



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Tesi di dottorato in Metodologia clinica

STUDIO DEL PROFILO CARDIO-VASCOLARE IN PAZIENTI CON
ANGIOEDEMA DA CARENZA DI C1 INIBITORE: RELAZIONI TRA
IL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO E LA VASO-REATTIVITA'

Tesi di Dottorato di:

Francesco Casella

Matr. n°R07582

Relatore: Chiar.mo Prof. Marco Cicardi

Correlatore: Chiar.mo Prof. Nicola Montano

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

Introduzione	pag 3
Angioedema da carenza di C1 inibitore.....	3
Angioedema ereditario: eziologia e patogenesi.....	4
Angioedema ereditario: quadro clinico.....	7
Angioedema ereditario: diagnosi.....	8
Angioedema ereditario: terapia dell'attacco acuto.....	9
Angioedema ereditario: prevenzione dell'attacco acuto.....	10
Angioedema acquisito.....	11
Angioedema non associato a carenza di C1 inibitore.....	11
Il sistema nervoso vegetativo.....	12
Metodi di analisi del sistema nervoso vegetativo.....	13
Il sistema nervoso vegetativo e la vasopermeabilità.....	16
Obiettivo dello studio	18
Pazienti e metodi	19
Risultati	24
Discussione	26
Tabelle e figure	29
Bibliografia	36

INTRODUZIONE

Angioedema da carenza di C1 inibitore

L'angioedema da carenza di C1 inibitore (C1 INH) è una patologia caratterizzata da episodi ricorrenti di angioedema coinvolgenti il tessuto sottocutaneo, la mucosa delle vie aeree superiori e del tratto gastroenterico. Il deficit di C1 inibitore può essere ereditario o acquisito [1].

Nella letteratura scientifica le prime descrizioni della malattia si hanno a partire dalla seconda metà dell'800. Una forma particolare di edemi cutanei tipo orticaria gigante, non dolenti né arrossati né pruriginosi viene descritta per la prima volta da John Laws Milton nel 1876 [2]. Tale forma interessa pazienti spesso giovani e sani e va generalmente incontro a risoluzione spontanea. Il quadro clinico tipico dell'AEE viene descritto per primo da Heinrich Quincke nel 1882 [3]. Egli riconosce un'entità nosologica autonoma che chiama edema cutaneo acuto circoscritto, in cui gli edemi della cute possono associarsi anche ad edemi dello stomaco, dell'intestino e delle vie aeree superiori. Tale malattia si presenta episodicamente e viene trasmessa per via ereditaria. Inoltre nella sua descrizione, riferendosi alla possibile eziologia, Quincke usa il termine di angioneurotico, che verrà poi in seguito usato per descrivere questa specifica patologia. Quincke, infatti, ipotizza che l'edema cutaneo sia dovuto ad una angioneurosi, *“un'alterazione di carattere nervoso della parete vascolare per quanto riguarda la sua capacità di sudorazione, per cui il processo è più simile ad una infiammazione.”* Nel 1888 William Osler [4] descrive per la prima volta in modo completo le caratteristiche cliniche dell'AEE. Osler riporta il caso di una famiglia colpita da AEE da cinque generazioni, definisce le caratteristiche principali

dell'interessamento cutaneo, addominale e laringeo della patologia, e riporta anche alcuni casi di morte improvvisa dovuta ad edema della glottide. Nel 1957 D.C. Heiner [5], descrivendo tre pazienti con manifestazioni riferibili ad AEE ipotizza che alla base di tale patologia vi sia un'alterazione del sistema autonomico. Nel 1960 Pensky et. al [6] isolano, mediante metodiche cromatografiche, l'inibitore della C1 esterasi. Quasi contemporaneamente Landerman [7] dimostra la presenza di un'importante alterazione della vasopermeabilità in un paziente affetto da AEE, dovuta ad un deficit di inibitore della callicreina plasmatica.

Angioedema ereditario: eziologia e patogenesi

L'angioedema ereditario (AEE) è una malattia dovuta a mutazioni nel gene di C1 INH localizzato sul cromosoma 11 (11q12-q13.1) [8], che si trasmette con carattere autosomico dominante a penetranza completa [9]. Si stima che la prevalenza della malattia sia 1/50.000 [10], senza apprezzabili differenze tra maschi e femmine.

Esistono due sottotipi di angioedema ereditario da carenza di C1 inibitore:

- Il primo tipo è caratterizzato da bassi livelli di C1 inibitore. I livelli antigenici e funzionali di C1 inibitore sono entrambi bassi, spesso inferiori al 30% dei livelli normali.
- Il secondo tipo è caratterizzato da alterazione di funzione di C1 inibitore che si presenta in normali o aumentati livelli.

Esiste inoltre una forma denominata angioedema di tipo III [11] caratterizzata da livelli antigenici e funzionali di C1 INH nella norma. L'eziologia di questa forma rimane non chiara. In alcuni casi sono state identificate mutazioni nel fattore XII [12]. Clinicamente questa forma sembra differenziarsi per la presenza di un frequente interessamento del volto e della lingua, e per una comparsa in età adulta.

Sono state descritte circa 120 mutazioni del gene di C1 INH [13] che possono rappresentare mutazioni puntiformi che comportano la sostituzione/delezione/inserzione di un singolo nucleotide o estese mutazioni che interessano parti estese del gene e rappresentano il restante 15%.

In caso di familiarità negativa si deve ipotizzare che si tratti di una mutazione *de novo* (25% dei casi), oppure di una forma di angioedema acquisito (AEA).

L'inibitore della C1 esterasi (C1 INH) è una α_2 -globulina il cui peso molecolare è di 105 KD, appartenente alla famiglia degli inibitori delle serina-proteasi. Viene sintetizzato prevalentemente dagli epatociti, oltre ad essere prodotto in misura minore anche dai monociti del sangue periferico. Nel caso dell'AEE le mutazioni possono alterare la normale sintesi proteica a tutti i livelli; da un blocco della trascrizione con impossibilità di formazione dello specifico messaggero ad alterazioni che consentono la sintesi e la secrezione di un prodotto proteico che risulta però funzionalmente alterato, tipiche dell'AEE tipo 2.

Le funzioni inibitorie del C1 inibitore sono molteplici [14]. Nel sistema del complemento inibisce C1r e C1s attivati causandone la dissociazione da C1. Esercita inoltre la sua attività sul sistema di contatto (quello maggiormente implicato negli episodi acuti di angioedema) attraverso il controllo del fattore XII della coagulazione e della callicreina [15]. Da non trascurare gli effetti sul sistema della coagulazione mediante inibizione della amplificazione della cascata coagulativa dei fattori IX e XI [16] e sul sistema della fibrinolisi attraverso la sua attività sul tPA e sulla plasmina [17]. (figura 1)

Benché il deficit di C1 INH sia costante e invariato per tutta la vita, gli attacchi sono episodici e scatenati nella maggior parte dei casi da microtraumi e in una percentuale minore da eventi stressanti, infezioni, esposizione al freddo e modificazioni dell'assetto ormonale. Alcuni pazienti rimangono asintomatici per tutta la loro esistenza. Il deficit di

C1 INH è pertanto una condizione necessaria ma non sufficiente alla formazione di angioedema [18].

Il sistema maggiormente implicato negli episodi acuti di angioedema è il sistema del contatto. La mancata inibizione di fattore XII e callicreina da parte del C1 inibitore provoca aumentata attività del chininogeno ad alto peso molecolare (HK) con conseguente aumentata produzione di bradichinina. La bradichinina, considerata il principale mediatore dei sintomi dell'angioedema [19], ha una potente azione vasodilatatrice ed aumenta la permeabilità vasale, provocando la comparsa di edemi, localizzati nei tessuti sottocutanei e sottomucosi di differenti distretti corporei.

Le ridotte quantità di C1 INH presenti nei soggetti con HAE consentono il controllo del sistema di contatto in condizioni «normali», non in condizioni di richiesta aumentata come in occasione di microtraumi che rappresentano spesso eventi scatenanti degli episodi di angioedema.

L'insufficiente azione di C1-INH sul sistema del complemento determina una aumentata autoattivazione di C1, strettamente dipendente dai valori di C1-INH funzionale di ogni singolo paziente. Tipicamente pazienti con AEE presentano bassi valori di C4 e C2, con valori normali di C3.

Il ruolo di C1-INH sul sistema della coagulazione, un tempo ritenuto assai rilevante, è stato di recente dimostrato essere di limitata importanza, consistendo unicamente nell'inibizione dell'amplificazione della cascata coagulativa a livello dei fattori IX e XIa.

