusione di Ach, per determinare il bilancio artero-venoso di nitriti NO e cGMP.

C. Analisi di laboratorio

La valutazione della composizione corporea è stata ottenuta con metodica bioimpedenziometrica. La concentrazione dei nitriti è stata misurata su campioni di plasma usando EDTA come anticoagulante. Dopo la raccolta, i campioni di sangue sono stati immediatamente centrifugati a 2000 rpm a -4°C e conservati a -20°C . Prima del dosaggio il plasma è stato ultrafiltrato con filtro molecolare con cut-off di 10kDa (Centricon 10, Millipore). I nitriti ed i nitrati plasmatici totali sono stati misurati con metodo colorimetrico (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). I nitrati sono stati convertiti a nitriti mediante una nitrato-reduttasi e dosati mediante una diazo-reazione standard di Griess. Tutte le determinazioni sono state effettuate in triplicato. Nei dati vengono riportate le “concentrazioni di nitriti”, in realtà esse riflettono la somma di nitriti e nitrati. Per la determinazione del cGMP, i campioni sono stati centrifugati a -4°C , dopo l’aggiunta di acido tricloroacetico al 6%. Il sopranatante è stato lavato con 5 volumi di dietil-etero ed essiccato sotto un flusso di azoto a 60°C . L’estratto essiccato è stato disciolto in un buffer di acetato 0.5 mol/L, a pH 5.8, successivamente acetilato con un composto di acido acetico e trietilamina. Il contenuto di cGMP è stato misurato in duplicato con saggio radioimmunologico (Amersham International).

D. Calcoli

Il bilancio netto di nitriti e di cGMP è stato ottenuto secondo il “*principio di Fick*”: $BILANCIO\ NETTO = (A - V) \times FBF$; dove A e V indicano, rispettivamente, la concentrazione arteriosa e venosa. Dunque, un bilancio negativo testimonia il rilascio di nitriti o cGMP, un bilancio positivo la eventuale captazione di essi. Le differenze nelle caratteristiche cliniche e metaboliche tra i gruppi di soggetti studiati sono state analizzate utilizzando test t di Student non appaiati, all’occorrenza. I dati di FBF durante le infusioni sono stati analizzati mediante il test ANOVA a due vie, per valutare le differenze nelle curve dose-risposta tra i gruppi. La significatività è stata definita al valore di P 0,05. I risultati sono espressi come media \pm SEM (errore standard medio).

III. RISULTATI

Le caratteristiche cliniche dei soggetti studiati sono mostrate nella Tabella I. I volontari sani, gli ipotiroidei acuti ed i cronici non differivano tra loro per quanto riguarda i parametri antropometrici e la composizione corporea. La PAS e la PAD risultavano, allo stesso modo, non significativamente diverse tra i vari soggetti, così come la frequenza cardiaca e i livelli di colesterolemia totale.

Come atteso, i pazienti ipotiroidei presentavano rilevanti differenze nel profilo ormonale tiroideo (Tabella I). In particolare, il TSH nei due gruppi di ipotiroidei era significativamente aumentato rispetto ai soggetti sani ($p < 0.01$). Inoltre, i livelli circolanti di fT_4 erano significativamente inferiori nei soggetti ipotiroidei ($p < 0.001$), mentre i livelli di fT_3 erano particolarmente compromessi nei soggetti ipotiroidei acuti ($p < 0.01$ rispetto a controlli e ipotiroidei cronici).

Il FBF basale era leggermente ridotto nei soggetti con ipotiroidismo primitivo, sebbene tale riduzione non raggiungesse la significatività statistica (2.50 ± 0.31 , 1.48 ± 0.35 e 2.22 ± 0.41 ml/dl/min, nei controlli, negli ipotiroidei primitive e acuti, rispettivamente) (Fig. 1).

Infondendo Ach nell'avambraccio è possibile studiare la funzione endoteliale, in base all'aumento di flusso osservato, misurato come variazione di volume. In tutti e tre i gruppi studiati si osservava un significativo aumento del FBF durante l'infusione di Ach ($p < 0.001$). Tuttavia, nei pazienti ipotiroidei la reattività endotelio-dipendente era gravemente compromessa (23.2 ± 3.4 , 8.5 ± 1.62 e 15.7 ± 3.0 ml/dl/min nei controlli, negli ipotiroidei cronici e acuti, rispettivamente, $p < 0.05$ negli

ipotiroidici rispetto ai controlli, alla dose più alta di Ach). Sebbene la risposta endotelio-mediata apparisse più gravemente compromessa nei soggetti cronici rispetto agli acuti, tale differenza non raggiungeva la significatività statistica ($p=0.15$) (Fig. 1).

