

SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELL'ARTERIOSCLEROSI (SISA)  
In collaborazione con SITeCS - Società Italiana di Terapia Clinica e Sperimentale

## XIV Convegno Regionale Sezione Lombardia

Milano, 16-17 ottobre 2015

### COMUNICAZIONI GIOVANI RICERCATORI

#### Il soggetto ad alto rischio cardiovascolare: Ricerca clinica e di base nell'area cardiovascolare

*Abstracts selezionati dalla Commissione Scientifica*

### COMUNICAZIONI ORALI

#### ASSOCIAZIONE TRA IL POLIMORFISMO VAL66MET DEL GENE BDNF (BDNFVAL66MET) E TROMBOSI

P. Amadio<sup>1</sup>, G.I. Colombo<sup>1</sup>, E. Tarantino<sup>2</sup>, S. Gianellini<sup>1</sup>,  
A. Ieraci<sup>2</sup>, M. Brioschi<sup>1</sup>, C. Banfi<sup>1</sup>, J.P. Werba, MD<sup>1</sup>,  
A. Parolari<sup>3</sup>, F.S. Lee<sup>4</sup>, E. Tremoli<sup>1,2</sup>, S.S. Barbieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Department of Cardiac Surgery, Operative Unit of Cardiac Surgery and Translational Research, Policlinico San Donato IRCCS, Milano; <sup>4</sup>Department of Psychiatry, Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, NY, USA

Recenti studi dimostrano l'esistenza di un forte legame tra neurotrofine e malattie cardiovascolari (CVD). La neurotrofina brain-derived neurotrophic factor (BDNF) favorisce la sopravvivenza, il differenziamento e il mantenimento neuronale ma ricopre un ruolo importante anche durante lo sviluppo vascolare e la risposta in seguito a danno. In particolare, una singola sostituzione amminoacidica sul codone 66 nel gene BDNF (BDNFVal66Met), notoriamente associata a una maggiore suscettibilità allo stress, è stata recentemente legata anche a CVD. Tuttavia, poche informazioni sono disponibili in merito al ruolo di questo SNP nelle patologie trombotiche. Lo scopo dello studio è stato quello di definire l'impatto del polimorfismo BDNFVal66Met sulle patologie sopracitate.

Tramite uno studio retrospettivo condotto su 979 pazienti, sottoposti a bypass coronarico nel periodo 2002-2011, abbiamo identificato un'augmentata incidenza di infarto al miocardio nei pazienti omozigoti recanti il polimorfismo per il BDNFVal66Met (BDNF<sup>Met/Met</sup>) rispetto ai pazienti non recanti tale SNP (BDNF<sup>Val/Val</sup>). Per capire le basi molecolari di tale associazione, ci si siamo avvalsi di una linea murina (BDNFVal66Met) esprime lo SNP che riproduce le caratteristiche fenotipiche presenti nell'uomo con la medesima variante allelica. Topi BDNF<sup>Met/Met</sup> mostrano una maggiore propensione alla trombosi, un aumentato stato infiammatorio, iper-coagulazione e iper-reattività piastrinica. Inoltre, l'analisi proteomica condotta sui secretomi di aorte

isolate da topi BDNF<sup>Met/Met</sup> e BDNF<sup>Val/Val</sup> ha permesso di identificare una differente espressione di proteine coinvolte nella cascata coagulativa e infiammatoria. A conferma di questi dati, una diversa espressione di gelsolina, fattore tissutale, e SIRT1 è stata misurata nel plasma, nel tessuto aortico, nelle piastrine e/o nei leucociti circolanti. Inoltre, topi BDNF<sup>Met/Met</sup> presentavano elevati livelli plasmatici di alfa-1 anti-tripsina e interleuchina-6, un'augmentata velocità di eritrosedimentazione, ed una elevata conta leucocitaria. Infine, è interessante notare che, l'introduzione della mutazione Met in cellule WT (Hela<sup>Met</sup>) fosse sufficiente per conferire a queste cellule un fenotipo pro-trombotico. In conclusione, l'attivazione piastrinica, modificazioni nella via della coagulazione, e la diversa espressione proteica osservata nei topi BDNF<sup>Met/Met</sup> ben ricapitola le alterazioni tipiche dell'aterotrombosi. Inoltre, i nostri dati suggeriscono che il polimorfismo BDNFVal66Met possa contribuire all'individuale propensione alla trombosi arteriosa in pazienti con infarto acuto del miocardio (AMI).

#### ZC3H10 CONTROLLA LA BIOGENESI MITOCONDRIALE E IL DIFFERENZIAMENTO MUSCOLARE E ADIPOCITARIO

M. Audano<sup>1</sup>, G. Cermenati<sup>1</sup>, M. Crestani<sup>1</sup>, D. Caruso<sup>1</sup>,  
E. Saez<sup>2</sup>, E. De Fabiani<sup>1</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

Il diabete di tipo 2 colpisce circa 300 milioni di persone a livello mondiale e porta allo sviluppo di complicanze fra cui patologie cardiovascolari, insufficienza renale, retinopatia e neuropatie. Nonostante la sua eziologia sia complessa e multifattoriale, diverse evidenze dimostrano come obesità, disfunzioni degli organi insulino-sensibili (tessuto adiposo, muscolo scheletrico etc.) ed alterazioni della funzionalità mitocondriale siano strettamente associati all'insorgenza del diabete di tipo 2. Per questo motivo, la ricerca e la caratterizzazione di nuovi fattori in grado di regolare la densità e l'attività mitocondriale rappresentano un requisito fondamentale per meglio comprendere i meccanismi alla base della malattia, offrendo la possibilità di individuare nuovi bersagli farmacologici.