L'inibizione operata da C1 INH su plasmina e tPA in vitro ed in vivo è debole. Anche se durante gli attacchi acuti è possibile misurare una significativa formazione di plasmina attraverso la misurazione dei complessi plasmina – α_2 antiplasmina, l'ipotesi più accreditata è che essa derivi dall'attivazione del fattore XII e non dal tPA. Studi in vitro

hanno dimostrato che la plasmina è in grado di potenziare la generazione di bradichinina, partendo dal chininogeno ad alto peso molecolare [20].

Angioedema ereditario: quadro clinico

L'età di esordio degli episodi acuti di angioedema è variabile; nella maggior parte dei casi la patologia si manifesta entro la seconda decade di vita.

La frequenza e la gravità degli attacchi di angioedema è variabile anche tra gli individui di uno stesso nucleo familiare che condividono la stessa mutazione puntiforme. Non sono ancora chiari i meccanismi che determinano una maggior frequenza e gravità delle riacutizzazioni.

I distretti colpiti dagli episodi di angioedema sono quello cutaneo, le vie aeree superiori e il tratto gastroenterico. Gli attacchi possono coinvolgere solo un distretto o esordire in un distretto per diffondersi negli altri. I sintomi regrediscono spontaneamente entro 2-4 giorni e possono essere preceduti da prodromi rappresentati da astenia o manifestazioni cutanee.

Le manifestazioni cutanee di angioedema colpiscono prevalentemente il volto, le estremità e i genitali; i sintomi regrediscono generalmente nell'arco di 72 ore ma possono durare più a lungo se vi è diffusione da un distretto ad un altro.

Le manifestazioni gastroenteriche dell'angioedema sono rappresentate da dolori addominali, nausea, vomito e diarrea [21] e sono espressione dell'edema della parete intestinale. In una rilevante percentuale di casi la sintomatologia addominale, che si risolve generalmente in 48 ore, è così intensa da simulare un quadro obiettivo di addome acuto. L'ecografia addominale o la TAC possono documentare la presenza di edema della parete intestinale o versamento peritoneale.

La manifestazione clinica più rischiosa per il paziente è rappresentata dall'edema laringeo. Si manifesta in più della metà dei pazienti con angioedema ereditario nell'arco dell'intera

esistenza con sintomi come disfagia, disfonia e dispnea; l'evenienza più grave è rappresentata dall'ostruzione completa della glottide che determina decesso per asfissia se non opportunamente trattata [22].

Angioedema ereditario: diagnosi

Un approccio diagnostico al paziente con sospetto angioedema ereditario emerge da un recente Consensus del 2010 [23].

Lo screening alla ricerca di anomalie del C1 inibitore è indicato in soggetti che presentino una delle seguenti caratteristiche:

- angioedema ricorrente senza orticaria
- episodi ricorrente di dolore addominale di tipo colico di origine non determinata
- familiarità di angioedema
- singolo episodio di edema laringeo
- bassi valori di C4 in presenza di sintomi compatibili con angioedema

I primi esami di screening di deficit di C1 inibitore sono dosaggio di C4, livello antigenico di C1 inibitore, livello funzionale di C1 inibitore. Tali esami dovrebbero essere eseguiti in assenza di trattamento concomitante; per la diagnosi di angioedema ereditario servono comunque gli stessi esami di conferma eseguiti almeno ad un mese di distanza dai primi.

Nel caso di riduzione di C4 e ridotto livello antigenico di C1 inibitore le diagnosi possibili sono angioedema ereditario di I tipo o angioedema acquisito. La presenza di familiarità per angioedema, l'età all'insorgenza dei sintomi inferiori a 40 anni ed eventualmente la presenza di valori normali di C1q indirizzano verso una diagnosi di angioedema ereditario

Nel caso di normale livello antigenico di C1 inibitore ma basso livello funzionale e riduzione di C4 la diagnosi è verosimilmente quella di angioedema ereditario di tipo II.

Nel caso di riduzione di C4 e normale livello antigenico e funzionale di C1 inibitore vanno considerate le possibili cause di consumo di C4 come malattie autoimmuni o una deficienza di C4

Nel caso di normale valore di C4 e normale livello antigenico e funzionale di C1 inibitore in presenza di sintomi compatibili con episodi acuti di angioedema, tali determinazioni devono essere ripetute in corso di attacco. Se persiste la normalità anche durante attacco la diagnosi è circoscritta ad angioedema ereditario di tipo III (in presenza di familiarità) o angioedema da farmaci o di origine non determinata (in assenza di familiarità).

Angioedema ereditario: terapia dell'attacco acuto

La terapia dell'attacco acuto di angioedema dipende dal distretto coinvolto e dalla gravità dei sintomi.

Nei pazienti con edema laringeo e manifestazioni gastroenteriche e cutanee particolarmente severe la terapia di primo livello comprende uno dei seguenti farmaci:

- C1 inibitore umano: viene somministrato per via endovenosa al dosaggio di 20 U/kg e infuso in 10 minuti. La dose è ripetibile dopo due ore se non si ottiene miglioramento della sintomatologia
- Inibitore della callicreina (Ecallantide): viene somministrata per via sottocutanea in 3 iniezioni separate da 10 mg in tre regioni distinte. La dose è ripetibile dopo un'ora. Effetti collaterali relativamente frequenti sono reazioni allergiche e anafilassi
- Antagonista del recettore B2 della bradichinina (Icatibant): viene somministrata per via sottocutanea al dosaggio di 30 mg

Se non sono disponibili tali farmaci occorre utilizzare plasma fresco congelato alla dose iniziale di 2 unità nei pazienti con edema laringeo e manifestazioni gastroenteriche gravi [24].

Nei pazienti con coinvolgimento laringeo determinante distress respiratorio la priorità è la protezione delle vie aeree in attesa del miglioramento della sintomatologia legata alla terapia farmacologica.

Nei pazienti con manifestazioni cutanee e gastroenteriche lievi può essere somministrata la sola terapia sintomatica.

In un recente Consensus del 2010 [23] si evidenzia la non indicazione a terapie spesso utilizzate per il trattamento dell'angioedema come antifibrinolitici, adrenalina, steroidi e antistaminici.

Angioedema ereditario: prevenzione dell'attacco acuto

La prevenzione degli attacchi acuti di angioedema si attua con misure comportamentali e profilassi farmacologica.

Tra le misure comportamentali occorre evitare stimoli che possano scatenare l'attacco acuto (traumi, assunzione di farmaci come ace-inibitori e estrogeni)

Una profilassi a breve termine è indicata se il paziente deve essere sottoposto a interventi di chirurgia dentaria o chirurgia generale. Farmaco indicato è il C1 inibitore da 1 a 6 ore prima della procedura; se non disponibile C1 inibitore può essere somministrata profilassi con androgeni (Danazolo).

Una profilassi a lungo termine è indicata in pazienti con più di un attacco severo di angioedema al mese o con una qualità di vita condizionata dalla frequenza degli attacchi. Farmaci da usare per la profilassi a lungo termine sono antifibrinolitici e androgeni; se la frequenza degli attacchi non si riduce si ricorre a regolari infusioni di C1 inibitore.

Angioedema acquisito

L'angioedema acquisito è una condizione ancora più rara dell'angioedema ereditario ed è caratterizzata dal consumo del C1 INH e dall'iperattivazione della via classica del complemento. Responsabili del consumo di C1 INH possono essere patologie associate (soprattutto linfoproliferative) e/o autoanticorpi contro questa proteina. La presentazione clinica è simile a quella dell'angioedema ereditario ma elementi caratteristici sono l'assenza di storia familiare, la tardiva comparsa di sintomi (generalmente dopo la quarta decade di vita) e la diversa risposta ai trattamenti [25].

Angioedema non associato a carenza di C1 inibitore

Alcune forme di angioedema non sono associate a carenza di C1 inibitore [26]:

- angioedema legato all'assunzione di farmaci, in particolare gli ACE inibitori, estrogeni e FANS
- reazioni IgE mediate o diretto rilascio di mediatori mastocitari
- angioedema associato ad altra malattia (generalmente infettiva o autoimmune)
- angioedema idiopatico
- angioedema ereditario di tipo III

Il sistema nervoso vegetativo

Il sistema nervoso autonomo è un sistema sensitivo e motorio involontario, responsabile della regolazione dell'attività biologica degli organi interni che agisce mantenendo nel tempo entro limiti fisiologici parametri quali pressione arteriosa, gittata cardiaca, respirazione, temperatura corporea, equilibrio acido-base, volume, e osmolalità dei liquidi.