Come illustrato in figura 2, coerentemente con i dati di reattività endoteliale, la produzione di NO, valutata come bilancio dei nitriti, era significativamente ridotta nei soggetti ipotiroidici acuti e cronici rispetto ai controlli (-1.00 ± 1.4 , -1.77 ± 0.7 e -37.82 ± 10.1 nmol/dL/min, rispettivamente, $p<0.05$). La produzione di cGMP era analogamente seriamente compromessa negli ipotiroidici cronici rispetto ai controlli (-5.29 ± 1.94 e -18.20 ± 4 nmol/dL/min, rispettivamente, $p<0.05$). Gli ipotiroidici acuti presentavano una produzione di cGMP gravemente compromessa, alla stessa maniera degli ipotiroidici cronici (-7.38 ± 3.85 nmol/dL/min, $p=NS$ rispetto ai cronici, fig. 2).

Somministrando SNP, donatore diretto di NO, si ottengono informazioni sulla vasodilatazione non endotelio-mediata, dipendente solo dallo stato delle SMC. IL FBF aumentava significativamente in tutti e tre i gruppi durante l'infusione di SNP ($p<0.001$). Tuttavia, la risposta degli ipotiroidici acuti e cronici era significativamente ridotta rispetto ai controlli (alla dose massima di NP 15.4 ± 2.2 , 11.6 ± 1.7 e 22.1 ± 1.7 ml/L/min, rispettivamente, $p<0.03$ rispetto ai controlli, fig. 3).

Come illustrato nella fig. 4, che mostra le pendenze del FBF durante l'infusione, la norepinefrina, sebbene apparisse indurre una risposta vasocostrittrice inferiore nei soggetti ipotiroidici, non determinava una vasocostrizione significativamente diversa nei tre gruppi (Fig. 4).

L'inibizione della produzione basale di NO, ottenuta tramite l'infusione intra-arteriosa di L-NMMA, inibitore competitivo della L-

arginina, riduceva l'FBF in tutti e tre i gruppi, senza determinare differenze significative.

IV. DISCUSSIONE

I risultati principali del corrente studio sono: 1) i pazienti affetti da ipotiroidismo primitivo presentano una severa disfunzione vascolare; 2) tale difetto sembra non richiedere tempi lunghi per realizzarsi, essendo presente sia in pazienti ipotiroidei da lungo tempo che in pazienti con ipotiroidismo di più recente insorgenza; 3) i meccanismi della disfunzione vascolare coinvolgono sia la componente endoteliale che la muscolatura liscia vasale.

Sebbene siano note le alterazioni emodinamiche dei pazienti con ipotiroidismo clinicamente manifesto e sia stato ben studiato il rischio cardiovascolare degli stessi, non risultano presenti in letteratura dati relativi ai meccanismi patogenetici della disfunzione vascolare stessa.

Il presente studio fornisce dati rilevanti circa l'esistenza di alterata reattività nei vasi di soggetti ipotiroidei. Infatti, i due gruppi di pazienti hanno un FBF ridotto rispetto ai controlli sani, e, soprattutto, l'incremento di FBF atteso durante la somministrazione di acetilcolina appare significativamente compromesso. L'acetilcolina esplica la sua azione stimolando il rilascio di NO, via recettore M₃, da parte dell'endotelio. L'NO, a sua volta, fa aumentare le concentrazioni di cGMP, determinando vasodilatazione per rilasciamento delle SMC. Dunque, l'azione della acetilcolina, è la risultante di due fenomeni e, pertanto, dipendente dall'integrità, sia dell'endotelio, che delle SMC. Al fine di discernere quale sia la componente primariamente danneggiata, è stato valutato il bilancio netto dei nitriti e del cGMP dell'avambraccio. Come atteso, le concentrazioni di tali sostanze nei campioni di sangue venoso appaiono ridotte in maniera significativa sia nei pazienti acuti,

che nei cronici. Dunque, la produzione di NO appare compromessa in maniera rapida dalla carenza di ormone tiroideo, delineandosi la disfunzione endoteliale, con perdita della fondamentale difesa contro l'insorgenza e la progressione dell'aterosclerosi.

Per la prima volta, poi, è stato osservato un interessamento delle SMC nell'ipotiroidismo. L'infusione intra-arteriosa di sodio nitroprussiato, infatti, ha fornito dati importanti e innovativi. L'NP è un donatore diretto di NO e come tale esercita azione vasodilatatoria in maniera del tutto indipendente dall'endotelio, mettendo in evidenza la funzionalità delle cellule muscolari lisce. Pur verificandosi aumento significativo del flusso nei tre gruppi studiati, la risposta all' NP appariva ridotta nei pazienti rispetto ai controlli. Tale finding ci consente di concludere che, non solo la componente endoteliale, bensì anche la muscolare, sia compromessa dalla riduzione del TH circolante.