Con tale obiettivo è stato sviluppato uno screening in cui è stata valutata la capacità di 16.000 geni di incrementare l'attività del promotore del fattore di trascrizione mitocondriale A (Tfam), gene coinvolto nella trascrizione e replicazione del DNA mitocondriale. Successive analisi bioinformatiche e biochimiche svolte in una linea cellulare di muscolo scheletrico hanno permesso di individuare la proteina zinc finger CCCH-type containing 10 (Zc3h10) come miglior candidato. I nostri dati dimostrano che la sovraespressione di Zc3h10 in mioblasti promuove la densità e funzionalità mitocondriale; Specificamente, è stato osservato un incremento dei livelli di DNA mitocondriale, parametro utilizzato per misurare la densità mitocondriale, nonché un'augmentata espressione ed attività dei complessi appartenenti alla catena di trasporto degli elettroni e di diversi regolatori mitocondriali. Il silenziamento di Zc3h10, viceversa, compromette in modo significativo la funzionalità mitocondriale. Questi dati dimostrano che Zc3h10 è un nuovo regolatore mitocondriale.

### RUOLO DI PCSK9 (PROPROTEINA CONVERTASI SUBTILISINA/KEXINA DI TIPO 9) NELL'OBESITÀ E NELLA SINDROME METABOLICA IN MODELLI SPERIMENTALI

G. Balzarotti<sup>1</sup>, G. Tibolla<sup>1</sup>, M. Ruscica<sup>1</sup>, C. D'Alonzo<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>, G.D. Norata<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Centro SISA per lo studio dell'aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (Milano); <sup>3</sup>IRCCS Multimedica, Sesto San Giovanni (Milano)

**Obiettivo.** PCSK9 è una proteasi circolante secreta principalmente dal fegato, che regola i livelli plasmatici di lipoproteine a bassa densità (LDL), favorendo la degradazione dei recettori per le LDL (LDLR) a livello epatico. Tuttavia, PCSK9 presenta anche effetti pleiotropici dovuti alla sua capacità di legarsi a recettori diversi dal LDLR, che potrebbero svolgere un ruolo critico in patologie quali sindrome metabolica e obesità. Dunque, considerando la crescente importanza che l'inibizione farmacologica di PCSK9 sta assumendo nel trattamento delle ipercolesterolemie, risulta fondamentale una migliore comprensione del ruolo fisiologico di questa proteina nei tessuti extra-epatici.

**Metodi e Risultati.** Topi maschi, PCSK9 KO e wild type (WT), di 2 mesi di età, sono stati alimentati per 20 settimane con una dieta standard (SFD) o con una dieta ricca in lipidi (HFD) in grado di indurre obesità e disfunzione metabolica. Come atteso, l'assenza di PCSK9 determina una significativa riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo (51,8±12,3 mg/dl vs 79,8±11,0 mg/dl e 86,1±2,1 mg/dl vs 123,4±5,2 mg/dl con SFD e HFD rispettivamente, p<0,05), ma non dei livelli circolanti di trigliceridi. Sorprendentemente, i topi PCSK9 KO accumulano più tessuto adiposo viscerale rispetto al gruppo controllo (+50%±17% con HFD, p<0,05), associato anche a un aumento di peso. Per valutare se questa differenza fosse associata a disfunzione metabolica, abbiamo effettuato un test di tolleranza al glucosio (GTT) e un test di tolleranza all'insulina (ITT). I topi PCSK9 KO hanno evidenziato una ridotta tolleranza al glucosio (Area sotto la curva +40%±9% with HFD, p<0,05) rispetto ai topi controllo, mentre non sono state osservate variazioni significative nella tolleranza all'insulina.

**Conclusione.** I nostri dati suggeriscono che, in un modello animale di obesità e disfunzione metabolica, l'assenza di PCSK9 si associa a una ridotta tolleranza al glucosio e all'accumulo di tessuto adiposo viscerale.

