

FISIOPATOLOGIA

METABOLISMO DEL FERRO ED ATEROSCLEROSI: IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE E TERAPEUTICHE

Iron metabolism and atherosclerosis: pathophysiological and therapeutic implications

LUCIA MARCONI¹, MASSIMO R. MANNARINO¹, GIULIO GIORDANO², MATTEO PIRRO¹

¹Sezione di Medicina Interna, Angiologia e Malattie da Arteriosclerosi.

Dipartimento di Medicina. Università degli Studi di Perugia, Perugia;

²S.C. Medicina Interna, Servizio di Ematologia, Ospedale "A. Cardarelli", Campobasso

SUMMARY

The first hypotheses about the correlation between iron metabolism and the development of atherosclerosis were advanced over 25 years ago in the so-called "iron hypothesis". The authors hypothesized that a high iron level could increase cardiovascular risk by promoting atherosclerosis. To confirm this assumption, it was observed that depletion or mild iron deficiency exerted anti-atherosclerotic effects. Elemental iron can induce oxidative stress *in vivo*, thus promoting and perpetuating inflammation. Since atherosclerosis is notoriously characterized by an overactivation of oxidative and inflammatory responses, iron accumulation could, at least in part, contribute to these phenomena, thereby promoting the progression of atherosclerotic disease. However, results of studies in patients with hemochromatosis, a disorder characterized by a systemic iron overload, are in contrast with the "iron hypothesis"; in fact, these patients seem to be protected from the development of atherosclerosis. These paradoxical observations could be explained by the variable distribution of intracellular iron within the macrophages involved in the atherosclerotic process. Particularly, the variable expression of hepcidin, a key hormone regulating iron homeostasis, affects iron distribution in various cell types and the propensity to develop atherosclerosis. Modulation of hepcidin expression may represent a new therapeutic strategy aimed at regulating iron metabolism with a potential anti-atherosclerotic effect.

Key words: Iron, Atherosclerosis, Hepcidin, oxidized LDL, Macrophages.

Indirizzo per la corrispondenza

Massimo R. Mannarino, MD, PhD

Medicina Interna, Angiologia

e Malattie da Arteriosclerosi

Dipartimento di Medicina

Università di Perugia

E-mail: massimo.mannarino@unipg.it

Introduzione

Il ferro è un elemento essenziale che partecipa come gruppo prostetico in molti processi fisiologici, permettendo il normale funzionamento di proteine ed enzimi. Garantisce la funzionalità mitocondriale attra-

verso il trasporto di elettroni nella respirazione cellulare, contribuisce alla sintesi ed alla riparazione del DNA nonché ai processi di crescita e morte cellulare. Inoltre, essendo un componente fondamentale dell'emoglobina, risulta cruciale nel processo di eritropoiesi e nel trasporto tissutale dell'ossigeno. D'altra parte, partecipando a reazioni di ossido-riduzione, il ferro contribuisce alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) risultando potenzialmente tossico se prodotto in quantità eccessive. Viste le molteplici attività e funzioni regolate dal ferro, sono attivi numerosi sistemi finalizzati a regolarne la sua omeostasi, garantendo così livelli marziali costanti sia nel plasma che nei diversi organi.

In virtù della attività pro-ossidante e pro-infiammatoria del ferro, della sua spiccata attitudine a promuovere l'ossidazione delle LDL e la polarizzazione macrofagica verso un fenotipo pro-infiammatorio, si è ritenuto che il ferro potesse svolgere un'azione pro-aterogena. Tuttavia, il modello classico di patologia da accumulo marziale, l'emocromatosi ereditaria, non è caratterizzato da un eccesso di rischio cardiovascolare su base aterosclerotica. Pertanto, la

visione semplicistica secondo cui l'eccesso di ferro si debba sempre tradurre in un aumento del rischio aterosclerotico si è andata perfezionando nel corso degli anni; ciò in seguito al chiarimento del ruolo svolto da una serie di nuovi attori molecolari coinvolti nella regolazione del metabolismo del ferro. Tra questi ultimi, l'epcidina sembra suscitare il maggiore interesse sia sul piano fisiopatologico che per le prospettive terapeutiche che la modulazione della sua attività hanno suggerito.

Metabolismo ed omeostasi del ferro

Nella Figura 1 è riportato uno schema del bilancio delle entrate, dei depositi e delle perdite di ferro dell'organismo. I depositi di ferro in un adulto ammontano a circa 4-5 grammi, ridistribuiti nei diversi organi e tessuti. Più della metà del ferro corporeo è legata all'emoglobina contenuta nei globuli rossi, il 10% circa è legato alla mioglobina (sistema di immagazzinamento dell'ossigeno all'interno dei muscoli), agli enzimi responsabili della respirazione cellulare (citocromi mitocondriali) e ad altri enzimi coinvolti nelle reazioni di ossido-riduzione. Una minima quota di ferro circola a livello plasmatico trasportato dalla transferrina (0,3-0,4%). La restante quota è legata alla ferritina, proteina di riserva marziale all'interno della cellula, maggiormente espressa a livello epatocitario e del sistema reticolo-endoteliale epatico, midollare e splenico.

Il metabolismo del ferro è regolato da un sistema complesso ed estremamente efficiente volto a garantirne un contenuto stabile ed omogeneo nell'organismo. Ogni giorno viene perso in media circa 1 mg di ferro attraverso la desquamazione delle cellule senescenti che rivestono cute e mucosa intestinale. La quota di perdita marziale è maggiore nella donna in età fertile, dal momento che il flusso ematico mestruale

Bullet Points

- Il ferro è un importante catalizzatore di reazioni fondamentali per la normale funzionalità cellulare, nonché un agente in grado di produrre radicali liberi ed incrementare lo stress ossidativo.
- L'epcidina, un ormone chiave nel mantenimento dell'omeostasi del ferro, favorisce l'accumulo intracellulare di ferro.
- La quota di ferro intracellulare sembra intervenire sul processo di polarizzazione macrofagica promuovendo un fenotipo pro-infiammatorio e pro-aterogeno.
- L'epcidina, in quanto regolatrice dei livelli intracellulari di ferro, potrebbe rappresentare un ragionevole bersaglio per strategie terapeutiche volte a contrastare il processo aterosclerotico.