Per quanto riguarda poi i tempi richiesti per il realizzarsi del danno alla struttura complessiva del vaso nell'ipotiroidismo, il confronto eseguito tra pazienti acuti e cronici ha consentito di ottenere informazioni interessanti. Sebbene infatti non ci sia differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di pazienti, né nella risposta all'Ach, né in quella al NP, in entrambi i casi il FBF dei pazienti cronici appare maggiormente compromesso. Pertanto, si potrebbe ipotizzare che in tempi lunghi il danno vascolare progredisca e si aggravi. In particolare, essendo la produzione di nitriti ridotta in maniera del tutto simile nelle due tipologie di pazienti studiati, la componente muscolare sarebbe quella maggiormente interessata dal danno cronico. L'idea che l'ormone tiroideo svolga un'azione rapida, acuta sulla funzione endoteliale, deriva da dati ottenuti con l'infusione intra-arteriosa di T₃ in soggetti sani (16). In essi, l'ormone elicitava una risposta vasodilatatoria in

tempi rapidi (2 ore circa) (16): questi dati suggeriscono che, così come l'eccesso, anche la carenza di T_3 , instauratasi acutamente, sia in grado di modificare la funzionalità endoteliale. Se, quindi, l'endotelio viene interessato in maniera acuta, il peggioramento della reattività vascolare dei pazienti cronici sarebbe ascrivibile al progressivo aggravarsi della disfunzione delle SMC.

E' interessante notare come, nell'ipotiroidismo subclinico, manchi il coinvolgimento della componente muscolare, risultando la risposta al NP inalterata (19). In sostanza, occorrerebbe una carenza ormonale sensibile e di discreta durata perché si realizzi un danno di questo tipo. Inoltre, da non sottovalutare è il ruolo svolto dal TSH. E' stato dimostrato in pazienti tiroidectomizzati sottoposti a somministrazione di TSH che quest'ormone è in grado di svolgere un'azione diretta sui vasi sanguigni (). Alla luce di questi dati non si può escludere che il TSH, che si muove in genere in modo reciproco rispetto agli ormoni tiroidei, possa svolgere un'azione aggiuntiva sui vasi sanguigni. Inoltre, le differenze nelle concentrazioni di TSH che si osservano in genere fra ipotiroidei cronici e acuti, che nel nostro caso sono rilevanti, sebbene non raggiungano la significatività statistica, possano di per se contribuire in qualche modo ad eventuali differenze fra ipotiroidei acuti e cronici.

In letteratura esistono dati circa il contributo del TSH al realizzarsi del quadro di flogosi sistemica presente nei disordini infiammatori della tiroide: esso favorirebbe il rilascio dal midollo osseo di citochine, peggiorando quindi la funzionalità endoteliale dei soggetti con *Tiroidite di Hashimoto* (20). Suddetti dati circa la flogosi sistemica di basso grado indurrebbero a pensare che, nei pazienti tiroidectomizzati (chirurgicamente o radioterapeuticamente) da noi valutati, potrebbe

giocare un ruolo nella disfunzione endoteliale lo stato infiammatorio risultante. Tuttavia, la valutazione di alcuni tra i principali indici di flogosi (PCR e TNF α), non evidenzia differenze nei tre gruppi di soggetti studiati (dati non presentati).

Altro dato importante riguarda la risposta alle catecolamine: nei soggetti cronici, di fatti, la riduzione del FBF durante infusione di norepinefrina appare minore che negli altri due gruppi, sebbene non raggiunga la significatività statistica. Probabilmente, infatti, solo in tempi lunghi si realizzerebbe la down-regulation dei recettori catecolaminergici α_1 , osservata nei vasi di animali ipotiroidei (21,22).

I nostri risultati forniscono supporto fisiopatologico alla clinica dell'ipotiroidismo. L'ipertensione arteriosa, soprattutto diastolica, è estremamente frequente, tanto che in casistiche ampie di pazienti ipertesi, circa il 3,6% risulta affetto da ipotiroidismo (30). Essa è conseguenza delle aumentate resistenze periferiche da inadeguata risposta vasodilatatoria a stimoli di varia origine, che, in condizioni normali, incrementerebbero la produzione di NO. Altra importante considerazione merita la ridotta sensibilità alle catecolamine dell'intero apparato cardiovascolare, pur essendo la concentrazione di catecolamine endogene normale o addirittura aumentata. Mentre a livello dei vasi periferici, infatti, vi sarebbe down-regulation di recettori α_1 , indice di compromissione vascolare, sul cuore si osserva riduzione della densità di recettori β_1 , con conseguenze emodinamiche significative. Quindi la ridotta pendenza della curva dose-risposta alla NE potrebbe essere considerata speculare all'incompetenza inotropica e cronotropica del cuore nell'ipotiroidismo.