### LA LUNGHEZZA TELOMERICA LEUCOCITARIA, DETERMINATA GENETICAMENTE, È CAUSALMENTE ASSOCIATA ALLA PROGRESSIONE DELLO SPESSORE MEDIO-INTIMALE CAROTIDEO

A. Baragetti<sup>1,2</sup>, J. Palmen<sup>4</sup>, K. Garlaschelli<sup>2</sup>, L. Grigore<sup>2</sup>, S.E. Humphries<sup>4</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>, P.J. Talmud<sup>4</sup>, G.D. Norata<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo (Milano); <sup>3</sup>IRCCS, Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni (Milano); <sup>4</sup>Institute of Cardiovascular Science, University College London, UK

La Lunghezza Telomerica Leucocitaria (LTL) è un indice di funzionalità dei telomeri e della capacità replicativa cellulare. Durante l'invecchiamento si osserva un accorciamento di LTL (TS); tuttavia un aumento di TS è associato con numerose patologie, quali cancro e diabete. Scopo di questo lavoro è stato:

- 1) valutare se LTL e TS sono associati con la prognosi cardiovascolare;
- 2) determinare l'impatto di specifiche signatures genetiche su LTL e TS;
- 3) valutare l'impatto di questi profili sulla progressione del danno vascolare.

Pertanto abbiamo misurato al basale la LTL in una coorte rappresentativa della popolazione generale (Studio PLIC); sei anni più tardi la misurazione era stata replicata su 768 soggetti. Di questi, sono stati raccolti i dati clinici, biochimici, antropometrici e la storia farmacologica. Tramite ultrasonografia è stato determinato lo spessore medio-intimale carotideo (c-IMT), valutandone la progressione. Erano disponibili gli SNPs su sette loci genici associati con la LTL in un'analisi GWAS (cinque di questi si trovano su geni che codificano per componenti del sistema telomeri/telomerasi: TERC, TERT, NAF1, OBFC1 e RTEL1). È stato infine calcolato lo score genetico per ogni individuo. La LTL mediana al basale era di 5.75 kbp [3,59-8,26] e 4,61 kbp [3,64-5,53] dopo 6 anni. Il TS mediano era di -956 bp [IQR -3,536-1,185]. La LTL era associata inversamente al TS  $\beta=-0,919$ ,  $p<0,001$ . LTL e TS erano associati con diversi parametri cardio-metabolici ma non variavano in funzione della terapia farmacologica. Aggiustando per i fattori di rischio classici, il TS era associato a una più rapida progressione di c-IMT ( $\beta=1,48$ ;  $p=0,05$ ). TS variava in funzione dello score genetico ( $\beta=-0,090$ ,  $p=0,041$ ), il quale a sua volta era associato con una più rapida progressione di c-IMT.

In conclusione, LTL e il TS, tratti ereditabili, sono associati con la progressione di c-IMT. L'analisi genetica suggerisce che il TS è causale per la progressione dell'aterosclerosi subclinica.

### RUOLO PREDITTIVO DI MARCATORI PLASMATICI NELL'OCCLUSIONE DEL BYPASS AORTOCORONARICO

M. Brambilla<sup>1</sup>, L. Rossetti<sup>1</sup>, P. Canzano<sup>1</sup>, C. Zara<sup>1</sup>, L. Cavallotti<sup>1</sup>, A. Parolari<sup>2,3</sup>, E. Tremoli<sup>1,2</sup>, M. Camera<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>IRCCS Policlinico San Donato, U.O. Cardiocirurgia e Ricerca traslazionale, San Donato Milanese; <sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

**Introduzione e scopo.** L'occlusione è la principale causa della prognosi negativa dei bypass aortocoronarici (CABG). L'identificazione

di elementi predittori della pervietà nel tempo dei CABG è stato oggetto di diversi studi, focalizzati soprattutto sulla presenza di fattori di rischio cardiovascolari o specifici marker genetici. Non vi sono invece dati riguardanti la caratterizzazione delle microvescicole circolanti (MVs), considerate biomarcatori di infiammazione e danno vascolare in diverse patologie cardiovascolari, né una valutazione generale di citochine infiammatorie plasmatiche.

Scopo del lavoro è stato quindi quello di verificare se la presenza di un particolare assetto di MVs o di uno specifico fenotipo proteico nel plasma, prima dell'intervento di bypass, fossero associati alla sua occlusione nell'arco di un anno.

**Metodi.** Sono stati analizzati i plasmi di 179 pazienti sottoposti ad un intervento di CABG. A tali soggetti il giorno prima dell'intervento è stato effettuato un prelievo di sangue da cui è stato preparato il plasma per la valutazione delle MVs circolanti mediante analisi citofluorimetrica. La caratterizzazione di 92 proteine plasmatiche è stata condotta con Proseek Multiplex CVDI assay. Dopo 12 mesi dalla procedura chirurgica la pervietà del bypass è stata valutata mediante TAC.

**Risultati.** L'occlusione del bypass dopo 12 mesi dall'intervento è stata riscontrata nel 25% dei pazienti in esame. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato come nel plasma di tali soggetti la percentuale di MVs di origine piastrinica (CD41<sup>pos</sup>) e di quelle che esprimevano AnnexinV, CD62P e Tissue Factor era significativamente superiore rispetto a quella misurata nei pazienti con bypass pervi. Nello stesso gruppo di soggetti, l'analisi del proteoma plasmatico ha evidenziato la presenza di alterati livelli di Natriuretic peptides B, Stem Cell Factor, TIM-1 e Thrombomodulin rispetto ai soggetti con bypass pervio.