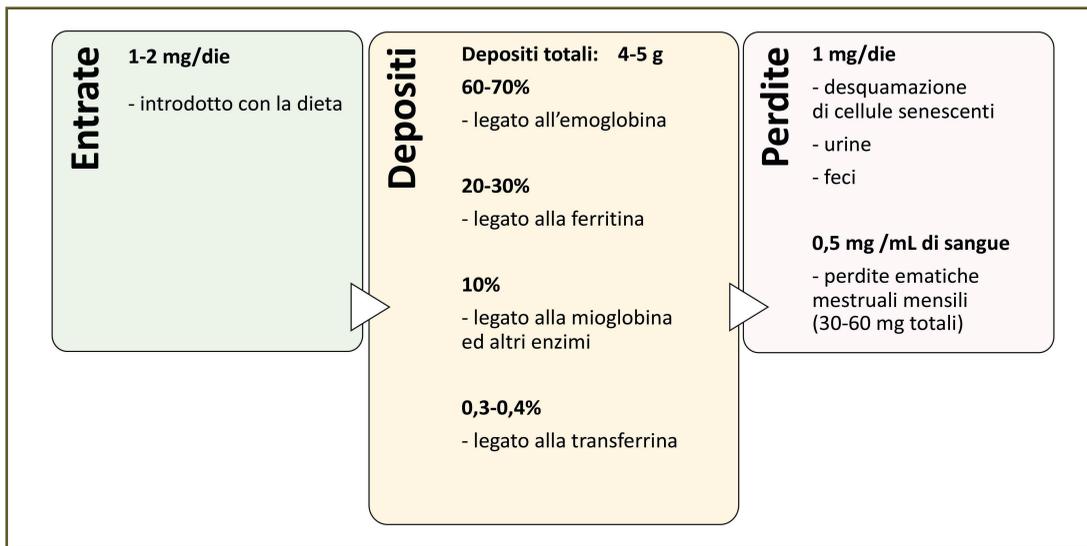


Figura I - Il bilancio del ferro.

causa mediamente una perdita aggiuntiva di circa 0,5 mg/die. I processi di perdita marziale non sono soggetti a controllo omeostatico, per cui la stretta regolazione dell'assorbimento intestinale del ferro rappresenta il meccanismo chiave per il mantenimento della quota marziale corporea.

Circa il 90% del fabbisogno corporeo di ferro origina dalla degradazione degli eritrociti senescenti e, in minor misura di altri tipi cellulari, attraverso un ricircolo mediato dal sistema reticolo-endoteliale; l'alimentazione garantisce l'introduzione di una quota inferiore di ferro, il cui assorbimento enterocitario è finemente regolato.

Assorbimento intestinale del ferro

Ogni giorno vengono assorbiti circa 2 mg di ferro a livello duodenale e dalla porzione prossimale del digiuno. Negli alimenti il ferro può trovarsi in forma di ferro eme e ferro non-eme. Quest'ultimo, per essere assorbito, deve essere prima ridotto in forma ferrosa attraverso il citocromo duodenale B (DCYTB o CYBRD1), una reductasi presente a livello della membrana apicale dell'orletto a spazzola enterocitario

(1). Il ferro in forma ridotta viene poi trasportato attraverso la membrana apicale da un trasportatore divalente (DMT1) all'interno dell'enterocita (1). La ferroportina, una proteina trans-membrana situata sul versante basolaterale dell'enterocita, garantisce il trasporto del ferro nella circolazione sistemica. Prima che ciò avvenga, il ferro viene convertito in forma ferrica per mezzo dell'efestina, ferrossidasi enterocitaria, in modo da consentirgli il legame con una proteina dedicata al suo trasporto ematico, la transferrina (1).

Uptake del ferro a livello tissutale

Il ferro circola a livello plasmatico principalmente in forma non libera, legato cioè alla transferrina.

I recettori tissutali della transferrina (TFR1) sono espressi in maniera ubiquitaria sulla superficie cellulare e garantiscono l'endocitosi del complesso ferro-transferrina (1). Il ferro viene successivamente scisso dalla transferrina attraverso il sistema di acidificazione lisosomiale mentre la transferrina ancora legata al TFR1 a livello delle vescicole viene trasportata verso la su-

perficie cellulare per essere nuovamente immessa in circolo (1). All'interno della cellula il ferro viene rilasciato nel citoplasma attraverso il DMT1 previa riduzione a ione ferroso da parte di una ferredossina transmembrana (STEAP3) (1). Il livello di espressione dei geni codificanti per le numerose proteine coinvolte nei meccanismi di trasporto e regolazione del metabolismo del ferro è controllato a livello post-trascrizionale attraverso il sistema IRE/IRP (elementi di risposta al ferro/proteine regolatrici del ferro) (1). In condizioni di ferro-carenza, le proteine regolatrici IRP 1 e 2 si legano alle sequenze IRE degli mRNA all'estremo 3' stabilizzando gli stessi, favorendo la traduzione di proteine essenziali (es. TFR1, DMT1, transferrina), col fine ultimo di promuovere l'uptake intracellulare del ferro ed il trasporto di ferro ai tessuti periferici (1). Il legame delle IRP alle sequenze IRE presenti all'estremo 5' degli mRNA codificanti ferritina e ferroportina ne impedisce la loro traduzione (1).

Ricircolo e regolazione del metabolismo del ferro

La maggior parte del ferro è contenuto all'interno degli eritrociti. Quando questi diventano senescenti vengono riconosciuti e fagocitati dai macrofagi del sistema reticolo-endoteliale (eritrofagocitosi) (1). Il ferro viene scisso dal gruppo eme e trasportato poi nel citosol attraverso il trasportatore NRAMP1 (proteina dei macrofagi associata alla resistenza naturale) presente a livello della membrana del fagolisoma (1). Il ferro può quindi legarsi alla ferritina per essere immagazzinato a livello intracellulare come riserva oppure essere riversato in circolo attraverso la ferroportina e trasportato verso altri organi e tessuti.

La regolazione omeostatica del ferro si realizza prevalentemente a livello epatico e necessita dell'azione coordinata di numero-

se proteine; tra queste, un ruolo fondamentale spetta all'epcidina ed alla ferroportina (1). Quest'ultima permette la fuoriuscita del ferro dalle cellule e la sua espressione è regolata a più livelli, trascrizione, traduzione e post-traduzione. L'mRNA codificante per la ferroportina contiene sequenze IRE all'estremità 5' e la sua trascrizione viene inibita in condizioni di carenza marziale al fine di ridurre la fuoriuscita cellulare a livello macrofagico (1). A livello enterocitario la carenza marziale agisce in maniera opposta che nei macrofagi, stabilizzando la proteina HIF-2 α che upregola la trascrizione di ferroportina a livello del dominio basolaterale (2, 3). La trascrizione della ferroportina a livello dei macrofagi è inibita da stimoli infiammatori al fine di sequestrare il ferro a livello intracellulare, meccanismo sviluppato come difesa immunitaria finalizzato a limitare la disponibilità di ferro ai microrganismi infettanti.

A livello sistemico, il meccanismo principale di regolazione dell'espressione della ferroportina coinvolge un ormone peptidico di origine epatica, l'epcidina (1).

Quest'ultima si lega alla ferroportina inducendone l'internalizzazione e la successiva ubiquitinazione. L'espressione dell'epcidina viene inibita dalla ferro-carenza, dall'ipossia e dall'eritropoiesi efficace mentre la sua sintesi è favorita da elevati livelli di ferro e dall'infiammazione, in particolar modo tramite l'azione dell'interleuchina-6 (1).

Ferro ed aterosclerosi: la cosiddetta "Iron hypothesis"

L'aterosclerosi è il risultato di una risposta infiammatoria cronica al danno endoteliale caratterizzata da una massiccia infiltrazione macrofagica secondaria all'accumulo lipidico sub-intimale (4, 5).