In conclusione, i pazienti ipotiroidei presentano una grave compromissione della reattività vascolare. Tale compromissione deriva

dalla concomitante presenza di disfunzione endoteliale e delle SMC. La compromissione della funzione endoteliale sembra determinarsi in tempi rapidi dall'esordio della carenza di ormoni tiroidei, mentre la compromissione della funzionalità delle SMC apparirebbe deteriorarsi in maniera progressiva.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Gomberg-Maitland M, Frishman W: Thyroid hormone and cardiovascular disease. *Am Heart J.* 1998;135:187-196.
2. Polikar R, Burger AG, Scherrer U, Nicod P: The thyroid and the heart. *Circulation.* 1993;87:1435-1441.
3. Klein I, Ojamaa K: Thyroid hormone: targeting the vascular smooth muscle cell. *Circ Res.* 2001;88:260-261.
4. Yen PM: Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol Rev* 2001;81: 1097 - 1142.
5. Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;213:1-11.
6. Mizuma H, Murakami M, Mori M: Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase. *Circ Res.* 2001;88:313-318.
7. Klein I, Ojamaa K: Thyroid hormone and the heart. *Am J Med.* 1996;101:459-460.
8. Klein I: Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med.* 1990;88:631-637.

9. Klein I, Ojamaa K: Thyroid hormone and the cardiovascular system: from theory to practice. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:1026-1027.
10. Biondi B, Fazio S, Carella C, Amato G, Cittadini A, Lupoli G, Saccà L, Bellastella A, Lombardi G: Cardiac effects of long term thyrotropin-suppressive therapy with levothyroxine. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:334-338.
11. Valente M, De Santo C, de Martino Rosaroll P, Di Maio V, Di Meo S, De Leo T: The direct effect of the thyroid hormone on cardiac chronotropism. *Arch Int Physiol Biochim.* 1989;97:431-40.
12. Klein I, Hong C: Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. *J Clin Invest.* 1986 ;77:1694-1698.
13. McAllister RM, Grossenburg VD, Delp MD, Laughlin MH: Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses. *Am J Physiol.* 1998;274:946-953.
14. Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Alvarez-Guerra M, García-Estañ J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol.* 2006;154:197-212.
15. Napoli R, Biondi B, Guardasole V, Matarazzo M, Pardo F, Angelini V, Fazio S, Saccà L: Impact of hyperthyroidism and its

correction on vascular reactivity in humans. *Circulation*. 2001;104:3076-3080.

16. Napoli R, Guardasole V, Angelini V, Zarra E, Terracciano D, D'Anna C, Matarazzo M, Oliviero U, Macchia V, Saccà L: Acute effects of triiodothyronine on endothelial function in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;99:250-254.

17. Fellet AL, Arza P, Arreche N, Arranz C, Balaszczuk AM: Nitric oxide and thyroid gland: modulation of cardiovascular function in autonomic-blocked anaesthetized rats. *Exp Physiol*. 2004;89:303-312.

18. Förstermann U, Münzel T: Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113:1708-1714.

19. Taddei S, Caraccio N, Virdis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Salvetti A, Ferrannini E, Monzani F: Impaired endothelium-dependent vasodilatation in subclinical hypothyroidism: beneficial effect of levothyroxine therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3731-3737.

20. Taddei S, Caraccio N, Virdis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Ferrannini E, Salvetti A, Monzani F: Low-grade systemic inflammation causes endothelial dysfunction in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:5076-5082.

21. Sabio JM, Rodriguez-Maresca M, Luna JD, García del Río C, Vargas F: Vascular reactivity to vasoconstrictors in aorta and renal vasculature of hyperthyroid and hypothyroid rats. *Pharmacology*. 1994;49:257-264.

22. Zwaveling J, Batink HD, de Jong J, Winkler Prins EA, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Thyroid hormone modulates inotropic responses, alpha-adrenoceptor density and catecholamine concentrations in the rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996 ;354:755-764.

23. Carreras MC, Peralta JG, Converso DP, Finocchietto PV, Rebagliati I, Zaninovich AA, Poderoso JJ: Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid-dependent regulation of O(2) uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:2282-2288.

24. Vargas F, Fernández-Rivas A, García Estañ J, García del Río C: Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Pharmacology*. 1995;51:308-314.

25. Vargas F, Osuna A: Modulatory role of endothelium-derived relaxing factors on the response to vasoconstrictors and flow-pressure curve in the isolated perfused rat kidney. *J Vasc Res*. 1996;33:119-123.

26. Ojamaa K, Sabet A, Kenessey A, Shenoy R, Klein I :Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. *Endocrinology*. 199 ;140:3170-3176.

27. Cappola AR, Ladenson PW: Hypothyroidism and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2438-2444.

28. Staels B, Van Tol A, Chan L, Will H, Verhoeven G, Auwerx J: Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. *Endocrinology*. 1990;127:1144-1152.

29. Salter AM, Hayashi R, al-Seeni M, Brown NF, Bruce J, Sorensen O: Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density-lipoprotein receptor and on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activities in rat liver. *Biochem J*. 1991;276:825-832.

30. Kahaly GJ, Dillmann WH: Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*. 2005;26:704-728.

31. Christ-Crain M, Meier C, Guglielmetti M, Huber PR, Riesen W, Staub JJ, Müller B:Elevated C-reactive protein and homocysteine values: cardiovascular risk factors in hypothyroidism? A cross-sectional and a double-blind, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis*. 2003;166:379-386.