**Conclusioni.** I dati ottenuti suggeriscono come uno specifico assetto di MVs circolanti e/o proteine plasmatiche sia associato ad una prognosi negativa del CABG. La valutazione della presenza di tale fenotipo potrebbe quindi essere importante per l'identificazione dei pazienti ad elevato rischio di ristenosi che potrebbero trarre vantaggio da una terapia farmacologica personalizzata.

## IL DEFICIT DI HDL IN TOPI GENETICAMENTE MODIFICATI COMPROMETTE LA MORFOLOGIA CUTANEA: UNO STUDIO STRUTTURALE E ULTRASTRUTTURALE

M. Busnelli<sup>1</sup>, F. Arnaboldi<sup>2</sup>, L. Cornaghi<sup>2</sup>, S. Manzini<sup>1</sup>, C. Parolini<sup>1</sup>, F. Dellerà<sup>1</sup>, G.S. Ganzetti<sup>1</sup>, C.R. Sirtori<sup>1</sup>, E. Donetti<sup>2</sup>, G. Chiesa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano

I lipidi svolgono un ruolo fondamentale nel rendere la cute impermeabile alla perdita d'acqua corporea e nel contrastare le infezioni da parte di microrganismi patogeni. Tali lipidi vengono sia sintetizzati nell'epidermide, un sito attivo di sintesi di colesterolo, acidi grassi e ceramide, sia veicolati alla cute attraverso le lipoproteine plasmatiche. Nell'uomo, diverse condizioni iperlipidemiche si associano a formazione di xantomi o xantelasmi, lesioni cutanee dovute a eccessiva deposizione di lipidi; tuttavia, lesioni xantomatose possono verificarsi anche in soggetti con normale trigliceridemia e colesterolemia LDL, ma con livelli drammaticamente ridotti di HDL. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare gli effetti sulla morfologia cutanea di un deficit di HDL, in modelli murini geneticamente modificati attraverso l'abolizione della sintesi di apolipoproteina A-I e apolipoproteina E.

A questo scopo, topi controllo (C57Bl/6), topi apoE knockout (EKO), topi apoA-I knockout (A-IKO) e topi apoA-I/apoE doppi

knockout (A-IKO/EKO) sono stati alimentati con dieta a basso contenuto di lipidi e colesterolo fino a 30 settimane di età.

La valutazione della cute mediante microscopia ottica ha mostrato che la morfologia cutanea di topi EKO, A-IKO e C57Bl/6 era comparabile e priva di segni patologici, mentre la cute di topi A-IKO/EKO mostrava un aumento dello spessore dermico insieme alla presenza di cellule schiumose e linfociti T nel derma reticolare. Una successiva analisi in microscopia elettronica ha inoltre evidenziato, nei topi A-IKO/EKO, un accumulo di cristalli di colesterolo extracellulari nel derma papillare e nel citoplasma delle cellule schiumose. La valutazione del contenuto cutaneo di lipidi ha confermato un aumento significativo nella quantità di colesterolo libero e di colesterolo esterificato nella cute di topi A-IKO/EKO rispetto a topi controllo, mentre le concentrazioni di trigliceridi e fosfolipidi erano comparabili tra i due genotipi.

In conclusione, topi A-IKO/EKO deficitari di HDL riproducono, per la prima volta, il fenotipo cutaneo riscontrato in pazienti severamente ipolipoproteinemici, e potranno quindi costituire un modello sperimentale per studiare i meccanismi coinvolti nello sviluppo di questa condizione patologica.

## EFFETTO DELL'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA SULL'ESPRESSIONE DI FATTORE TESSUTALE PIASTRINICO E SUL PROFILO PROTEOMICO PLASMATICO IN PAZIENTI CON PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE

P. Canzano<sup>1</sup>, M. Brambilla<sup>1</sup>, M. Brioschi<sup>1</sup>, L. Rossetti<sup>1</sup>, G.C. Marenzi<sup>1</sup>, C. Banfi<sup>1</sup>, G. Teruzzi<sup>1</sup>, D. Trabattoni<sup>1</sup>, M. De Metrio<sup>1</sup>, A. Bartorelli<sup>1</sup>, E. Tremoli<sup>1,2</sup>, M. Camera<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano; <sup>2</sup>Dip. di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

**Introduzione.** I pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) hanno una maggiore incidenza di malattia cardiovascolare (CAD). Un ruolo chiave nello sviluppo delle complicanze trombotiche è svolto dalle piastrine e dal Fattore Tessutale (TF), il principale attivatore della cascata coagulativa. Questa proteina è presente anche nelle piastrine e la sua espressione aumenta significativamente nei pazienti con sindrome coronarica acuta (ACS) rispetto ai pazienti con patologia coronarica stabile (SA). È noto che l'IRC causa cambiamenti nella reattività piastrinica e che, negli stadi più gravi, influenza l'espressione di proteine plasmatiche coinvolte nello sviluppo dell'aterosclerosi. Non sono però presenti dati sul contributo del TF piastrinico al maggiore rischio trombotico, né ci sono studi relativi al proteoma plasmatico di pazienti CAD con danno renale moderato. **Scopo.** Comparare l'espressione di TF piastrinico e il profilo proteomico plasmatico in pazienti con SA e ACS IRC<sup>+</sup>.