L'infiammazione promuove l'intrappolamento del ferro a livello intracellulare at-

traverso l'incremento della sintesi di proteine coinvolte nel trasporto transmembrana e nell'immagazzinamento dello stesso. D'altra parte, il ferro svolge un ruolo di promozione dello stato infiammatorio andando a modulare la risposta TLR-4-mediata ed attivando il fattore di trascrizione NF- κ B attraverso la produzione di radicali liberi (6). Il nesso di causalità tra ferro, aterosclerosi e malattie cardiovascolari è stato avanzato nel 1981 da Jerome Sullivan, a cui si attribuisce la cosiddetta "iron hypothesis". L'ipotesi nasce da una serie di semplici considerazioni:

- 1) l'incidenza di lesioni ateromasiche ed eventi cardiovascolari nelle donne in età fertile è minore rispetto a quella in epoca post-menopausale e rispetto a quella registrata nel sesso maschile;
- 2) l'accumulo marziale si accompagna a danno cardiaco;
- 3) la donna in età menopausale tende ad accumulare ferro (7).

Secondo lo stesso Autore, bassi livelli di ferro potrebbero essere protettivi nei confronti delle malattie cardiovascolari, per cui ha ipotizzato che la flebotomia regolare, provocando una lenta deplezione marziale, potesse essere una pratica terapeutica efficace nel ridurre il rischio cardiovascolare (7). A questa intrigante ipotesi hanno dato supporto alcuni studi nei quali si è dimostrato che maggiori depositi di ferro corporeo (intesi come livelli elevati di ferritina e più alta percentuale di saturazione della transferrina) si associavano ad un'incidenza maggiore di infarti acuti del miocardio (8, 9). Una serie di studi successivi, però, ha permesso di chiarire che la relazione tra ferro ed aterosclerosi appare più complessa di quanto inizialmente ipotizzato da Sullivan. Alcuni studi, infatti, hanno mostrato la non linearità della correlazione tra livelli di ferro corporeo ed aterosclerosi (10-13).

Il ferro è in grado di generare stress ossidativo e, di conseguenza, promuovere uno stato pro-infiammatorio. Partecipa alle reazioni di ossido-riduzione grazie alla sua capacità di trasferire elettroni nel passaggio dallo stato ferroso (Fe^{2+}), in cui è in grado di donare elettroni, allo stato ferrico (Fe^{3+}), in cui è in grado di accettare elettroni (14). Questo tipo di reazione (reazione di Fenton), svolta in condizioni di metabolismo aerobio, catalizza la formazione di ROS come il radicale ossidrilico $\bullet OH$. I ROS sono molecole in grado di indurre modifiche strutturali a carico di lipidi, proteine ed acidi nucleici, andando ad alterarne la funzione, interferendo con la proliferazione ed il turnover cellulare, generando disfunzione endoteliale ed alterazioni della risposta immunitaria (14). L'ossidazione delle lipoproteine, in particolar modo delle LDL, è uno degli eventi cardine associato all'azione pro-ossidante del ferro oltre che costituire un importante fattore di danno aterosclerotico (15). Numerosi studi *in vitro* hanno infatti potuto confermare che tra i vari agenti pro-ossidanti testati, il ferro sia uno dei maggiori elementi attivi nell'ossidazione delle LDL (16).

Nella *Figura 2* sono schematizzati gli effetti del sovraccarico di ferro sui principali elementi coinvolti nel processo aterosclerotico. Partendo dalla considerazione che le reazioni ossido-riduttive sarebbero facilitate a livello intra-lisosomiale (17) e che le vescicole lisosomiali sono strutture fondamentali alla funzione di cellule come monociti e macrofagi (elementi cellulari determinanti nel processo ateromasico), si è pensato che il modello proposto da Sullivan (sovraccarico corporeo del ferro = danno cardiovascolare) fosse troppo semplicistico. Si è passati quindi ad un modello di correlazione tra ferro ed aterosclerosi più complesso, dove prende sempre più campo l'ipotesi secondo cui sono i livelli intra-

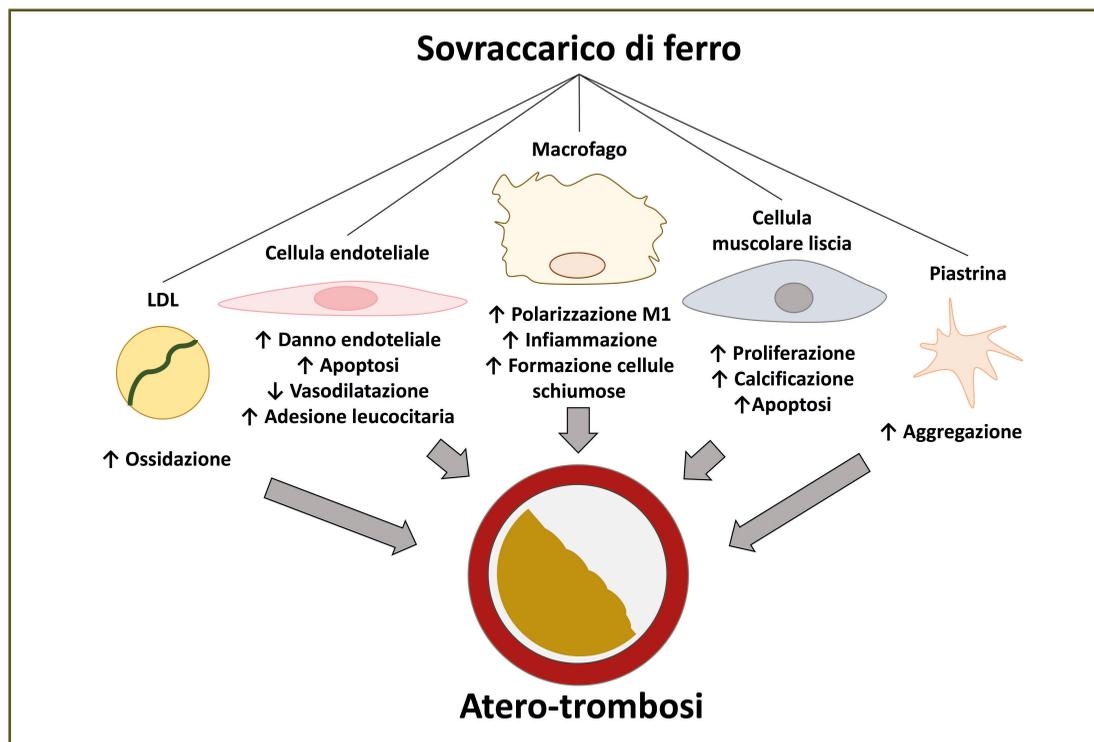


Figura 2 - Effetti del sovraccarico di ferro sui principali elementi coinvolti nel processo aterosclerotico.

cellulari di ferro e la modulazione differenziale del metabolismo del ferro in diversi tipi cellulari della parete arteriosa che potrebbero spiegare la diversa suscettibilità a sviluppare la malattia aterosclerotica.