Nel sistema nervoso autonomo si distinguono le sezioni ortosimpatica e parasimpatica che innervano la muscolatura liscia cardiaca, dei vasi, ghiandolare, gastroenterica e genitourinaria.

Alcuni organi sono innervati sia entrambi i sistemi che spesso hanno un'azione antagonista come nel caso della frequenza cardiaca; altri organi sono innervati da uno solo dei due sistemi.

La regolazione autonoma della funzione cardiovascolare è determinata dalle interazioni delle componenti vagale e simpatica. Nella gran parte delle situazioni fisiologiche l'attivazione di una di queste, simpatica oppure vagale, si accompagna all'inibizione dell'altra, suggerendo il concetto di bilancia simpato – vagale. Tale bilancia oscilla da stati di predominanza vagale a stati di predominanza simpatica, come in occasione di stress fisici oppure emozionali, nei quali meccanismi eccitatori centrali, a loro volta rinforzati da riflessi periferici a feedback positivo, agiscono stimolando la performance cardiovascolare. [27] (figura 2).

Un campo solo recentemente e parzialmente indagato è quello rappresentato dalle interazioni tra il sistema autonomo ed il sistema immune [28]. Il sistema autonomo può monitorare lo stato immunitario e l'eventuale presenza di infiammazione sistemica attraverso due vie. Una via cosiddetta neurale si basa sia sulla presenza di fibre vagali sensoriali afferenti stimulate dal rilascio di citochine infiammatorie, sia su chemocettori localizzati nei gangli vagali. La via umorale, invece, presenta meccanismi solo in parte

compresi: in alcuni casi si può avere passaggio di citochine proinfiammatorie attraverso la barriera ematoencefalica, in altri un legame specifico a recettori a livello dei capillari cerebrali, oppure un passaggio a livello di formazioni circumventricolari come l'area postrema.

Il sistema nervoso esercita imponenti effetti modulatori sulla funzione immunitaria mediante l'attivazione dell'asse ipotalamo ipofisi surrene e del sistema nervoso simpatico, che a sua volta determina aumentata sintesi e rilascio di glucocorticoidi e di catecolamine. Sono inoltre importanti anche i ruoli giocati dall' α MSH e dagli estrogeni. L'acetilcolina liberata dal sistema vagale presenta importanti e solo parzialmente comprese capacità antinfiammatorie, antagonizzando in vitro ed in vivo la flogosi prodotta da citochine come $TNF\alpha$, suggerendo un importante ruolo del sistema parasimpatico nella regolazione della risposta flogistica (si parla di "vie colinergiche antinfiammatorie") (figura 3).

Metodi di analisi del sistema nervoso vegetativo

L'Heart Rate Variability (HRV) [29,30] rappresenta l'insieme delle oscillazioni del battito cardiaco, e viene utilizzata al fine di studiare la regolazione cardiovascolare da parte del sistema autonomico. È possibile effettuare una misurazione accurata dell'HRV attraverso un'analisi nel dominio del tempo, basata sullo studio dei valori assoluti di frequenza cardiaca e di pressione arteriosa, tuttavia tale metodica non fornisce alcun tipo di informazione relativa alla struttura temporale oppure alla periodicità degli eventi in studio. Uno dei metodi più utilizzati ormai da anni per valutare la modulazione autonoma del sistema cardiovascolare, è l'analisi nel dominio della frequenza, che permette di rappresentare il segnale come la somma di componenti sinusoidali di differente ampiezza, frequenza e lunghezza, attraverso l'utilizzo di funzioni quali la trasformata rapida di

Fourier oppure attraverso modelli autoregressivi [31]. L'analisi spettrale, introdotta nel 1981 da Akselrod [30], rappresenta uno strumento non invasivo di analisi nel dominio della frequenza della regolazione simpato – vagale sulla funzione cardiovascolare. Attraverso l'analisi spettrale un segnale viene decomposto in una summa di oscillazioni che presentano frequenza ed ampiezza definite. (figure 4 e 5)

È ormai assodato che, in aggiunta al ciclo cardiaco, sono normalmente identificabili nel segnale elettrocardiografico diverse componenti oscillatorie principali, indice della modulazione ritmica cardiovascolare. Si identificheranno nello specifico tre diverse componenti (figura 6):

- **very low frequency (VLF)**, con frequenza centrale inferiore a 0.04 Hz nell'uomo: sembrano costituire l'insieme di variabili ad andamento molto lento, tra cui per esempio oscillazioni ormonali e ritmi circadiani
- **low frequency (LF)**: componente con frequenza centrale intorno a 0.10 Hz nell'uomo, da lungo tempo dimostrata essere un marker di modulazione simpatica.
- **high frequency (HF)**: componente oscillatoria ad alta frequenza, con frequenza centrale intorno a 0.27 Hz nell'uomo E' la componente sincrona con il respiro ed è indice di modulazione vagale.

Le tre componenti vengono valutate in termini di frequenza e di ampiezza, calcolata in base all'area sottesa alla curva di ogni componente oscillatoria.

Le componenti oscillatorie LF ed HF possono essere espresse in unità assolute (millisecondi quadrati), in unità normalizzate (un), oppure come rapporto LF/HF [32].

Possono essere calcolate come segue:

$LF/HF \text{ ratio} = LF \text{ assolute} / HF \text{ assolute}$
$LF \text{ in unità normalizzate} = LF \text{ assolute} / \text{potenza totale} - \text{potenza di VLF}$
$HF \text{ in unità normalizzate} = HF \text{ assolute} / \text{potenza totale} - \text{potenza di VLF}$

È possibile individuare modificazioni nella bilancia simpatovagale sia in condizioni fisiologiche che patologiche. In generale stati funzionali associati ad un aumento dell'attività simpatica sono caratterizzati da uno shift della bilancia LF-HF in favore della componente LF. L'opposto avviene nelle situazioni in cui si pensa ci sia una predominanza dell'attività vagale.

In ambito sperimentale, uno dei metodi più utilizzati per studiare il grado di attivazione simpatica di un soggetto è il tilt test, metodica basata sull'utilizzo di un lettino dotato di movimento idraulico che consente, attraverso l'induzione di uno "stress" controllato quale l'ortostasi passiva, di valutare la fisiologica attivazione del sistema simpatico e la conseguente adeguatezza della sua risposta nei soggetti sottoposti ad una variazione posturale.

Il tilt test ha permesso di dimostrare la fondamentale differenza tra condizioni di riposo e/o respiro controllato, caratterizzate da una prevalente attività vagale, e condizioni di ortostasi passiva, nelle quali l'iperattivazione simpatica associata ad una diminuzione della componente vagale diretta al nodo del seno determina l'insorgenza di tachicardia.

L'esame ha una specificità del 90% nell'identificare eventuali deficit a carico del Sistema Nervoso Autonomo [33], ed in passato è stato più volte applicato ad una serie di condizioni cliniche caratterizzate da disfunzioni autonome. Tra queste si possono ricordare patologie strettamente cardiovascolari quali ipertensione arteriosa essenziale [34] e scompenso cardiaco [35], ma anche patologie che esulano dalla sfera delle malattie cardiologiche, quali la sindrome delle apnee notturne [36], la colite ulcerosa [37], il morbo di Parkinson [38], la sindrome fibromialgica [39] e l'ipertiroidismo [40].

Relazioni tra il sistema nervoso autonomo e la vasopermeabilità

Durante un attacco acuto di angioedema da deficit di C1-INH si verifica un aumento della vasopermeabilità. Diversi studi in pazienti con angioedema ereditario hanno evidenziato che tale aumento si deve all'attivazione del sistema di contatto con liberazione di bradichinina, che rappresenta il principale mediatore dell'angioedema [41-45]. Inoltre, durante gli attacchi acuti di angioedema si ha anche attivazione del sistema della fibrinolisi, che porta alla generazione di plasmina capace, *in vitro*, di potenziare la generazione di bradichinina dal chininogeno ad alto peso molecolare. Infine è stato dimostrato che, durante gli attacchi acuti di angioedema, si ha, *in vitro*, un'attivazione della cascata della coagulazione, con conseguente generazione di trombina, che può a sua volta contribuire all'aumento di vasopermeabilità [46].

È noto che gli attacchi acuti di angioedema possono essere scatenati da microtraumi, stress, infezioni e, nelle donne, cambiamenti ormonali (ciclo mestruale, gravidanza, parto): tali fattori rappresentano importanti stress psico-fisici, e costituiscono una causa di attivazione del sistema nervoso autonomo in particolare nella sua componente ortosimpatica.