**Metodi.** Sono stati arruolati 58 pazienti ACS/IRC<sup>+</sup> e 164 ACS/IRC<sup>-</sup>, e 34 pazienti SA/IRC<sup>+</sup> e 161 SA/IRC<sup>-</sup>. L'espressione di superficie e intracellulare di TF piastrinico è stata valutata mediante citofluorimetria in sangue intero; il profilo proteomico mediante elettroforesi bidimensionale (2-DE) ed ELISA.

**Risultati.** La percentuale di piastrine circolanti che esprimono TF in superficie è significativamente inferiore nei pazienti ACS/IRC<sup>+</sup> rispetto ai pazienti ACS/IRC<sup>-</sup> (3,65%±1,17 e 4,69%±0,8 rispettivamente, p<0,05). Questo si associa ad un'espressione intracellulare di TF significativamente inferiore nei pazienti ACS/IRC<sup>+</sup> rispetto ai pazienti ACS/IRC<sup>-</sup> (19,49%±4,04 e 27,53%±5,16, rispettivamente p<0,001). Un simile trend è presente anche nei pazienti SA/IRC<sup>+</sup> rispetto ai pazienti SA/IRC<sup>-</sup> (superficie: 1,97%±0,57 e 2,87%±0,44 rispettivamente,

$p > 0,05$ ). Nei pazienti IRC<sup>+</sup> (sia SA sia ACS), l'analisi proteomica del plasma ha rivelato differenze significative nell'espressione di Alfa-1-Microglobulina (A1M), proteina anti-ossidante, Retinol Binding Protein 4 (RBP4), coinvolta nelle prime fasi dell'infiammazione e Aptoglobina (HPT), con azione anti-infiammatoria, che aumentano con la gravità della patologia renale. Invece, Fetuina-A, che è coinvolta nell'inibizione della calcificazione vascolare, diminuisce all'aumentare della severità dell'IRC.

**Conclusioni.** La minore espressione di TF piastrinico nei pazienti IRC<sup>+</sup> non suffraga il potenziale protrombotico caratteristico di questi pazienti, ma si va ad aggiungere al quadro di disfunzione piastrinica responsabile delle anomalie emostatiche. L'analisi proteomica plasmatica identifica potenziali meccanismi sia eziopatogenetici sia protettivi in atto nel paziente IRC<sup>+</sup>.

### FUMO DI SIGARETTA E MONOCITI: CONNUBIO PERICOLOSO PER L'ENDOTELIO?

S. Castigliani, S.S. Barbieri, N. Ferri, A. Villa, A. Corsini, S. Bellosta  
*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano*

Il condensato del fumo di sigaretta (CSC) induce disfunzione endoteliale, evento chiave nella formazione della placca aterosclerotica. I monociti circolanti aderiscono all'endotelio danneggiato e migrano nello spazio sotto-endoteliale, dove differenziano a macrofagi e contribuiscono allo sviluppo della placca, accumulando esteri del colesterolo in gocce lipidiche e trasformandosi in cellule schiumose. Dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno evidenziato come il CSC stimoli i monociti a rilasciare fattori chemiotattici proinfiammatori che aumentano il reclutamento e il passaggio di cellule infiammatorie attraverso l'endotelio. Per verificare se il CSC interferisce direttamente sull'interazione fra monociti ed endotelio, abbiamo analizzato gli effetti di CSC (30 ug/mL) e terreni condizionati da monociti incubati (CMCSC) o meno (CM) con CSC su cellule endoteliali umane mediante qPCR. L'esposizione a CM e CMCSC ha determinato un aumento nell'espressione delle molecole di adesione VCAM-1 (+63 e +725% vs controllo per CM e CMCSC, rispettivamente) e ICAM-1 (+36 e +90% vs controllo per CM e CMCSC) e metalloproteasi 3 (MMP-3, +50 e +300% vs controllo per CM e CMCSC) e 9 (MMP-9, +70% e +230% vs controllo per CM e CMCSC). Attraverso il sistema iCELLigence abbiamo evidenziato come l'incubazione con CMCSC modifichi nettamente il passaggio di corrente attraverso il monostato endoteliale, variazione attribuibile ad un'alterazione nella morfologia cellulare e non ad una ridotta vitalità cellulare (misurata con il saggio MTT). Tale alterazione morfologica è stata confermata in immunofluorescenza con falloidina marcata, evidenziando come la F-actina citoscheletrica, nelle cellule endoteliali incubate con CMCSC, sia completamente disorganizzata, variazione accompagnata da una riduzione delle dimensioni del citoplasma (-50%). L'analisi della distribuzione citoscheletrica della beta-catenina, proteina di membrana localizzata a livello delle giunzioni intercellulari, ha evidenziato un simile andamento: nelle cellule trattate con CMCSC le giunzioni intercellulari sono completamente disorganizzate e la beta catenina è diffusa all'interno del citoplasma. Anche l'espressione di Rac-1 è ridotta in presenza di CM e CMCSC (-40 e -60% vs controllo). I risultati ottenuti indicano come il CSC, a concentrazioni non tossiche, stimoli i monociti a secernere fattori solubili che alterano la morfologia dell'endotelio, aumentandone la permeabilità e facilitando la tras migrazione dei monociti, evento cardine nella formazione della placca aterosclerotica.