Polarizzazione macrofagica e ferro intracellulare

L'aterosclerosi, in quanto patologia infiammatoria cronica fibroproliferativa, vede coinvolte nel suo processo sia l'immunità innata che quella adattativa (18). I macrofagi, derivanti dalla differenziazione dei monociti, sono le principali cellule effettrici della risposta immunitaria innata. La differenziazione macrofagica si accompagna ad un processo di trasformazione noto come "polarizzazione" macrofagica. Si riconoscono due fenotipi macrofagici principali caratterizzati da un diverso spettro di attività: M1

o macrofagi attivati classicamente, M2 o macrofagi attivati alternativamente. Entrambe le tipologie sono state riscontrate a livello della placca ateromasica (19). I macrofagi M1 anche detti "a fenotipo infiammatorio" sono attivati in presenza di $\text{IFN-}\gamma$ e da molecole di natura batterica come il lipopolisaccaride (LPS). Questi esprimono recettori scavenger a livello della loro superficie di membrana mediante i quali riconoscono le LDL ossidate e mediano la loro internalizzazione. L'accumulo intracellulare di LDL ossidate porta alla progressiva trasformazione del macrofago in cellula schiumosa (14). I macrofagi M1 attivati producono citochine infiammatorie e fattori di crescita in grado di promuovere il reclutamento di altri monociti dal torrente ematico e la proliferazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media e la loro migrazione intimale (20). Il ruolo dei macrofagi M1 a livel-

lo della placca ateromasica non sembra limitarsi alla formazione e all'accrescimento della stessa, bensì questi sembrerebbero essere anche i principali responsabili dell'instabilità di placca attraverso la produzione di enzimi litici come le metalloproteasi di matrice (MMP-1, MMP-3, MMP-9) che, rilasciate a livello extracellulare, mediano l'idrolisi delle fibre di collagene del cappuccio fibroso della placca (20).

Il ruolo dei macrofagi M2 nel processo di aterogenesi è più controverso. La polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M2 è stimolata da citochine prodotte da linfociti Th2 e mastociti, quali IL-1- β , IL-4, IL-10 e IL-13. Questi macrofagi promuovrebbero la fibrosi della placca attraverso il

reclutamento di fibroblasti tissutali al fine di garantire la stabilizzazione della stessa (21); inoltre, non possiedono recettori scavenger in grado di internalizzare le LDL ossidate. Si è dimostrato però che questo fenotipo macrofagico è in grado di produrre, come gli M1, metalloproteasi che intervengono nel rimodellamento della placca.

Per quanto riguarda la loro relazione con il ferro, il fenotipo macrofagico M1 è in grado di accumulare ferro intracellulare in relazione alla bassa espressione di ferroportina (*Figura 3*); in questa tipologia di macrofagi è comune osservare un basso turnover del ferro per la scarsa espressione dell'eme-ossigenasi 1 (HOX1) e gli elevati livelli di ferritina. Al contrario i macro-

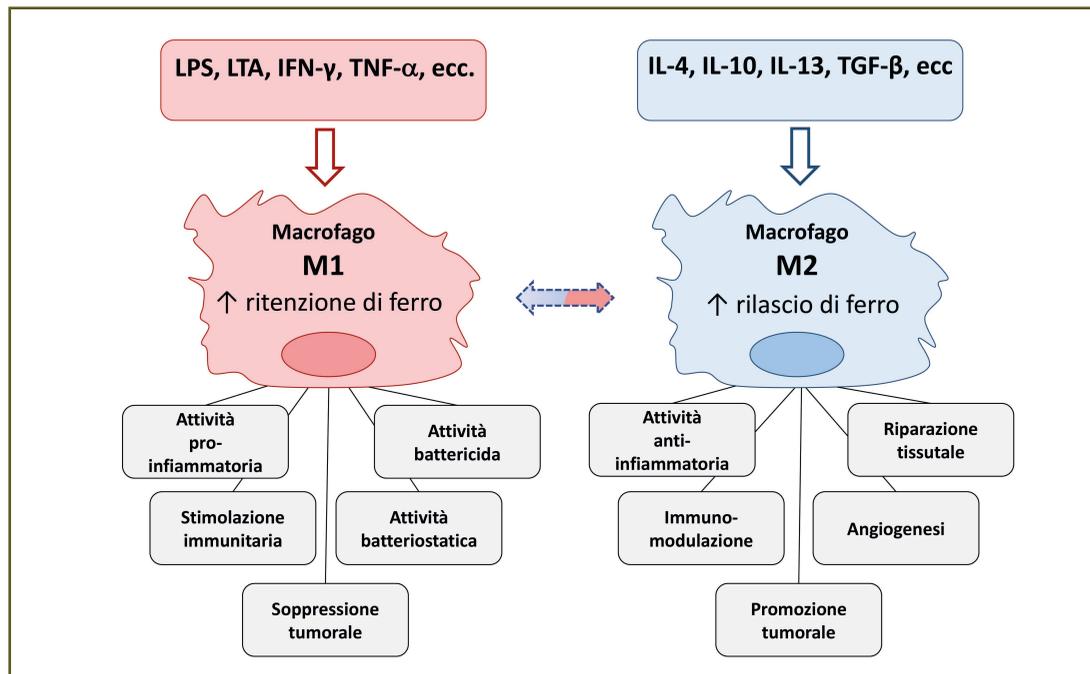


Figura 3 - Polarizzazione macrofagica e metabolismo del ferro. I macrofagi M1, anche detti “a fenotipo infiammatorio”, sono attivati in presenza di interferone- γ (IFN- γ) e da molecole di natura batterica come il lipopolisaccaride (LPS) e l'acido lipoteicoico (LTA). La polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M2 è favorita da stimoli quali TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13. L'elevato contenuto di ferro a livello intracellulare nei macrofagi M1 sembrerebbe perpetuare l'attivazione macrofagica e la produzione di citochine infiammatorie. I macrofagi M2, distinguibili in diversi sottotipi, sono invece caratterizzati da più bassi livelli intracellulari di ferro, produzione di citochine anti-infiammatorie e immuno-modulanti e dalla capacità di produrre fattori coinvolti nella neoangiogenesi.

fagi M2 hanno un basso contenuto marziale intracellulare (22) (*Figura 3*).

Il ferro a livello macrofagico eserciterebbe un doppio ruolo: la sua capacità di produrre radicali liberi promuoverebbe uno stato pro-infiammatorio che polarizza la differenziazione macrofagica verso un fenotipo M1; a sua volta, l'elevato contenuto di ferro a livello intracellulare sembrerebbe perpetuare l'attivazione macrofagica e la produzione di citochine infiammatorie, andando così ad alimentare il processo infiammatorio a livello di placca. A livello intracellulare il ferro si trova principalmente in forma di deposito legato alla ferritina. Esiste una frazione di ferro libera a livello del citosol, la cosiddetta riserva di ferro labile (labile iron pool o LIP), in grado di catalizzare reazioni ossido-riduttive intracellulari e stimolare l'attivazione della cascata infiammatoria (23).