32. Hak AE, Pols HA, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JC: Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med.* 2000;132:270-278.

33. Palmieri EA, Fazio S, Lombardi G, Biondi B. Subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk: a reason to treat? *Treat Endocrinol.* 2004;3:233-44.

34. Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:31-50.

35. Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, Fazio S. Effects of subclinical thyroid dysfunction on the heart. *Ann Intern Med.* 2002;137:904-914.

VI. LEGENDA ALLE FIGURE

Figura 1. Variazione del FBF in risposta all'Acetilcolina, infusa in arteria brachiale a dosi crescenti, in controlli sani, pazienti con ipotiroidismo cronico e ipotiroidismo acuto. I dati (media±SE) sono stati analizzati mediante ANOVA per misurazioni ripetute.

* $p < 0.05$ vs i controlli.

Figura 2.

Pannello a. Bilancio dei nitriti dell'avambraccio durante l'infusione di Acetilcolina in controlli e pazienti con ipotiroidismo acuto e cronico. Il segno negativo indica rilascio di nitriti nel sangue refluo dall'avambraccio.

* $p < 0.05$ vs i controlli.

Pannello b. Bilancio di cGMP dell'avambraccio durante l'infusione di acetilcolina in controlli e pazienti con ipotiroidismo acuto e cronico. Il segno negativo indica rilascio di cGMP nel sangue refluo dall'avambraccio.

* $p < 0.05$ vs i controlli.

Figura 3. Variazione del FBF in risposta al Nitroprussiato di Sodio, infuso in arteria brachiale a dosi crescenti, in controlli sani, pazienti con ipotiroidismo cronico e ipotiroidismo acuto. I dati (media±SE) sono stati analizzati mediante ANOVA per misurazioni ripetute.

*p<0.005 vs i controlli.

Figura 4. Pendenze delle curve dose-risposta alla norepinefrina, infusa in arteria brachiale a dosi crescenti, in controlli sani, pazienti con ipotiroidismo cronico e ipotiroidismo acuto. I dati (media±SE) sono stati analizzati mediante ANOVA.