### UTILIZZO DI STATINE E RISCHIO DI CATARATTA: EVIDENZE DA UN AMPIO STUDIO OSSERVAZIONALE

M. Casula<sup>1</sup>, D. Soranna<sup>2</sup>, G. Corrao<sup>2</sup>, L. Merlino<sup>3</sup>, E. Tragni<sup>1</sup>, A. L. Catapano<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Statistica e Metodi Quantitativi, Sezione di Biostatistica, Epidemiologia e Sanità Pubblica, Università di Milano-Bicocca, Milano; <sup>3</sup>Servizi Territoriali, Regione Lombardia, Milano; <sup>4</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (Milano)

**Contesto.** La cataratta è caratterizzata da opacità del cristallino che può causare deficit visivo, che riguarda soprattutto gli anziani. Alcuni dati preclinici e osservazionali hanno suggerito una possibile correlazione tra l'uso di statine e l'aumento del rischio di cataratta, ma le evidenze ad oggi disponibili sono contrastanti.

**Scopo.** Valutare l'associazione tra esposizione alle statine e ospedalizzazione per cataratta.

**Metodi.** È stato condotto uno studio caso-controllo innestato in una coorte di 134.441 pazienti nella regione Lombardia, di almeno 40 anni, che avevano ricevuto la prima prescrizione di statine nel periodo 2005-2007. I casi erano pazienti ospedalizzati per cataratta entro il 31/12/2012. Sono stati selezionati cinque controlli per ogni caso, appaiati per sesso, età e data della prima prescrizione. L'aderenza alle statine è stata misurata come percentuale di giorni di follow-up coperti dal farmaco prescritto (Proportion of Days Covered - PDC) suddivisa in quattro categorie ( $\leq 24\%$ , 25-49%, 50-74% e  $\geq 75\%$ ). È stato implementato un modello di regressione logistica per stimare l'odds ratio (OR) per l'associazione tra le categorie di PDC e l'insorgenza di cataratta.

**Risultati.** 1334 casi sono stati appaiati a 6601 controlli. L'età media (SD) di casi e controlli era di circa 70 anni (9 anni) e il 51% erano uomini. Si è osservato un lieve ma continuo trend verso un aumentato rischio di cataratta all'aumentare della aderenza alla terapia con statine in modelli di rischio aggiustati, con un OR significativo di 1,19 (IC 95% 1,01-1,40%) per PDC 50-74% e 1,20 (IC 95% 1,02-1,40) per PDC  $\geq 75\%$  vs PDC  $< 25\%$ , rispettivamente. Non c'erano evidenze che l'effetto delle statine sul rischio di cataratta fosse differente in base alla potenza della statina inizialmente prescritta.

**Conclusioni.** La terapia con statine era associata a un modesto aumento del rischio di chirurgia della cataratta. Dato l'ampio margine di beneficio del trattamento con statine, questi dati non modificano le indicazioni prescrittive ma suggeriscono controlli per l'opacità del cristallino nei soggetti in trattamento.

### LE ISTONE DEACETILASI DI CLASSE I REGOLANO L'ACETILAZIONE DI REGIONI "ENHANCER" COINVOLTE NELLA DETERMINAZIONE DEL FENOTIPO METABOLICO DEL TESSUTO ADIPOSO

A. Ferrari, R. Longo, E. Fiorino, D. Porro, S. Barilla, U. Guerrini, M. Crestani

*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano*

**Introduzione e risultati preliminari.** Le istone deacetilasi (HDAC) sono regolatori epigenetici coinvolti nell'omeostasi metabolica. Il nostro laboratorio ha dimostrato che l'inibizione selettiva delle HDAC di

classe I migliora il fenotipo obeso e diabetico in un modello murino di obesità indotta da una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD, 60% di calorie da grassi). In topi HFD trattati con l'inibitore selettivo delle HDAC di classe I MS-275 abbiamo osservato una riduzione del 10% del peso corporeo e una migliore capacità di rimuovere il glucosio dal circolo. L'analisi istologica del tessuto adiposo bianco (WAT) sottocutaneo e viscerale ha mostrato, una significativa riduzione della dimensione cellulare. L'analisi di espressione genica ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei geni marker di funzionalità adipocitaria (Pparg, Fabp4, Glut4, Adipoq) e del marker di tessuto adiposo bruno (BAT) Ucp1, suggerendo un effetto di "browning" del WAT in risposta all'inibizione delle HDAC di classe I.

**Scopo.** Alla luce dei risultati ottenuti in vivo, lo scopo del lavoro è stato investigare il meccanismo tramite il quale MS-275 esercita i propri effetti nel WAT.