Esiste un ulteriore fenotipo macrofagico, M(Hb), che sembra essere coinvolto nel processo aterogenico. I macrofagi M(Hb) sono stati associati alla progressione ed all'instabilità di placca. Il loro nome deriva dal fatto che sono coinvolti nella clearance dell'emoglobina rilasciata durante la lisi eritrocitaria, fenomeno che può realizzarsi anche all'interno della lesione ateromasica a seguito di emorragie intra-placca (24). Il loro fenotipo si avvicina molto a quello dei macrofagi M2 e si caratterizza infatti da più bassi livelli intracellulari di ferro e, soprattutto, valori molto bassi di LIP. I macrofagi M(Hb) sono associati all'espressione di alti livelli di HIF-1 α and VEGF-A, fattori coinvolti nella neoangiogenesi (25). Il legame tra ferro, macrofagi M(Hb) e progressione di placca sembra risiedere nella interazione tra ferro stesso e l'enzima prolidrossilasi (PHD o HIF prolidrossilasi). In condizioni di normossemia o iperossemia si ha l'idrossilazione di HIF-1 α da parte delle prolidrossilasi; la

forma di HIF-1 α idrossilata viene riconosciuta dalla proteina di Von Hippel-Lindau (VHL), proteina con funzione di oncosoppressore, che ne media l'ubiquitinizzazione impedendo così i processi di neoangiogenesi. Il ferro è un cofattore essenziale all'attività delle prolidrossilasi. I più bassi livelli intracellulari di ferro nei macrofagi M(Hb), fenotipo macrofagico maggiormente rappresentato in corso emorragia intra-placca, ridurrebbero l'attività delle prolidrossilasi portando a una maggiore espressione di HIF-1 α ; a ciò conseguirebbe una maggiore trascrizione di fattori che promuovono l'angiogenesi, quest'ultima caratteristica delle fasi più avanzate dell'aterosclerosi (25). Ciò comporta anche una maggiore espressione della proteina HIF-2 α che upregola non solo la trascrizione di ferroportina, ma anche di eritropoietina che, come noto, ha anche un'azione pro-angiogenetica (3).

Alterazioni congenite del metabolismo del ferro

Gli studi condotti nell'ambito delle alterazioni congenite del metabolismo del ferro sono stati di fondamentale importanza per meglio comprendere il legame tra ferro ed aterosclerosi. Le ricerche condotte su pazienti affetti da emocromatosi ereditaria sono state le prime a mettere in discussione la relazione tra sovraccarico di ferro e l'aterosclerosi. In questa patologia multiorganica, le mutazioni del gene *hfe* (high Fe²⁺ gene) provocano un sovraccarico corporeo di ferro per via dell'eccessivo assorbimento intestinale dello stesso (26). L'accumulo marziale si realizza in vari tessuti, in particolare modo fegato, pancreas, cuore, ipofisi e gonadi. Varianti geniche di emocromatosi sono state associate ad una ridotta trascrizione del gene *hamp* (hepcidin antimicrobial protein) codificante per l'epcidina; a ciò consegue una maggiore espressione di

ferroportina a livello delle membrane degli enterociti ed un aumento dell'assorbimento del ferro in transito nel lume intestinale. Il paradosso che viene a generarsi nei soggetti affetti da emocromatosi ereditaria è che, nonostante l'accumulo marziale corporeo sostenuto dall'eccessivo assorbimento intestinale di ferro ed il conseguente aumento dello stress ossidativo sistemico, questi pazienti non risulterebbero a più alto rischio di sviluppo di placche aterosclerotiche rispetto alla popolazione generale. Addirittura, sembra che questi pazienti siano protetti dal rischio aterosclerotico e cardiovascolare (27). In effetti, i bassi livelli di epcidina nei pazienti con emocromatosi ereditaria oltre che all'incremento dell'assorbimento intestinale del ferro si associano anche ad un ridotto contenuto di ferro intracellulare macrofagico. I monociti ed i macrofagi tissutali isolati da questa categoria di pazienti hanno una ridotta capacità di sintesi di citochine infiammatorie e chemochine (ridotti livelli di espressione di IL-6 e MCP-1) (28). Risultati simili sono stati riscontrati anche in pazienti eterozigoti per le mutazioni del gene *hfe* (14).

Studi di randomizzazione mendeliana hanno confermato il ruolo esercitato dalla programmazione genica nella regolazione del rapporto tra metabolismo del ferro e rischio aterosclerotico. In questi studi in cui è stata esaminata la relazione tra polimorfismi di singoli nucleotidi a carico dei geni coinvolti nel metabolismo del ferro e la prevalenza della malattia coronarica si è visto che esiste una associazione non lineare tra il contenuto marziale corporeo e lo sviluppo di malattie cardiovascolari (29, 30).

Ruolo dell'epcidina e possibili implicazioni terapeutiche

L'epcidina, un ormone di natura peptidica prodotto a livello epatico, svolge un ruolo

cardine della regolazione dell'omeostasi sistemica del ferro. Questo peptide di 25 aminoacidi è stato identificato per la prima volta negli anni 2000 a livello plasmatico e nelle urine. Inizialmente si è ritenuto che l'epcidina fosse coinvolta nella difesa immunitaria e svolgesse attività antimicrobica, da ciò il nome (ep - perché prodotta a livello epatico, - cidina per l'attività battericida) (31, 32). Nel 2004 si è visto che l'epcidina era in grado di regolare i livelli sistemici del ferro andando a modularne l'assorbimento intestinale ed i livelli intracellulari; tali azioni sono state attribuite alla sua capacità di legare la ferroportina e favorirne l'internalizzazione e la sua successiva degradazione (33).

L'espressione del gene codificante per l'epcidina (gene *hamp*) è indotta da stimoli infiammatori, in particolar modo dalle citochine infiammatorie IL-6 e IL-1 β attraverso la via delle chinasi intracellulari JAK/STAT3, dall'aumentata richiesta eritropoietica e dagli alti livelli di ferro attraverso la via di segnalazione mediata dalle BMP/SMAD (proteine morfogenetiche dell'osso/ small mother against decapentaplegic) (34, 35).

Alterazioni dei sofisticati sistemi di regolazione dell'espressione dell'epcidina sono associati a diversi disordini sistemici, da quelli associati all'eccesso di ferro come l'emocromatosi ereditaria a patologie come l'anemia e altri disturbi di natura infiammatoria accomunati da uno squilibrio generale dell'omeostasi marziale (36).

Il ruolo che l'epcidina potrebbe svolgere nell'ambito della promozione del processo aterosclerotico e della sua progressione si estrinseca proprio nella stretta correlazione tra questa proteina e il processo infiammatorio (tanto che lo stesso rappresenta uno stimolo della sua sintesi) e nella capacità dell'epcidina di incrementare i livelli intracellulari di ferro, soprattutto a livello macrofagico (37) (*Figura 4*).