È noto che il sistema nervoso autonomo ricopre un ruolo importante nel meccanismo della infiammazione, sia attraverso la produzione da parte dei macrofagi di catecolamine che sostengono il processo infiammatorio esercitando un'azione paracrina sulle cellule della immunità [47], sia direttamente, stimolando o inibendo la produzione ed il rilascio in circolo di citochine pro-infiammatorie (IL1, IL6, TNF α) [48]. L'importanza delle interazioni tra il sistema nervoso ed immune negli ultimi anni ha acquisito nella letteratura un'importanza crescente.

Oggi numerosi studi mostrano come esista una fitta rete di interazioni bidirezionali tra cellule nervose ed immuni: da un lato la liberazione di citochine pro – infiammatorie può

portare al rilascio di glucocorticoidi attraverso l'attivazione del sistema ipotalamo ipofisario, dall'altro i glucocorticoidi favoriscono la soppressione del processo infiammatorio [49].

Anche l'aumento della vasopermeabilità mediato dalla bradichinina negli attacchi di angioedema potrebbe essere sottoposto all'influenza del sistema nervoso.

.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

È noto che il mediatore dei sintomi dell'angioedema da deficit di C1-INH è la bradichinina. Tuttavia rimane ancora da chiarire quale siano i meccanismi responsabili dello scatenamento di un attacco.

Lo stress è spesso descritto dai pazienti quale fattore scatenante gli attacchi. È d'altra parte noto che lo stress può funzionare da attivatore del sistema nervoso autonomo. In questo studio abbiamo per la prima volta indagato le possibili interazioni tra i sistemi proteici implicati nella patogenesi dell'angioedema e il sistema nervoso autonomo.

A tal fine abbiamo studiato il profilo autonomico e i parametri biochimici in pazienti con angioedema ereditario in remissione, sottoposti ad uno stress controllato quale l'ortostatismo passivo e in corso di attacco acuto.

MATERIALI E METODI

Pazienti con angioedema da deficit di C1-INH

Abbiamo selezionato dall'archivio del Centro Studi Angioedema di Milano 16 soggetti affetti da Angioedema ereditario durante remissione clinica di malattia (età media 52,19 anni, BMI medio 23,37, di cui 3M e 13F)

I criteri adottati per la selezione dei pazienti sono stati:

- *Assenza di co-morbilità*
- *Nessuna terapia farmacologica in corso*
- *Assenza di modificazioni ormonali in atto (es. pre-menopausa, gravidanza)*

La remissione di malattia è stata definita come un intervallo di almeno ventiquattro ore dalla crisi di angioedema.

Soggetti sani

Come gruppo di controllo abbiamo esaminato 12 volontari sani reclutati tra il personale medico ed infermieristico dell'Ospedale "Luigi Sacco" di Milano, confrontabili per sesso (F:M=10:2), età (età media 49,75), e BMI (25,43) al gruppo di pazienti con angioedema.

Tilt test e analisi spettrali

Per la registrazione dei parametri inerenti il Sistema Nervoso Autonomo, ogni paziente è stato fatto distendere su di un lettino da TILT TEST (Garden Bilance) dotato di movimento idraulico, ed assicurato con apposite fasce. Nell'ambiente, si è cercato di ridurre al minimo

la rumorosità nel corso delle registrazioni. Ogni paziente veniva invitato a non fumare, e a non assumere the o caffè nelle 2 ore precedenti l'indagine. Ad ogni paziente veniva posizionato un Venflon (Delta Ven 2 – Delta Med – Italy) nella vena cefalica preferibilmente al braccio destro, per eseguire i prelievi ematici previsti dal nostro studio.

Nel corso di tale esame sono stati registrati in continuo la pressione arteriosa battito-battito con metodica fotopleletismografica, l'ECG e l'attività respiratoria.

Il monitoraggio elettrocardiografico è stato effettuato tramite il posizionamento di un ECG a tre derivazioni ortogonali (PHYSIO AMP) sul torace del paziente; il rilevamento della pressione arteriosa è stato ottenuto tramite metodica fotopleletismografica con rilevatore digitale (FINAPRESS OHMEDA 2000); l'attività respiratoria è stata registrata con una cintura toracica collegata ad un trasduttore di pressione.

I segnali ottenuti, campionati ad una frequenza di 300 Hz, sono stati inviati ad un convertitore analogico-digitalico (NI BNC 2090), e quindi immagazzinati in un personal computer (HP Vectra) per la successiva analisi spettrale

Le registrazioni sono state eseguite per 10' in posizione clinostatica e quindi in ortostatismo passivo a 75° mantenuto per 10'.

Poiché il TILT TEST è una nota manovra di stimolazione simpatica, era stata prevista la possibilità di ricovero in Reparto per quei pazienti che avessero eventualmente presentato un attacco di angioedema in corso e/o al termine dell'esame.

Inoltre, per tutti i soggetti sottoposti al TILT TEST, erano stati predefiniti un periodo di osservazione di circa 2 ore subito dopo l'esame e la possibilità di reperire telefonicamente un medico referente dello Studio nelle 24 ore successive, in caso di attacco.

Parametri biochimici

Nei soggetti affetti da angioedema in fase di remissione clinica e nel gruppo di controllo, sia al termine dei 10 minuti di clinostatismo che al termine dei 10 minuti di ortostatismo a 75°, sono stati eseguiti prelievi per il dosaggio delle catecolamine plasmatiche, di C1 funzionale ed antigenico, C4, C1q, C3a, sC5B9 e dell'HK. Al contrario, nei soggetti che si presentavano durante crisi acuta sia le registrazioni che i prelievi ematici sono stati effettuati unicamente in posizione clinostatica.

I campioni sono stati raccolti attraverso puntura di vena periferica, centrifugati a 2000 g a temperatura ambiente per 20 min, aliquotati e conservati alla temperatura di -80°C fino a quando sono stati eseguiti i test di laboratorio volti ad indagare:

I campioni di sangue per il dosaggio delle catecolamine sono stati raccolti con provette BD Vacutainer da 6.0 mL (BD Plymouth, UK).

Il dosaggio della norepinefrina e della epinefrina da sangue venoso è stato determinato attraverso una cromatografia liquida ad elevata performance con detezione elettrochimica (BIO-RAD).

I campioni ematici per il dosaggio del sistema del complemento sono stati raccolti in provette Vacutainer in sodiocitrato al 3.8% (Beckton & Dickinson, Rutherford, NJ) e in Scott, un cocktail di inibitori protesici [50] (Benzamidine, Polybrene, SBTI, AEBSF, Leupeptine). Tali provette sono quindi state centrifugate a 2000 g a temperatura ambiente per 20 min, aliquotate e conservate alla temperatura di -80°C fino a quando sono stati effettuati i test di laboratorio.

La determinazione quantitativa di C1 inibitore, C4 e C1q è stata eseguita utilizzando piastre Behring Nor-Partigen per C1inh e C4, che contengono in uno strato di gel d'agarosio un antisiero monospecifico contro la relativa proteina umana. Le proteine presenti nei liquidi umani formano, reagendo con gli anticorpi specifici contenuti nel gel di

agarosio delle piastre Partigen, degli immunocomplessi visibili come precipitati di forma circolare (immunodiffusione radiale semplice).

La determinazione quantitativa di sC5B9 viene effettuata attraverso uno specifico kit per ELISA (Quidel Co., San Diego, CA, USA),

La determinazione quantitativa di C3a viene effettuata attraverso l' Assay Designs human Complement (EIA) kit, un immunoassay specifico per la determinazione quantitativa di C3a nel plasma

La misurazione dell'attività funzionale di C1INH è misurata utilizzando il Kit Technoclone (Vienna, Austria), che determina l'inibizione, da parte di C1-INH, dell'attività esterolitica di C1 valutata spettrofotometricamente a 405 nm (MULTISKAN ASCENT -Thermo Labssystem) come liberazione di un substrato cromogenico L'attività di C1 inibitore è valutata come valore percentuale rispetto ad un pool di controlli normali.

La quota clivata del chininogeno ad alto peso molecolare è stata calcolata attraverso un'elettroforesi SDS-PAGE ed un successivo immunoblotting [51]. Si utilizzano anticorpi specifici di capra anti catene leggere dell'HK, e successivamente vengono somministrati anticorpi di coniglio specifici per i precedenti. Si visualizzano così bande a diverso peso molecolare la cui intensità è misurata con un densitometro. (Bio-Rad GS800 densitometer).