**Risultati.** Esperimenti in vitro in un modello di preadipociti (C3H10T1/2) hanno dimostrato che cellule differenziate in presenza di MS-275 mostrano, a fine differenziamento, un'augmentata espressione di Pparg, il principale regolatore del differenziamento adipocitario, e dei suoi principali target (Fabp4, Glut4, Adipoq, Cebpa); il trattamento con MS275 solo nei primi 3 giorni di differenziamento, inoltre, è risultato sufficiente per aumentare l'espressione dei geni sopracitati, suggerendo che l'inibizione delle HDAC di classe I nelle prime fasi del differenziamento adipocitario è sufficiente per riprogrammare il destino dei preadipociti verso un fenotipo più funzionale. Gli esperimenti condotti in questo modello cellulare hanno inoltre confermato che MS-275 induce "browning": determina, infatti, un aumento significativo (6 volte) dell'espressione di Ucp1. Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina in cellule C3H10T1/2 hanno confermato che tra i principali target delle HDAC di classe I si annoverano Pparg ed Ucp1: il trattamento con MS-275 aumenta i livelli acetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (modificazione attivante) in corrispondenza di regioni "enhancers" di questi geni, determinando conseguentemente un aumento della trascrizione genica. La domanda che ci siamo posti è stata quindi quale HDAC di classe I sia maggiormente coinvolta nella regolazione di questi geni nel WAT, e conseguentemente nella determinazione del fenotipo metabolico di quest'organo. Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che gli effetti di MS-275 nel muscolo scheletrico e nel BAT sono mediati dall'inibizione di HDAC3, suggerendola quale potenziale player anche nel WAT. La generazione di una linea murina con delezione specifica di HDAC3 (H3atKO) nel tessuto adiposo ha confermato questa ipotesi: in topi H3atKO abbiamo osservato una forte induzione dell'espressione di Pparg e di Ucp1, cui segue un aumento di altri marker di funzionalità adipocitaria (Glut4, Fabp4, Adipoq) e di BAT (Dio2, Elovl3, Cidea, Ppara).

**Conclusione.** Questi dati dimostrano che le HDAC di classe I, in particolare HDAC3, regolano il profilo metabolico del tessuto adiposo, reprimendo in questo distretto l'attivazione di Ucp1 e la capacità ossidativa del tessuto. Saranno necessari ulteriori studi per valutare se l'inibizione selettiva di HDAC3 possa essere considerata una potenziale strategia terapeutica nel trattamento di disordini metabolici, quali obesità e diabete di tipo 2.

## ETEROGENEITÀ MORFOLOGICA E FUNZIONALE DEI MACROFAGI DIFFERENZIATI IN VITRO: STUDIO IN PAZIENTI CON PATOLOGIA CORONARICA

S. Fiorelli<sup>1</sup>, S. Eligini<sup>1</sup>, N. Cosentino<sup>1</sup>, G. Marenzi<sup>1</sup>, E. Tremoli<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

L'arteriosclerosi è una patologia infiammatoria cronica, dove meccanismi immunitari e fattori di rischio metabolici interagiscono nel generare e promuovere lesioni a carico di arterie di grosso e medio calibro. Tra le cellule infiammatorie che partecipano all'eziopatogenesi della malattia aterosclerotica, i macrofagi svolgono un ruolo fondamentale. Tali cellule sono caratterizzate da un'eterogeneità morfologica e funzionale e la presenza di un particolare fenotipo a livello della placca, può influenzarne la progressione o la regressione. Esperimenti condotti precedentemente, hanno evidenziato che i monociti isolati dal sangue periferico di soggetti sani e differenziati spontaneamente a macrofagi, danno luogo a una popolazione morfologicamente eterogenea con la prevalenza di due morfotipi (tondeggiante ed allungato), presenti in ugual misura. I due diversi morfotipi mostrano caratteristiche funzionali e antigeniche differenti. In particolare, le cellule tonde mostrano un profilo antiinfiammatorio mentre le lunghe hanno proprietà proinfiammatorie.

**Scopo.** Valutazione della prevalenza dei diversi morfotipi di macrofagi derivanti da monociti di pazienti con patologia coronarica (CAD) e loro caratterizzazione dal punto di vista antigenico e funzionale.

**Risultati.** L'analisi morfologica dei macrofagi ottenuti da pazienti CAD ha evidenziato una prevalenza di cellule tondeggianti rispetto a quelle allungate. Nonostante la prevalenza di cellule tonde, i macrofagi dei pazienti CAD mostravano una ridotta capacità di fagocitare cellule apoptotiche (efferocitosi) rispetto alle cellule differenziate da monociti di soggetti sani. Tale riduzione potrebbe essere in parte dovuta alla diminuzione dei livelli di transglutaminasi 2, proteina che svolge un ruolo importante nella formazione del fagosoma. Inoltre, i macrofagi ottenuti dai pazienti CAD mostravano un aumento significativo dei livelli di fattore tissutale (TF), proteina cardine nell'attivazione della cascata della coagulazione. L'aumento di TF si associava a una più rapida generazione di trombina.