Elevati livelli di questo ormone sono stati riscontrati in diverse patologie accomunate tutte da un incrementato livello di rischio cardiovascolare. Tra queste l'artrite reumatoide, la steatoepatite non alcolica, lo scompenso cardiaco, l'insufficienza renale cronica, il diabete mellito (38-41). È stato dimostrato che livelli elevati di epcidina si associano alla presenza di lesioni aterosclerotiche nei vasi distretti vascolari, in particolare con l'ateromasia carotidea, le calcificazioni coronariche e la stiffness arteriosa; è stata documentata una associazione positiva tra epcidina e la maggiore incidenza di eventi cardiovascolari (42).

In studi condotti su topi knock-out per il gene *hamp*, bassi livelli di epcidina e di conseguenza minori livelli intracellulari di ferro, si sono dimostrati correlare con una più bassa prevalenza di aterosclerosi, una attenuazione dello stato infiammatorio sistemico ed una ridotta attivazione macrofagica (43).

La possibilità di poter modulare l'azione dell'epcidina, andando così a modulare i livelli di ferro intracellulare nelle cellule effettrici del processo infiammatorio aterosclerotico, potrebbe rappresentare una delle prospettive future nell'ambito della terapia dell'aterosclerosi (37).

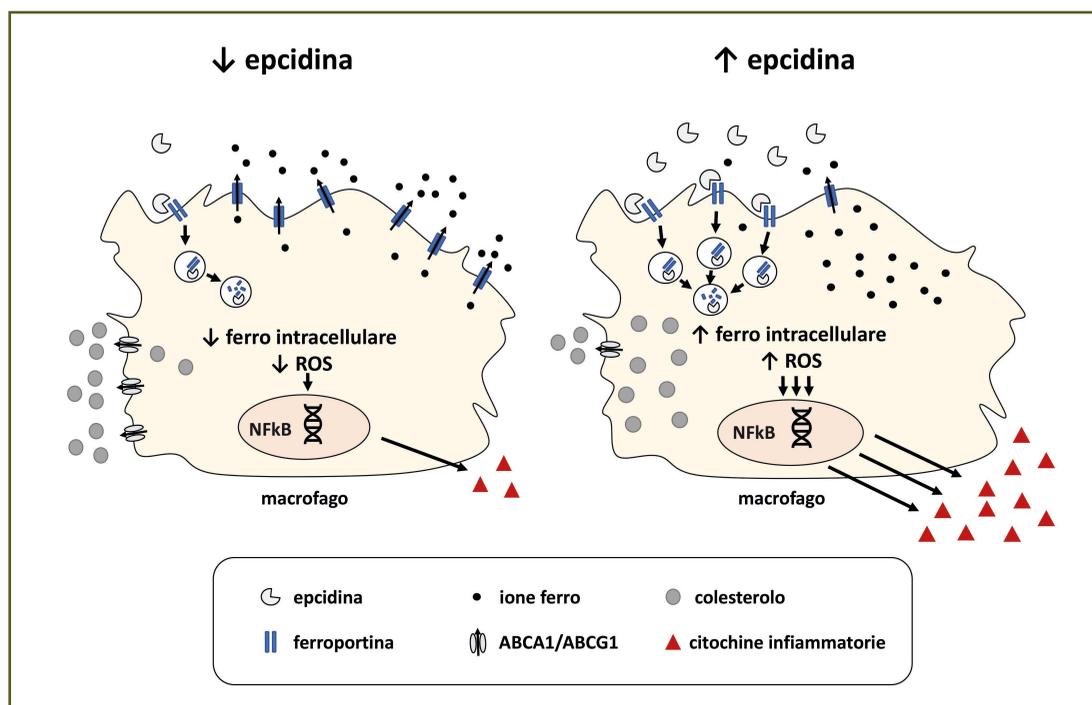


Figura 4 - Effetto dell'epcidina sul fenotipo dei macrofagi nell'aterosclerosi. L'epcidina induce la degradazione della ferroportina, inducendo l'accumulo di ferro all'interno dei macrofagi. L'eccesso di ferro intracellulare comporta un accumulo di LDL ossidate attraverso recettori *scavenger*, ad una riduzione dell'efflusso di colesterolo, ad un accumulo intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ad un aumento del *signaling* pro-infiammatorio, favorendo la trasformazione del macrofago in cellula schiumosa e la progressione della placca aterosclerotica. Quando i livelli di epcidina sono bassi, il ferro è efficacemente trasportato fuori dal macrofago dalla ferroportina. La riduzione della concentrazione intracellulare di ferro sopprime l'*uptake* del colesterolo, favorisce l'efflusso di colesterolo attraverso i trasportatori ABCA1 e ABCG1, riducendo il *signaling* infiammatorio e la produzione di ROS

La via di segnalazione delle BMP è il più importante meccanismo di induzione dell'espressione del gene dell'epcidina ed è direttamente influenzato dal contenuto di ferro corporeo. In studi condotti in topi knock-out per il gene dell'Apolipoproteina E, l'inibizione farmacologica del recettore per le BMP di tipo I (BMPRI) attraverso la dorsomorfina o un suo derivato di sintesi LDN-193189 ha portato ad una diminuzione del ferro intracellulare macrofagico; a ciò è conseguito un calo della produzione di ROS e citochine infiammatorie oltre che un rallentamento della progressione della malattia aterosclerotica (44). Negli stessi studi è stata osservata una netta riduzione della calcificazione della tonaca vascolare media e del contenuto in colesterolo delle cellule schiumose e dei macrofagi per effetto di un aumentato efflusso di colesterolo (47, 48).

Un ulteriore studio volto a caratterizzare gli effetti del deficit di epcidina sul processo aterosclerotico è stato condotto in modelli di topo knock-out per *LDLR* e *hamp* (*Ldlr*^{-/-}, *hamp*^{-/-}). In questi topi, l'elevata espressione della ferroportina a livello della superficie macrofagica si è associata a ridotto sviluppo di aterosclerosi, ancora una volta dimostrando come la riduzione del ferro intracellulare nei macrofagi possa rappresentare un valido meccanismo anti-aterosclerotico (45).