La quota di HK clivata è espressa come percentuale della quota totale di HK. [52]

Analisi statistica

I dati raccolti sono stati registrati su foglio elettronico (Microsoft Office Excel), ed elaborati mediante programma statistico (SPSS 12.0), calcolando per le variabili quantitative media e deviazione standard, per la descrizione, errore standard, statistiche test (t di Student) ed intervalli di confidenza al 95% per l'inferenza. Un valore di $p < 0.05$ (test a due code) è stato considerato significativo.

I confronti hanno riguardato i due campioni indipendenti, normale e patologico, prima e dopo tilt test. Si è proceduto anche a confrontare la variazione pre-post tilt test dei normali vs patologici. Infine si sono confrontate le differenze pre-post dei normali e dei patologici rispetto ai soggetti in attacco acuto.

Consenso informato

Ad ogni paziente che sceglieva di aderire allo studio, veniva consegnata una nota riassuntiva del Protocollo dello Studio ed il modulo del Consenso Informato all'esame.

RISULTATI

Confrontando i parametri rilevati in clinostatismo tra soggetti con angioedema in remissione e soggetti sani abbiamo rilevato valori significativamente più elevati di pressione arteriosa ($140,38 \pm 3,57$ mmHg versus $120,64 \pm 1,98$ mmHg) nei pazienti con angioedema in remissione. Tra i due gruppi non abbiamo riscontrato differenze significative di frequenza cardiaca e frequenza respiratoria (Tabella 1).

Valutando i parametri di analisi spettrale in clinostatismo non abbiamo rilevato significative differenze nelle componenti LF e HF tra i soggetti con angioedema ereditario e i volontari sani (Tabella 1).

Considerando i valori di catecolamine in clinostatismo è emerso un aumento significativo dei valori di noradrenalina nei pazienti con angioedema ($301,38 \pm 33,220$ pg/ml) rispetto ai controlli ($210,55 \pm 27,004$ pg/ml). Questo dato è evidenziato in tabella 3.

I pazienti con angioedema ereditario sembrerebbero pertanto mostrare una lieve iperattivazione simpatica a riposo rispetto ai soggetti sani, pur non evidenziandosi significative differenze nei parametri di analisi spettrale tra questi due gruppi (Tabella 1, Tabella 3)

Valutando i parametri emodinamici e quelli di analisi spettrale durante ortostatismo non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra pazienti con angioedema e volontari (Tabella 1). Confrontando tuttavia le variazioni dei parametri di analisi spettrale pre-post tilt è emersa una differenza significativa dei parametri Lf n.u. per l'RR, indicatore della modulazione ortosimpatica sul cuore, e Hf n.u. per l'RR, indicatore della modulazione vagale sul cuore, tra soggetti con angioedema in remissione e soggetti sani. Durante stimolo ortostatico il parametro Lf n.u. è risultato crescere di $26,51 \pm 5,45$ nei soggetti sani, mentre aumentava di $14,21 \pm 5,41$ nei soggetti con AEE in remissione, con

una differenza significativa di $12,29 \pm 7,95$. Il parametro Hf n.u. si riduceva di $15,51 \pm 4,18$ nei soggetti normali e solo di $2,81 \pm 4,12$ nei soggetti sani, con una differenza significativa di $12,70 \pm 6,07$. Sembrerebbe pertanto che i soggetti con AEE in remissione, pur presentando una risposta conservata allo stimolo ortostatico, abbiano comunque una ridotta variabilità cardiovascolare. (Tabella 5).

Valutando il dosaggio dei fattori del complemento in clinostatismo abbiamo riscontrato, come atteso, significative differenze tra i soggetti con AEE in remissione e soggetti sani nei valori di C1 Ag, C1 Fx e C4; non emergeva invece una differenza significativa nei livelli di sC5b9 (Tabella 2).

Analizzando la fase di contatto, si è evidenziata una differenza significativa dei valori di HK tra soggetti sani e soggetti con AEE in remissione durante clinostatismo. La quota clivata di HK cresce infatti progressivamente tra soggetti sani ($32,482 \pm 1,5\%$) e soggetti con AEE in remissione ($46,194 \pm 1,8\%$) (Tabella 2). Tale differenza significativa nella quota clivata di HK si mantiene anche durante stimolo ortostatico con valori di $48,800 \pm 1,90$ nei soggetti con angioedema ereditario e di $34,718 \pm 1,06$ nei controlli.

L'ortostatismo passivo indotto dal tilt test non ha determinato significative differenze assolute e percentuali dei valori di C1 Ag, C1 Fx e C4 nei due gruppi. Solo il valore di sC5B9 è risultato aumentare in maniera significativa nei soggetti sani nel passaggio da clinostatismo a ortostatismo (Tabella 4).

Considerando la variazione pre-post tilt della quota clivata di HK ne è emerso un significativo aumento nel passaggio dalla posizione clinostatica alla posizione ortostatica sia nei soggetti sani che nei pazienti con angioedema ereditario (tabella 4).

DISCUSSIONE

Numerosi studi hanno evidenziato quale sia la risposta fisiologica dei soggetti sani allo stimolo ortostatico, capace di determinare un aumento della frequenza cardiaca e, in termini di analisi spettrale, un aumento della componente LF e una diminuzione della componente HF, venendo così a costituire una manovra di stimolazione simpatica.

Scopo di sottoporre i soggetti ad ortostatismo passivo era appunto quello di riprodurre in laboratorio una condizione che potesse stimolare la risposta neurovegetativa ortosimpatica, per studiare il pattern autonomico dei soggetti affetti da angioedema.

I dati da noi registrati in fase di clinostatismo mostrano che i soggetti affetti da angioedema ereditario in remissione presentano valori di pressione arteriosa e di noradrenalina significativamente maggiori rispetto ai soggetti sani: entrambi questi riscontri sono suggestivi per una lieve iperattivazione ortosimpatica di questi soggetti.

Da considerare inoltre che le fisiologiche variazioni dei parametri di analisi spettrale indotte dall'ortostatismo (aumento della componente ortosimpatica Lf n.u. e riduzione della componente vagale Hf n.u.) seppure presenti nei pazienti con angioedema ereditario in remissione, sono risultate di minore entità rispetto ai controlli sani. Ciò sembrerebbe mostrare che i soggetti con AEE presentino una risposta conservata allo stimolo ortostatico ma una ridotta variabilità cardiovascolare rispetto ai soggetti sani, forse per l'incapacità di incrementare ulteriormente un ipertono simpatico già presente in condizioni basali.

Tali osservazioni sono state effettuate anche in altre patologie quali l'ipertensione arteriosa, la colite ulcerosa e la sindrome fibromialgica, caratterizzate da complesse interazioni tra condizioni di stress e sistema nervoso autonomo che sembra mostrare una ridotta capacità nell'aumentare un ipertono simpatico già presente in condizioni basali.

Nel nostro studio abbiamo inoltre valutato le variazioni dei principali markers implicati nella patogenesi dell'angioedema ereditario di fronte a una condizione di stress determinata dall'ortostatismo passivo.

Confrontando la variazione pre-post tilt all'interno di ciascun gruppo, è emerso come sia i soggetti sani che i soggetti con AEE in remissione presentino un significativo aumento della quota clivata di chininogeno ad alto peso molecolare con il passaggio dalla posizione clinostatica alla posizione ortostatica. Tale significativo aumento in risposta ad una condizione di stress come l'ortostatismo passivo assume particolare importanza in quanto il chininogeno ad alto peso molecolare rappresenta il diretto precursore della bradichinina, il mediatore implicato direttamente nell'aumento della vasopermeabilità che caratterizza gli attacchi di angioedema.

L'aumento della quota clivata di HK con l'ortostatismo potrebbe rappresentare infatti la prima dimostrazione di una relazione tra attivazione ortosimpatica e vasopermeabilità, ulteriore passo verso una completa comprensione della patogenesi delle crisi acute di angioedema.

Limiti del lavoro

Sicuramente il principale limite di questo lavoro è costituito dalla presenza di un campione esiguo di soggetti.

In particolare i soggetti con attacco acuto rappresentano un campione troppo ridotto per poter fornire risultati dall'elevata significatività statistica.

Inoltre la significatività di alcuni dati è stata inficiata dalla presenza di un'elevata deviazione standard per alcuni parametri considerati nei diversi gruppi.

Prospettive future

Un campione più ampio di soggetti potrà meglio definire il rapporto fra sistema autonomo ed angioedema emerso dal nostro lavoro.

Uno studio in cui disponibile il dosaggio diretto della bradichinina potrebbe fornire un'evidenza ancor più diretta del legame tra attivazione ortosimpatica e vasopermeabilità.

TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Confronto tra soggetti con AEE in remissione e soggetti sani. Riassunto dei risultati delle analisi spettrali in rest e in tilt.

Parametri	Media±ES REST	P	MEDIA ±ES TILT	P
FC Remissione	74,175 ± 2,9	NS	82,884 ± 2,7	NS
FC Controlli	74,405 ± 2,5		84,615 ± 3,7	
LF U.N. Remissione	61,0306 ± 6,6	NS	75,2500 ± 6,0	NS
LF U.N. Controlli	51,7136 ± 4,6		78,2273 ± 4,3	
HF U.N. Remissione	22,2738 ± 4,6	NS	19,4606 ± 4,4	NS
HF U.N. Controlli	30,8336 ± 4,4		15,3191 ± 3,7	
LF/HF Remissione	6,2511 ± 2,2	NS	15,5477 ± 5,8	NS
LF/HF Controlli	2,4430 ± 0,5		14,2447 ± 6,3	
FR Remissione	17,464 ± 0,7	NS	18,506 ± 1,1	NS
FR Controlli	18,055 ± 0,9		19,109 ± 1,6	
SAP Remissione	140,38 ± 3,5	<0,01	140,56 ± 7,1	NS
SAP Controlli	120,64 ± 1,9		127,45 ± 3,1	
LF sap Remissione	25,6606 ± 7,7	NS	27,1038 ± 5,0	NS
LF sap Controlli	9,7818 ± 3,1		21,6345 ± 7,4	
Alfa LF Remissione	5,8156 ± 0,9	NS	4,1463 ± 0,5	NS
Alfa LF Controlli	7,2182 ± 1,6		6,5873 ± 2,1	

Tabella 2. Confronto tra soggetti con AEE in remissione e soggetti sani . Risultati dei prelievi dei fattori del sistema del complemento e del sistema di contatto in rest e in tilt

Parametri	Media±ES REST	P	MEDIA ±ES TILT	P
C1 Fx Remissione	17,75 ± 3,3	<0,01	20,19 ± 3,2	<0,01
C1Fx Controlli	74,09 ± 5,5		83,82 ± 3,6	
C1 Ag Remissione	18,19 ± 6,7	<0,01	22,38 ± 6,5	<0,01
C1 Ag Controlli	96,82 ± 1,6		97,73 ± 1,5	
C1q Remissione	98,50 ± 1,5	NS	100,00 ± 0,0	0,027
C1q Controlli	100,00 ± 0,0		98,64 ± 0,7	
C3a Remissione	725,38 ± 104,6	NS	702,69 ± 99,1	NS
C3a Controlli	916,18 ± 330,6		626,18 ± 55,2	
C4 Remissione	34,00 ± 7,8	<0,01	34,56 ± 7,2	<0,01
C4 Controlli	105,64 ± 7,4		105,82 ± 8,6	
sC5B9 Remissione	201,00 ± 21,8	NS	221,31 ± 23,0	NS
sC5B9 Controlli	158,91 ± 27,9		220,64 ± 25,0	
HK Remissione	46,194 ± 1,8	<0,01	48,800 ± 1,90	<0,01
Hk Controlli	32,482 ± 1,5		34,718 ± 1,06	

Tabella 3. Confronto tra soggetti con AEE in remissione e soggetti sani. Riassunto dei risultati dei prelievi delle catecolamine in rest e in tilt

Parametri	Media±ES REST	P	MEDIA ±ES TILT	P
NA Remissione	301,38 ± 33,2	0,040	467,38 ± 48,3	NS
NA Controlli	210,55 ± 27,0		407,45 ± 38,7	
A Remissione	100,69 ± 27,0	NS	107,69 ± 24,8	NS
A Controlli	222,64 ± 80,7		239,27 ± 78,8	

Tabella 4. Confronto rest – tilt all'interno di ogni singolo gruppo di soggetti. Vengono studiati separatamente soggetti con HAE in remissione e soggetti sani. Sono riportate le differenze tra le medie di ciascuno dei due campioni per ogni parametro considerato. Riassunto dei risultati dei prelievi dei fattori del complemento e del sistema di contatto.

Parametri	Δ medie (R-T)	P
C1Fx Controlli	9,727 ± 5,7	NS
C1 Fx Remissione	2,438 ± 1,4	NS
C1 Ag Controlli	0,909 ± 0,9	NS
C1 Ag Remissione	4,188 ± 2,1	NS
C1q Controlli	1,364 ± 0,7	NS
C1q Remissione	1,500 ± 1,5	NS

Parametri	Δ medie(R-T)	P
C4 Controlli	0,182 ± 2,9	NS
C4 Remissione	0,563 ± 2,2	NS
sC5B9 Controlli	61,727 ± 24,5	0,031
sC5B9 Remissione	20,313 ± 19,7	NS
HK Controlli	2,2364 ± 1,2	0,049
HK Remissione	2,6063 ± 1,0	0,031

Tabella 5. Confronto rest-tilt tra soggetti con AEE in remissione e soggetti sani. Viene valutata la variazione rest-tilt di ciascun parametro spettrale nelle due popolazioni.

Parametri	Δ medie (R-T)	P
FC Remissione	8,70 \pm 1,42	NS
FC Controlli	10,21 \pm 1,87	
LF U.N. Remissione	14,21 \pm 5,41	0,035
LF U.N. Controlli	26,51 \pm 5,45	
HF U.N. Remissione	-2,81 \pm 4,12	0,047
HF U.N. Controlli	-15,51 \pm 4,18	
LF/HF Remissione	9,29 \pm 6,01	NS
LF/HF Controlli	11,80 \pm 6,31	
FR Remissione	1,04 \pm 0,70	NS
FR Controlli	1,05 \pm 1,43	
SAP Remissione	0,19 \pm 7,50	NS
SAP Controlli	6,82 \pm 2,81	
LF sap Remissione	1,44 \pm 9,27	NS
LF sap Controlli	11,85 \pm 8,83	
Alfa LF Remissione	-1,66 \pm 1,01	NS
Alfa LF Controlli	-0,63 \pm 2,86	

Figura 1. Funzioni di C1-INH

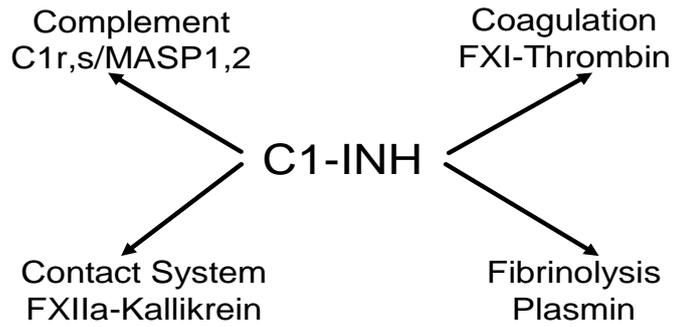


Figura 2. Rappresentazione delle interazioni delle componenti simpatica e parasimpatica sulla funzione cardiovascolare: la bilancia simpato – vagale

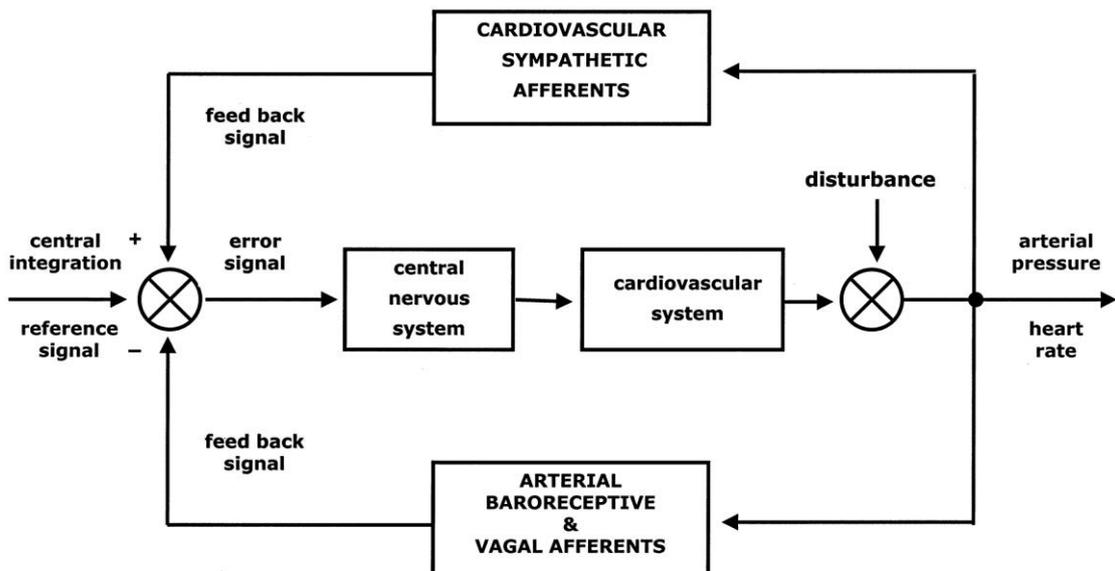


Figura 3. Rapporti fra SNA e sistema immunitario. Sono rappresentate la via neurale e via umorale dell'immunomodulazione