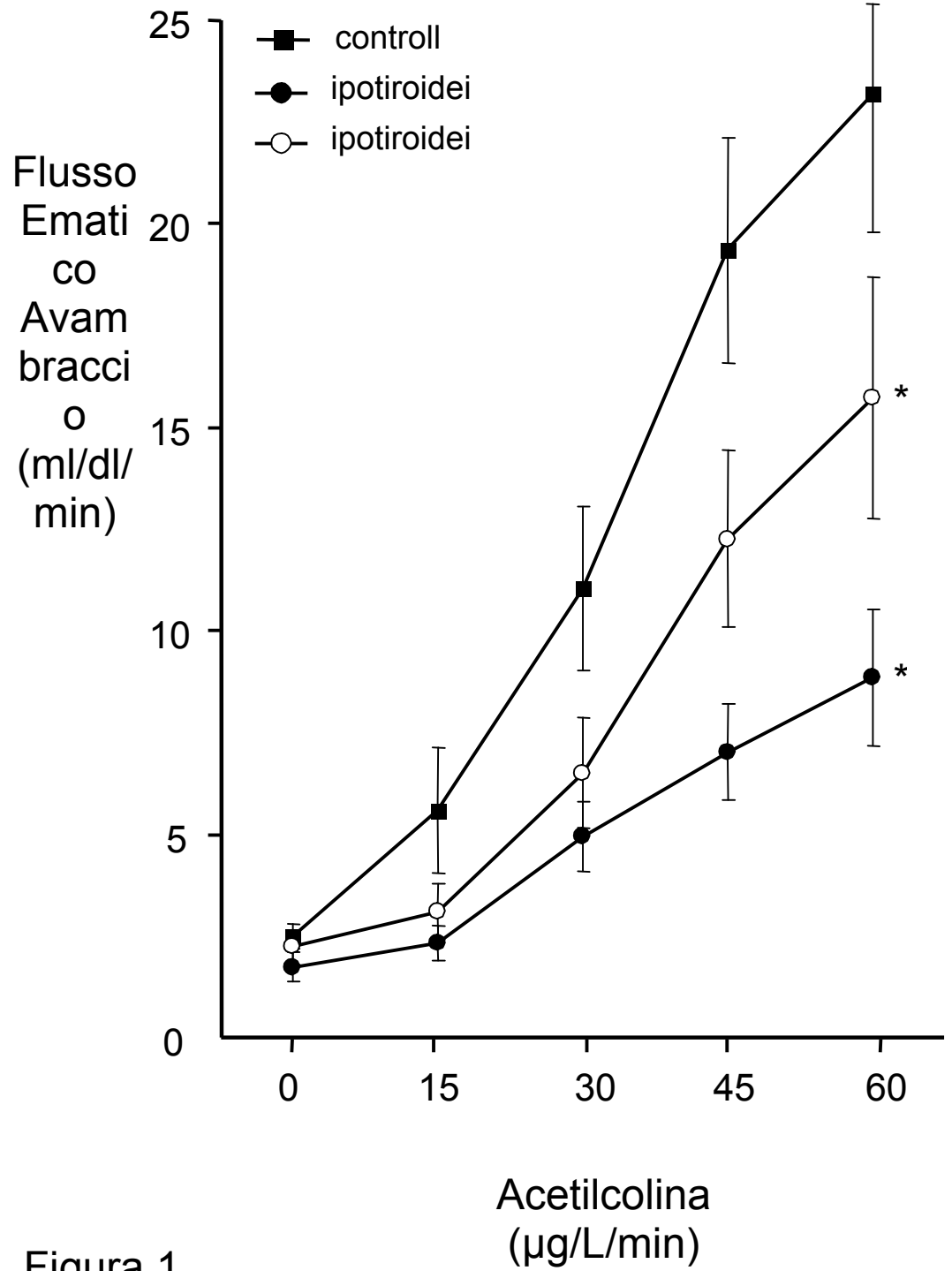
VII. TABELLE E FIGURE

Tabella I. Caratteristiche cliniche e metaboliche dei soggetti studiati.

	Sesso (M/F)	età (anni)	BMI (Kg/m ²)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	colesterolo (mg/dl)	TSH (μU/ml)	fT₃ (pg/ml)	fT₄ (pg/ml)
controlli	6/4	41.4±4.19	26.65±1.1 5	133.3±5.8	61.7±2.82	192.6±10	1.22±0.55	2.95±0.33	10.2±0.5