I risultati di alcuni studi condotti in topi knock-out per il gene dell'apolipoproteina E, portatori in eterozigosi di una mutazione del gene della ferroportina (*ApoE*^{-/-}, *FPN* WT/C326S), che ne impedisce il legame con l'epcidina e la successiva degradazione sono invece controversi. In questo modello, la maggior espressione della ferroportina e quindi la minor quota di ferro intra-macrofagico non ha protetto l'animale da esperimento dallo sviluppo e dalla progressione dell'aterosclerosi, contraddi-

ciendo i risultati ottenuti negli studi sul blocco farmacologico dell'epcidina. Una spiegazione di questa osservazione può risiedere nel fatto che nei topi con mutazione in eterozigosi della ferroportina è ri-

Glossario

- ApoE:** apolipoproteina E
- BMP/SMAD:** complesso di proteine/enzimi coinvolti nel signaling intracellulare
- BMP:** proteina morfogenica dell'osso
- DCYTB:** citocromo duodenale B
- DMT1:** trasportatore dei metalli bivalenti 1
- E-selectina:** proteina di adesione espressa sulle cellule endoteliali
- FPN:** ferroportina
- hamp*:** hepcidin antimicrobial peptide, gene codificante per l'epcidina
- hfe*:** high Fe²⁺ gene, gene codificante una proteina coinvolta nella regolazione dell'epcidina
- HIF-1:** fattore indotto dall'ipossia
- HMOX1:** eme ossigenasi 1
- ICAM-1:** molecola di adesione intercellulare 1
- JAK/STAT:** Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription protein, chinasi responsabili di signaling intracellulare
- LDL:** lipoproteine a bassa densità
- LDL-R:** recettore delle lipoproteine a bassa densità
- LIP:** pool labile del ferro intracellulare
- Mhaem:** macrofagi associati all'emorragia
- MMP-1-3-9:** metalloproteinasi
- NF-κB:** fattore di trascrizione nucleare
- NRAMP1:** proteina dei macrofagi associata alla resistenza naturale
- OxLDL:** lipoproteine ad alta densità ossidate
- PHD:** HIF prolil idrossilasi
- ROS:** specie reattive dell'ossigeno
- STEAP3:** metalloreduttasi
- TFR1:** recettore della transferrina tipo 1
- TIBC:** capacità totale di ferro legato con la transferrina
- TLR-4:** Toll like receptor 4
- VCAM-1:** Vascular Cell Adhesion Molecule 1, molecola di adesione vascolare
- VEGF:** fattore di crescita dell'endotelio vascolare
- VHL:** fattore di Von Hippel Lindau

scontrabile comunque una piccola quota di ferro intracellulare nei macrofagi; inoltre, rispetto ai topi LDLR knock-out, nei topi con deficit dell'Apolipoproteina E il rischio di sviluppo di ateromasia risulta più spiccato, sovrastando pertanto gli effetti della mutazione in eterozigosi del gene della ferroportina (46, 47).

Dai risultati degli studi presentati consegue che un possibile approccio terapeutico anti-aterosclerotico potrebbe prevedere l'inibizione delle funzioni dell'epcidina, al fine di promuovere la riduzione del ferro intracellulare dei macrofagi e la loro polarizzazione verso un fenotipo anti-infiammatorio ed anti-aterosclerotico. Tuttavia, anche questa modalità di intervento potrebbe presentare alcuni limiti:

- 1) bloccare l'espressione del gene dell'epcidina mediante la via delle BMP potrebbe generare alterazioni in altri sistemi e tessuti in cui queste stesse proteine sono espresse (es. tessuto osseo);
- 2) l'epcidina sembrerebbe svolgere ruoli diversi nelle diverse tappe del processo aterosclerotico, pertanto gli effetti della sua inibizione potrebbero variare in funzione del fatto che il blocco della stessa sia esercitato in una fase precoce piuttosto che avanzata della malattia.

L'inibizione dell'epcidina potrebbe risultare di maggiore utilità nelle fasi iniziali del processo aterogenetico, andando a limitare l'attivazione della cascata infiammatoria mediata da radicali liberi dell'ossigeno e dall'ossidazione delle LDL, nonché la polarizzazione macrofagica verso un fenotipo pro-infiammatorio.

Nelle fasi più avanzate invece, la deplezione del ferro intracellulare a livello dei macrofagi, in particolar modo di quelli con fenotipo M(Hb), potrebbe favorire l'attivazione del fattore HIF-1 α con aumento della produzione di fattori pro-angiogenetici (29-37).

Conclusioni

Esiste una chiara relazione tra metabolismo del ferro e sviluppo del processo aterosclerotico. La conoscenza più approfondita dei meccanismi che regolano l'omeostasi marziale ha messo in discussione la visione classica, secondo la quale il ferro favorisce l'accelerata progressione dell'aterosclerosi attraverso la perossidazione lipidica. Studi condotti su pazienti affetti da malattie da accumulo di ferro, come l'emocromatosi ereditaria, nei quali il sovraccarico di ferro si associa ad una limitata progressione dell'aterosclerosi, hanno infatti evidenziato uno scenario più complesso. I macrofagi svolgono un ruolo fondamentale nella relazione tra metabolismo del ferro e sviluppo dell'aterosclerosi. Le modificazioni del metabolismo del ferro all'interno dei macrofagi possono alterare la loro risposta infiammatoria, favorendo l'accumulo lipidico e promuovendo la progressione delle lesioni aterosclerotiche. L'epcidina, ormone chiave della regolazione dell'omeostasi del ferro, è in grado di favorire l'accumulo di ferro all'interno dei macrofagi e la loro polarizzazione in senso pro-infiammatorio all'interno della placca. L'inibizione dell'azione dell'epcidina potrebbe fornire uno strumento terapeutico al fine di modulare la risposta infiammatoria caratteristica della progressione dell'aterosclerosi. Tuttavia, non è ancora chiaro quale sia il ruolo dell'epcidina nelle fasi più avanzate dell'aterosclerosi, durante le quali potrebbe avere un effetto protettivo, legato all'inibizione della neoangiogenesi a livello della placca, favorendo la polarizzazione dei macrofagi verso la forma M(Hb), deputata alla clearance dell'eme. Una più approfondita conoscenza del ruolo dei macrofagi M(Hb) sarà necessaria per comprendere a pieno i processi di destabilizzazione e calcificazione della placca aterosclerotica.

Saranno necessarie ulteriori indagini per definire meglio il potenziale terapeutico e i possibili effetti su altri tessuti ed apparati della modulazione dell'azione

dell'epcidina, al fine di considerarne un possibile impiego nella prevenzione delle patologie cardiovascolari aterosclerotiche.

RIASSUNTO

Le prime ipotesi riguardanti la correlazione tra il metabolismo del ferro e lo sviluppo dell'aterosclerosi sono state avanzate oltre 25 anni fa nella cosiddetta "iron hypothesis". Gli Autori hanno ipotizzato che un'elevata quota di ferro corporeo potesse aumentare il rischio cardiovascolare favorendo il processo aterosclerotico. A conferma di tale ipotesi, è stato osservato che uno stato di deplezione o di lieve deficienza di ferro esercitava effetti anti-aterosclerotici. Il ferro elementare rappresenta un potente catalizzatore dello stress ossidativo *in vivo* in grado di promuovere e perpetuare lo stato infiammatorio. Poiché l'aterosclerosi è notoriamente caratterizzata da una iperattivazione dei processi ossidativi ed infiammatori, si è ritenuto che l'accumulo marziale potesse, almeno in parte, contribuire a tali fenomeni, promuovendo di conseguenza la progressione della malattia aterosclerotica. Tuttavia, studi condotti in pazienti affetti da emocromatosi, disordine caratterizzato da un sovraccarico sistemico di ferro, hanno prodotto risultati contrastanti con quanto finora suggerito; infatti, questi pazienti sembrerebbero essere protetti dallo sviluppo di placche aterosclerotiche. Il paradosso che si è venuto a generare sembra essere spiegato in certa misura dalla variabile distribuzione del ferro intracellulare all'interno dei macrofagi, una delle cellule protagoniste del processo aterogenetico. In particolare, si ritiene che la variabile espressione di epcidina, ormone principe della regolazione dell'omeostasi del ferro, giochi un ruolo determinante nella distribuzione del ferro nei diversi tipi cellulari e nella predisposizione al danno aterosclerotico. Alla luce di queste ed altre evidenze, sembra che la modulazione dell'espressione di epcidina possa rappresentare una nuova strategia terapeutica finalizzata a regolare il metabolismo del ferro in senso anti-aterosclerotico.