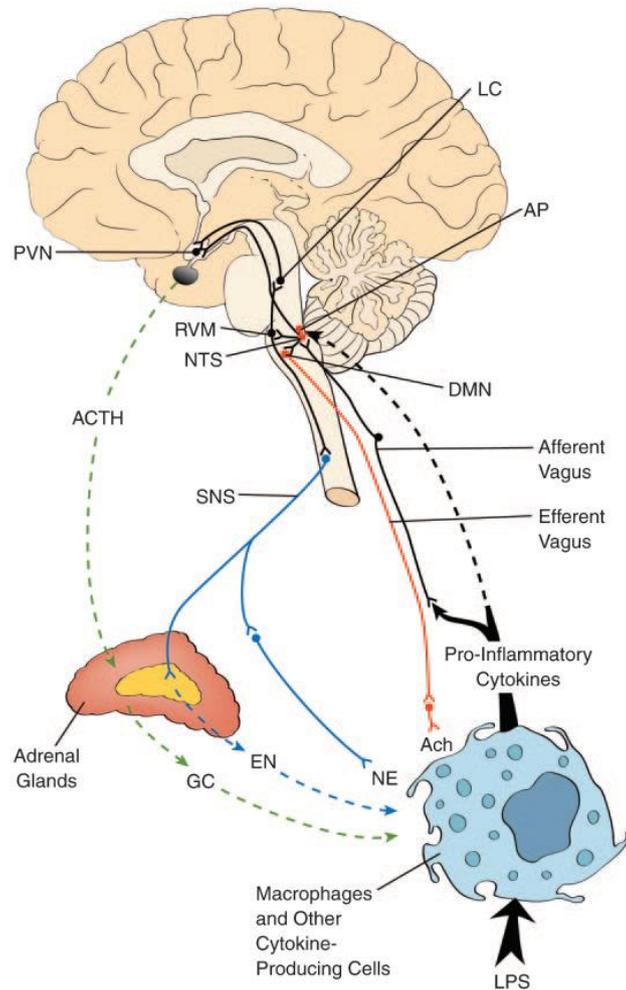


Figura 4. Il pannello di sinistra rappresenta il segnale originario registrato, l'elettrocardiogramma. Il pannello di destra rappresenta la serie temporale, cioè la serie di ogni intervallo RR consecutivo

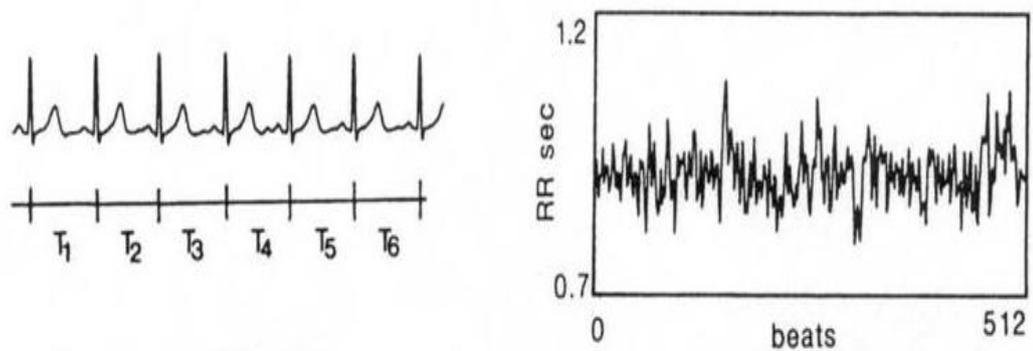


Figura 5. Sono rappresentate le due serie temporali della frequenza cardiaca (tacogramma, a sinistra) e della pressione arteriosa (sistogramma, a destra).

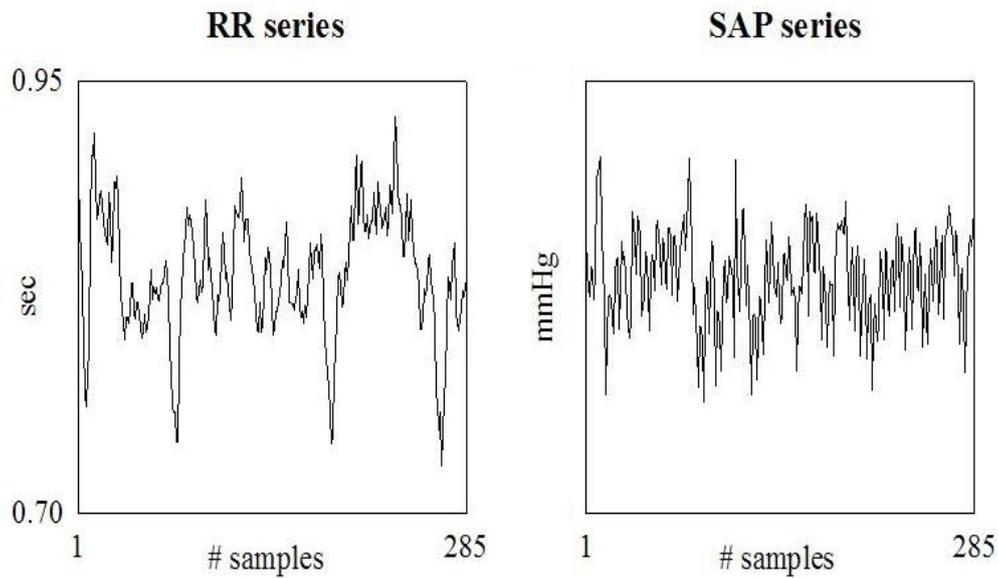
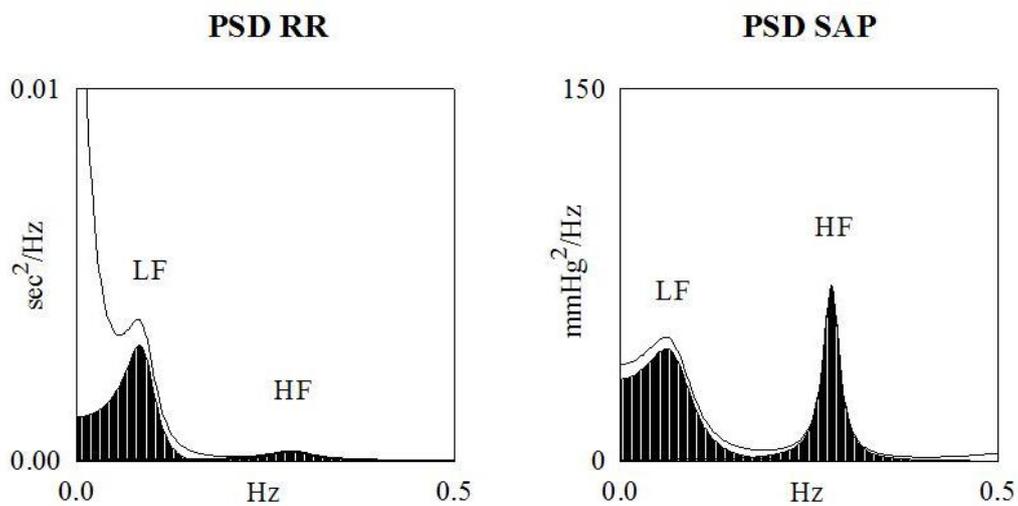


Figura 6. È rappresentata l'analisi spettrale della variabilità della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa, in cui risultano evidenti, in condizioni basali, le due componenti oscillatorie LF e HF