ipotiroidi cronici	3/7	43.1±4.47	24.07±1.2 1	137.56±9. 1	75.44±5.4	229±25.1	47.8±14.5*	2.28±0.66	3.27±1.36 **
ipotiroidi acuti	1/7	40.0±4.68	26.59±0.9 3	140.75±6. 4	66.5±2.77	229±22.7	85.67±23.8*	1.28±0.29*	3.39±1.28 **

*p<0.01 vs i controlli

**p<0.001 vs i controlli



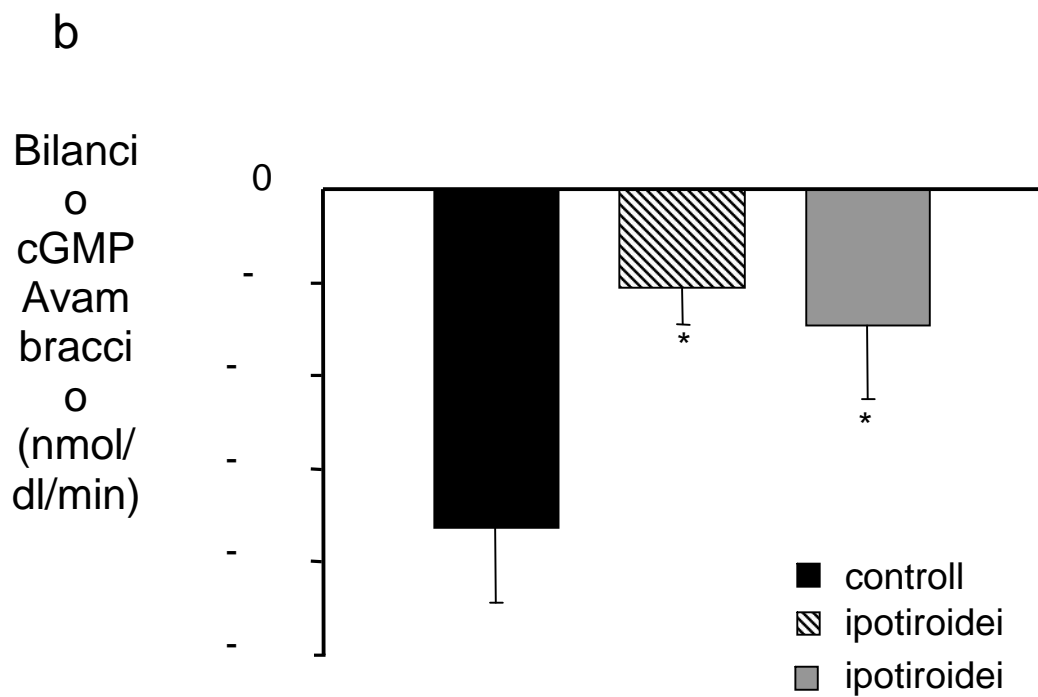
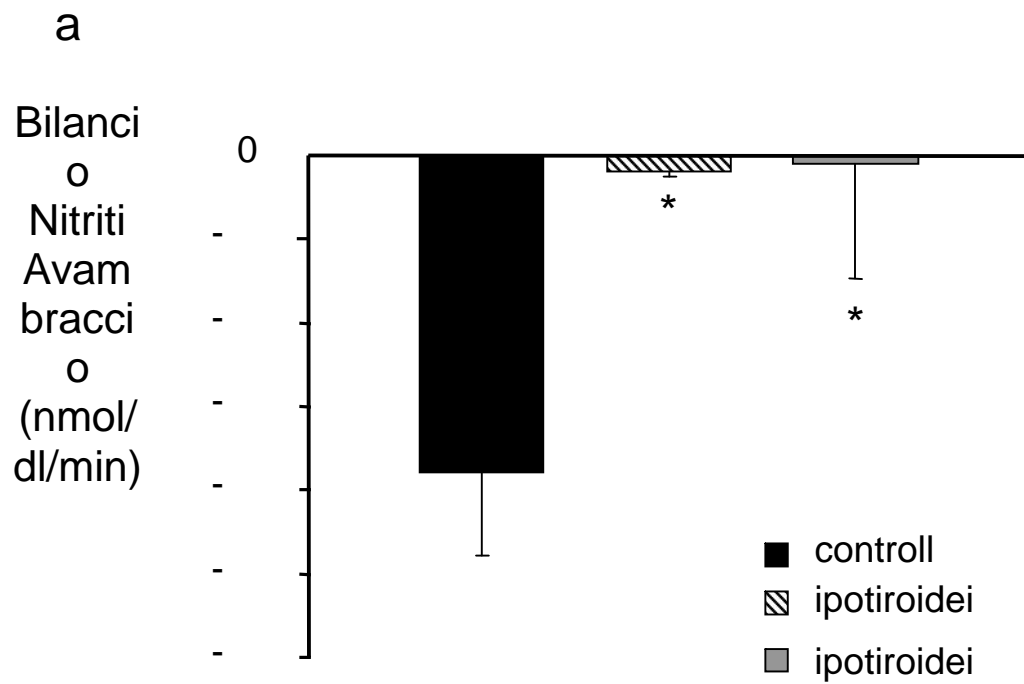