Parole chiave: *Ferro, Aterosclerosi, Epcidina, LDL ossidate, Macrofagi.*

Bibliografia

- Wallace DF. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin Biochem Rev.* 2016; 37: 51-62.
- Shah YM, Matsubara T, Ito S, et al. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab.* 2009; 9: 152-164.
- Taylor M, Qu A, Anderson ER, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology.* 2011; 140: 2044-2055.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2045-2051.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-126.
- Wang L, Harrington L, Trebicka E, et al. Selective modulation of TLR4-activated inflammatory responses by altered iron homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119: 3322-3328.
- Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet.* 1981; 1: 1293-1294.
- Bagheri B, Shokrzadeh M, Mokhberi V, et al. Association between serum iron and the severity of coronary artery disease. *Int Cardiovasc Res J.* 2013; 7: 95-98.
- Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, et al. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation.* 1992; 86: 803-811.
- Gill D, Del Greco MF, Walker AP, et al. The effect of Iron status on risk of coronary artery disease: a mendelian randomization study brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Bio.* 2017; 17: 1788-1792.
- Zacharski LR, Chow BK, Howes PS, et al. Reduction of iron stores and cardiovascular outcomes in patients with peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007; 297: 603-610.
- Munoz-Bravo C, Gutierrez-Bedmar M, Gomez-Aracena J, et al. Iron: protector or risk factor for

- cardiovascular disease? Still controversial. *Nutrients*. 2013; 5: 2384-2404.
13. Kim KS, Son HG, Hong NS, et al. Associations of serum ferritin and transferrin % saturation with all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality: Third National Health and Nutrition Examination Survey follow-up study. *J Prev Med Publ Health*. 2012; 45: 196-203.
 14. Kraml P. The Role of Iron in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Physiol Res*. 2017; 66 (Suppl. 1): S55-S67.
 15. Ehara S, Ueda M, Naruko T, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 103: 1930-1932.
 16. Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M. Iron induces lipid peroxidation in cultured macrophages, increases their ability to oxidatively modify LDL, and affects their secretory properties. *Atherosclerosis*. 1994; 111: 65-78.
 17. Satchell L, Leake DS. Oxidation of low-density lipoprotein by iron at lysosomal pH: implications for atherosclerosis. *Biochemistry*. 2012; 51: 3767-3775.
 18. Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, et al. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009; 50 (Suppl.): S364-S369.
 19. Butcher MJ, Galkina EV. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Front Physiol*. 2012; 3: 44.
 20. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 1506-1516.
 21. Medbury HJ, James V, Ngo J, et al. Differing association of macrophage subsets with atherosclerotic plaque stability. *Int Angiol*. 2013; 32: 74-84.
 22. Recalcati S, Locati M, Marini A, et al. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol*. 2010; 40: 824-835.
 23. Yuan X, Cong Y, Hao J, et al. Regulation of LIP level and ROS formation through interaction of H-ferritin with G-CSF receptor. *J Mol Biol*. 2004; 339: 131-144.
 24. Yuan XM, Anders WL, Olsson AG, et al. Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis*. 1996; 124: 61-73.
 25. Guo L, Akahori H, Harari E, et al. CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2018; 128: 1106-1124.
 26. Klingler KR, Zech D, Wielckens K. Haemochromatosis: automated detection of the two point mutations in the HFE gene: Cys282Tyr and His63Asp. *Clin Chem Lab Med*. 2000; 38: 1225-1230.
 27. Sullivan JL. Do hemochromatosis mutations protect against iron-mediated atherogenesis? *Circ Cardiovasc Genet*. 2009; 2: 652-657.
 28. Valenti L, Dongiovanni P, Motta BM, et al. Serum hepcidin and macrophage iron correlate with MCP-1 release and vascular damage in patients with metabolic syndrome alterations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 683-690.
 29. Cornelissen A, Guo, Sakamoto A, et al. New insights into the role of iron in inflammation and atherosclerosis. *EBioMedicine*. 2019; 47: 598-606.
 30. Gill D, Del Greco MF, Walker AP, et al. The effect of Iron status on risk of coronary artery disease: a Mendelian randomization study-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37: 1788-1792.
 31. Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*. 2000; 480: 147-150.
 32. Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, A urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7806-7810.
 33. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004; 306: 2090-2093.
 34. Wang CY, Babitt JL. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Curr Opin Hematol*. 2016; 23: 189-197.
 35. Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, et al. A red carpet for iron metabolism. *Cell*. 2017; 168: 344-361.
 36. Fleming RE, Sly WS. Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 8160-8162.
 37. Wunderer F, Traeger L, Sigurslid HH, et al. The role of hepcidin and iron homeostasis in atherosclerosis. *Pharmacol Res*. 2020; 153: 104664.
 38. Lewis GD, Malhotra R, Hernandez AF, et al. Effect of oral Iron repletion on exercise capacity in patients with heart failure with reduced ejection fraction and Iron deficiency: the IRONOUT HF randomized clinical trial. *JAMA*. 2017; 317: 1958-1966.
 39. Santos-Silva A, Ribeiro S, Reis F, et al. Hepcidin in chronic kidney disease anemia. *Vitam Horm*. 2019; 110: 243-264.
 40. Zimmermann A, Zimmermann T, Schattenberg J, et al. Alterations in lipid, carbohydrate and

- iron metabolism in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and metabolic syndrome. *Eur J Intern Med.* 2011; 22: 305-310.
41. Senates E, Yilmaz Y, Colak Y, et al. Serum levels of hepcidin in patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease. *Metab Syndr Relat Disord.* 2011; 9: 287-290.
 42. Abdel-Khalek MA, El-Barbary AM, Essa SA, et al. Serum hepcidin: a direct link between anemia of inflammation and coronary artery atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011; 38: 2153-2159.
 43. Malhotra R, Wunderer F, Barnes HJ, et al. Hepcidin deficiency protects against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39: 178-187.
 44. Saeed O, Otsuka F, Polavarapu R, et al. Pharmacological suppression of hepcidin increases macrophage cholesterol efflux and reduces foam cell formation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 299-307.
 45. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res.* 2010; 107: 485-494.
 46. Getz GS, Reardon CA. Do the Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36: 1734-1741.
 47. Baitsch D, Bock HH, Engel T, et al. Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 1160-1168.