BIBLIOGRAFIA

1. Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, et al.: Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(3 Suppl): S51-131
2. Milton IL. On giant urticaria. *Edinburgh Med J* 1876; 22: 513-4
3. Quincke HI. Uber akutes anschieriebenes Hautodem. *Monatshe Prakt Dermatol.* 1882; 1: 129-131
4. Osler W. Hereditary angio-neurotic oedema *Am J Med Sci* 1888; 95: 362-7
5. Heiner DC, Blitzer JR. Familial paroxysmal disfunction of the autonomic nervous system (a periodic disease), often precipitated by emotional stress. *Pediatrics*, 1957; 782.
6. Pensky J, Levy LR, Lepow IH. Partial purification of serum inhibitor of C1 esterase. *J Biol Chem.* 1961; 236: 1674
7. Landerman NS, Webster ME, Becker EL, Ratcliffe HE. Hereditary angioneurotic edema. *J allergy* 1962;33:330-41
8. Jaworska H, Gregorek H, Madalinski K. Angioedema is caused by a defect in C1 inhibitor synthesis. *Przegl Lek* 57:483-488
9. Carugati A, Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol Immunol.* 2001;38:161-73.
10. Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1 inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* 71:206-215
11. Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H: Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet* 2000; 356(9225): 213-7.
12. Cichon S, Martin L, Hennies HC, et al.: Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 2006; 79(6): 1098-104.
13. Cicardi M, Zingale L.C. Angioedema due to C1-inhibitor deficiency. A problem for allergologists not a problem of allergy. *Giorn. IT Allergol. Immunol. Clin.* 2002; 12: 133 – 139
14. Davis AE C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol* 1988;6:595-628

15. Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A. Activation of the coagulation cascade in C1 inhibitor deficiencies. *Blood* 1997 89:3213-3218
16. Cugno M, Bos I, Lubbers Y, Hack CE, Agostoni A. In vitro interaction of C1 inhibitor with thrombin. *Blood coagul Fibrinolysis* 2001 12:253-260
17. Donaldson VH 1993 Plasminogen activation in hereditary angioneurotic edema [editorial]. *J lab Clin Med* 121:13-14.
18. Cicardi M, Bergamaschini L, Cugno M, Beretta A, Zingale LC, Colombo M, et al. Pathogenetic and clinical aspects of C1 inhibitor deficiency. *Immunobiology* 1998;199:366-76.
19. Shoemaker LR, Schurman SJ, Donaldson VH, Davis AE. Hereditary angioneurotic oedema: characterization of plasma kinin and and vascular permeability enhancing activities. *Clin Exp Immunol* 1994 95:22-28
20. Schapira M, Silver LD, Scott CF, Schmaier AH, Prograis Jr LJ, et al. Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 1983; 308:1050-1053.
21. Bork K, Staubach P, Eckardt AJ, Hardt J. Symptoms, course, and complications of abdominal attacks in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 619-627
22. Bork K, Siedlecki K, Bosch S, Schopf R, Kreuz W. Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angioedema. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 349-354
23. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, Aygoeren-Pürsün E, Craig T, Binkley K, Hebert J, Ritchie B, Bouillet L, Betschel S, Cogar D, Dean J, Devaraj R, Hamed A, Kamra P, Keith PK, Lacuesta G, Leith E, Lyons H, Mace S, Mako B, Neurath D, Poon MC, Rivard GE, Schellenberg R, Rowan D, Rowe A, Stark D, Sur S, Tsai E, Warrington R, Wasserman S, Ameratunga R, Bernstein J, Björkander J, Brosz K, Brosz J, Bygum A, Caballero T, Frank M, Fust G, Harmat G, Kanani A, Kreuz W, Levi M, Li H, Martinez-Saguer I, Moldovan D, Nagy I, Nielsen EW, Nordenfelt P, Reshef A, Rusicke E, Smith-Foltz S, Späth P, Varga L, Xiang ZY. 2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010 Jul 28;6(1):24.
24. Pekdemir M, Ersel M, Aksay E, Yanturali S, Akturk A, Kiyani S: Effective treatment of hereditary angioedema with fresh frozen plasma in an emergency department. *J Emerg Med* 2007; 33(2): 137-9.
25. Zingale LC, Castelli R, Zanichelli A, Cicardi M: Acquired deficiency of the inhibitor of the first complement component: presentation, diagnosis, course, and conventional management. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26(4): 669-90.
26. Zingale L, Beltrami L, Zanichelli A, Cicardi M. et al.: Angioedema without urticaria: a large clinical survey. *CMAJ* 2006; 175(9): 1065-70.

27. Montano N, Porta A, Cogliati C, Costantino G, Tobaldini E, Rabello Casali K, Iellamo F: Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009 Feb;33(2):71-80. Epub 2008 Jul 30
28. Pavlov VA, Tracey K et al: The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. *Mol Med.* 2003 May-Aug;9(5-8):125-34.
29. Pomeranz D., Macaula Y.R.J.B., Caudill M.A., Kutz I., Adam D., Gordon D., Kilborn K.M., Barger C.A., Shannon D.C., Cohen R.J., Benson H.: Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am J Physiol* 1985; 248:H151-H153.
30. Akselrod S., Gordon D., Ubel FA., Shannon DC., Berger RD., Cohen RJ., Power spectrum analysis of heart rate fluctuations: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981;213:220-223.
31. Montano N, Porta A, Lombardi F, Pagani M, Malliani A: Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt, *Circulation* 1994;90:1826-1831
32. Malliani A., Pagani M., Lombardi F., Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation.* 1991;84:482-492.
33. Grubb BP, Kosinski D. Tilt Table Testing: concepts and limitations. *Pacing Clin Electrophysiol* 1997; 20(3 Pt 2): 781-7
34. Pagani M., Lucini D. Autonomic dysregulation in essential hypertension: insight from heart rate and arterial pressure variability. *Auton Neurosci.* 2001 Jul 20;90(1-2):76-82.
35. Guzzetti S., Cogliati C., Turiel M., Crema C., Lombardi F., Malliani A. Sympathetic predominance followed by functional denervation in the progression of chronic heart failure. *Eur Heart J.* 1995 Aug;16(8):1100-7.
36. Somers V.K., Dyken M.E., Clary M.P., Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest.* 1995 Oct;96(4):1897-904.
37. Furlan R, Ardizzone S, Palazzolo L, Rimoldi A, Perego F, Barbic F, Bevilacqua M, Vago L, Bianchi Porro G, Malliani A. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Jan;290(1):R224-32.
38. Barbic F, Perego F et al. Early abnormalities of vascular and cardiac autonomic control in Parkinson's disease without orthostatic hypotension. *Hypertension* 2007; 49(1): 120-126
- 39 Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Diana A et al. Increased neural sympathetic activation in fibromyalgia syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069: 109-17

40. Inukai T., Takanashi K., Kobayashi H., Fujiwara Y., Tayama K., Aso Y., Takemura Y. Power spectral analysis of variations in heart rate in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism. *Hormone and Metabolic Research*. 1998; 30 (8): 531-5.
41. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angioedema. *Lancet* 1998 ; 351 : 1693-1697
42. Nussberger J, Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1321-1322.
43. Curd JG, Prograis Jr LJ, Cochrane CG. Detection of active kallikrein in induced blister fluids of hereditary angioedema patients. *J Exp Med* 1980;152:742-747.
44. Fields T, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. Kinin formation in hereditary angioedema plasma: evidence against kinin derivative from C2 and in support of spontaneous formation of bradykinin. *J Allergy Clin Immunol* 1983;72:54-60.
45. Cugno, M., Cicardi, M., Bottasso, B., Coppola, R., Paonessa, R., Mannucci, P. M. and Agostoni, A. Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 89, 3213-3218, 1997)
46. Kleniewsky J, Blankenship DT, Cardin AD, Donaldson VH. Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin. *J Lab Clin Med* 1992;120:129-139.
47. Landerman NS, Webster ME, Becker EL, Ratcliffe HE. Hereditary angioneurotic edema. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. *J Allergy* 1962;33:330- 34148. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature Lett*, 2007 ; Sept : 1-6
48. Nilsson T, Back O. Elevated plasmin-alpha 2-antiplasmin complex levels in hereditary angioedema: evidence for the in vivo efficiency of the intrinsic fibrinolytic system. *Thromb Res, Suppl* 1985;40:817-821
49. Han ED, Mc Farlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis III AE. Increased vascular permeability in C1-inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest* 2002; 109: 1057-1063
50. Scott C. F., Shull B., Muller Esterl W and Colman RW. Rapid direct determination of low and high molecular weight kininogen in human plasma by particle concentration fluorescence immunoassay (PCFIA) *Tromb. Haemostasis* 77,109-118
51. Cugno, M., Cicardi, M., Bottasso, B., Coppola, R., Paonessa, R., Mannucci, P. M. and Agostoni, A. Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 89, 3213-3218, 1997)
52. Berrettini, M., Lammle, B., White, T., Curd, J. and Griffin, J. H. Detection of the in vivo cleavage of high molecular weight kininogen in human plasma by immunoblotting with monoclonal antibodies. *Blood* 68, 455-462, 1986