Figura 2

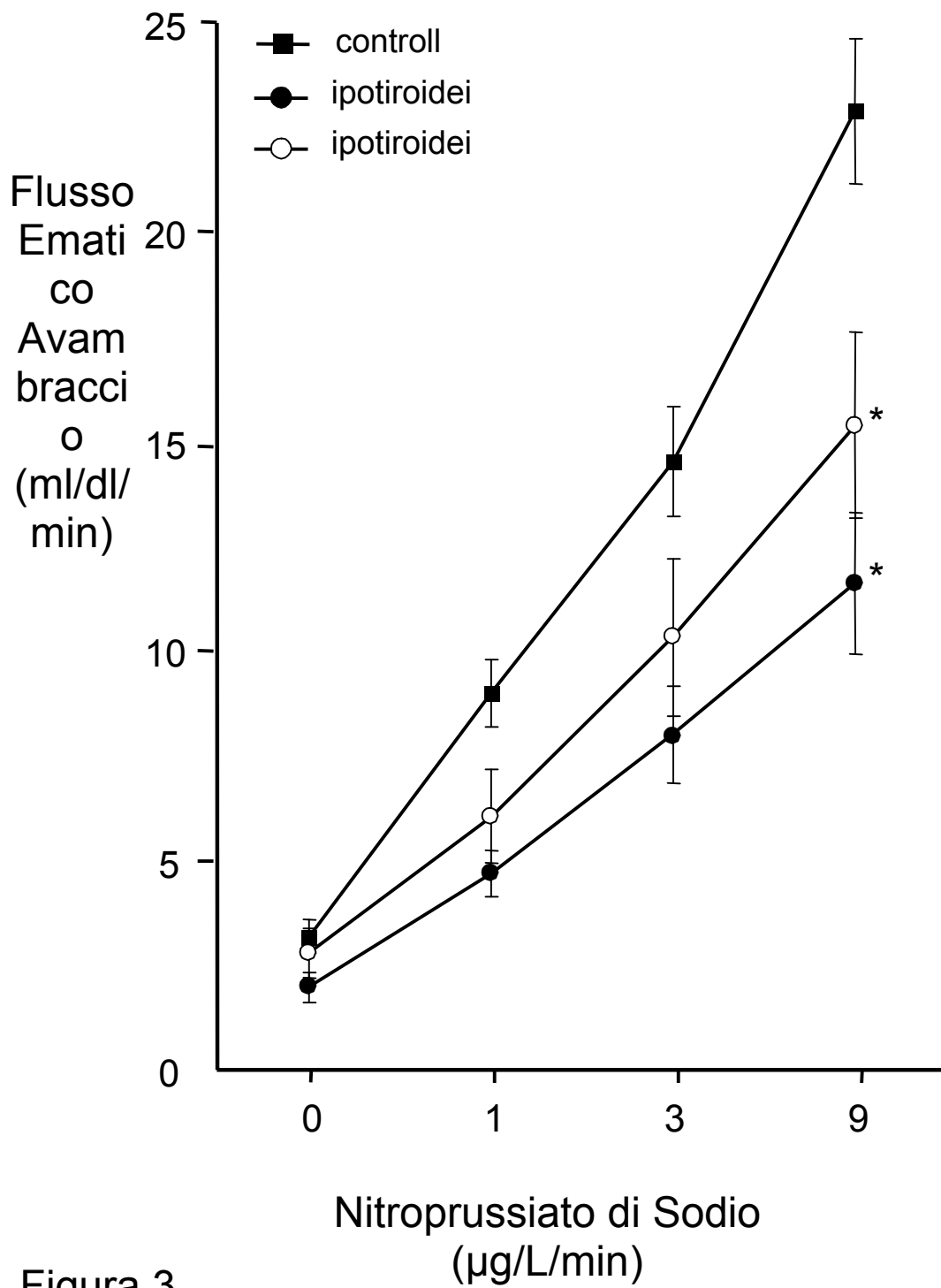


Figura 3

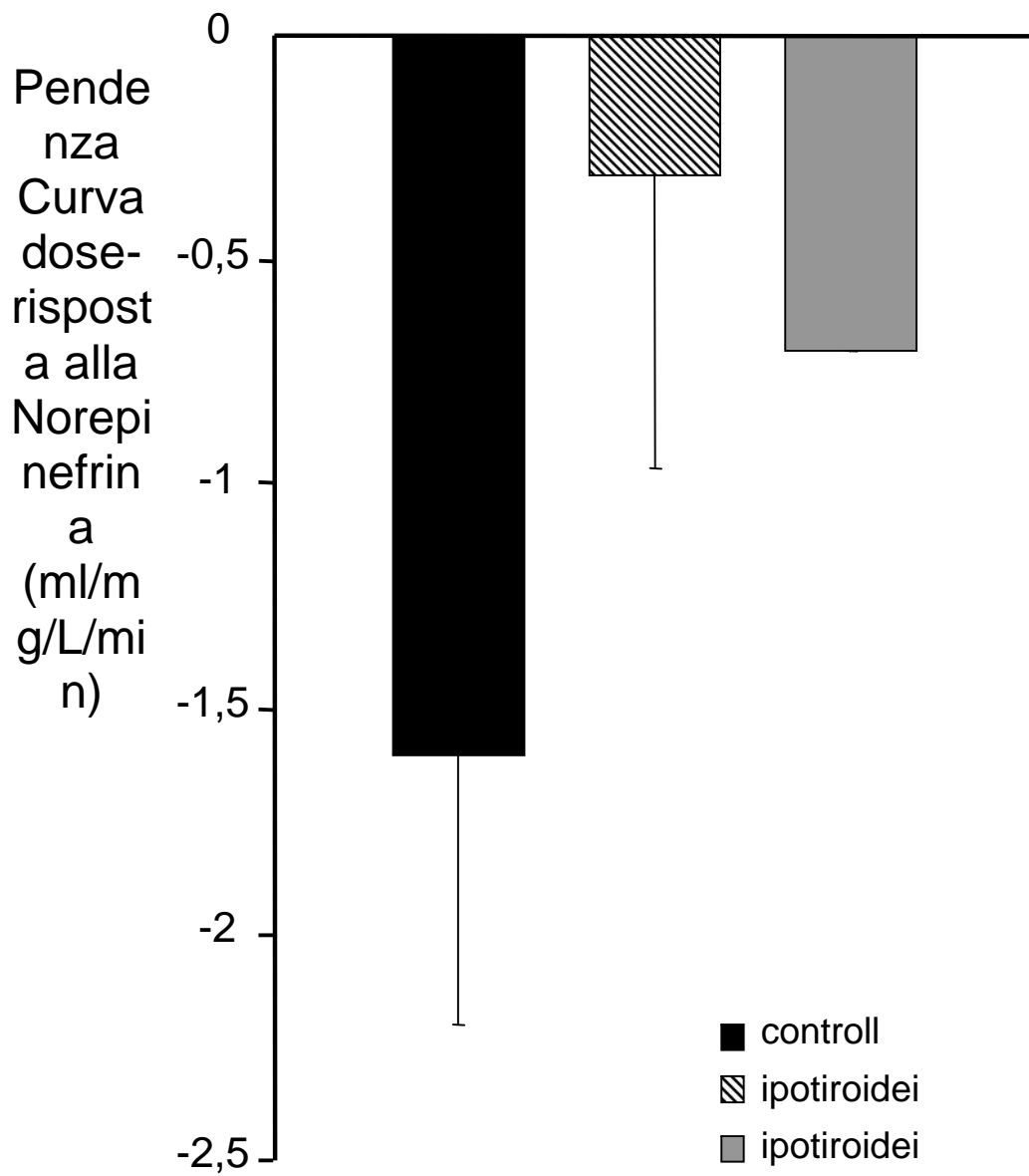


Figura 4