**Conclusioni.** Rispetto ai volontari sani, i macrofagi differenziati da monociti circolanti di pazienti CAD presentavano proprietà proinfiammatorie e protrombotiche derivanti dalla ridotta efferocitosi e dall'aumento di TF. Tali caratteristiche suggeriscono che i macrofagi dei pazienti CAD hanno un fenotipo che potrebbe contribuire alla progressione della placca, alla sua attivazione e alla formazione del trombo. La manipolazione farmacologica dei diversi fenotipi macrofagici potrebbe fornire una base per nuove strategie terapeutiche atte a limitare la progressione dell'arteriosclerosi.

## LIVELLI DI VITAMINA B12 E ACIDO FOLICO IN UNA POPOLAZIONE DI BAMBINI CON IPERCOLESTEROLEMIA SEVERA

C. Frattini, C. Pederiva, V. Bonaita, G. Banderali, E. Riva, M. Giovannini

*Clinica Pediatrica, Ospedale San Paolo, Università degli Studi di Milano*

**Scopo.** Abbiamo determinato i valori plasmatici di vitamina B12 e acido folico in una popolazione di bambini con ipercolesterolemia di grado severo afferiti per la prima volta presso il nostro Centro di Dislipidemie Pediatriche. I soggetti in esame provengono tutti da famiglie in cui almeno un parente è affetto da ipercolesterolemia e/o cardiopatia (CAD) e vengono pertanto sottoposti a dieta limitata, con restrizione di fonti lipidiche (carne e latte) senza controllo medico o indicazione specialistica.

**Materiali e metodi.** 186 bambini con ipercolesterolemia severa primitiva (80 maschi e 106 femmine, in età media di 8,7 anni) sono stati valutati al primo accesso presso il nostro Centro. Sono stati con-

siderati: parametri antropometrici, stadio di sviluppo puberale, livelli di colesterolo totale (TC), colesterolo LDL (LDL-C), colesterolo HDL (HDL-C) e trigliceridi (Try) con metodo enzimatico e dopo 12 ore di digiuno; livelli di vitamina B12 e acido folico mediante elettrochemiluminescenza. Abbiamo suddiviso i bambini in due gruppi in relazione allo stadio di sviluppo puberale: 145 (78%) pre-pubere (Tanner =1), 41 (22%) con sviluppo puberale attivato (Tanner >1). I due gruppi non presentavano differenze per quanto concerne le caratteristiche di base e il profilo lipidico. Nessun bambino assumeva alcuna terapia farmacologica o integrazione vitaminica.

**Metodo statistico.** Test T di Student o test di Mann-Whitney per campioni indipendenti.

**Risultati.** I livelli di vitamina B12 (pg/ml) e acido folico (ng/ml) (media±ds) sono risultati rispettivamente: 673,08±245,02 e 7,61±2,82, ovvero nell'intervallo di normalità e senza differenze tra i due sessi; i livelli di vitamina B12 e acido folico nei bambini con Tanner =1 e Tanner >1 sono risultati: 711,40±250,50 vs 566,62±179,62 (p=0,001); 8,10±2,87 vs 6,15±2,31 (p=0,001).

**Conclusioni.** Nella popolazione analizzata i livelli di vitamina B12 e acido folico sono risultati nei limiti, con acido folico ai limiti inferiori. Nei soggetti in corso di sviluppo puberale (Tanner >1) tali valori sono risultati significativamente inferiori rispetto al gruppo pre-pubere (Tanner =1) (p=0,001). Questo potrebbe derivare sia dal ridotto intake per restrizione incontrollata della dieta per tanti anni, sia dall'aumentato fabbisogno di tali vitamine durante questa fase di sviluppo.

## RUOLO DI HDAC7 NELLA REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI DEL COLESTEROLO IN VIVO

R. Longo<sup>1</sup>, E. Fiorino<sup>1</sup>, A. Ferrari<sup>1</sup>, C. Multineddu<sup>1</sup>, M. Giudici<sup>2</sup>, N. Mitro<sup>3</sup>, F. Gilardi<sup>3</sup>, E. Scotti<sup>4</sup>, D. Caruso<sup>1</sup>, E. De Fabiani<sup>1</sup>, M. Crestani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; <sup>3</sup>University of Lausanne, Center for Integrative Genomics, Lausanne, Switzerland; <sup>4</sup>Institute of Molecular Health Sciences, ETH Zurich, Switzerland

**Introduzione e risultati preliminari.** Ipercolesterolemia costituisce uno tra i più importanti fattori di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. In questa prospettiva una comprensione più profonda dei meccanismi che sottendono l'omeostasi del colesterolo è fondamentale. La via di eliminazione del colesterolo quantitativamente più importante è la sua conversione in acidi biliari e il colesterolo 7 $\alpha$ -idrossilasi, codificata dal gene *CYP7A1*, è l'enzima limitante di questa via biosintetica. Studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che gli acidi biliari inducono la traslocazione di HDAC7 nel nucleo e il conseguente reclutamento di un complesso repressivo sul promotore di *Cyp7a1*, suggerendo un ruolo peculiare di HDAC7 nella repressione trascrizionale di *CYP7A1* (Mitro et al., 2007).

**Scopo.** Per indagare il ruolo di HDAC7 *in vivo* è stata generata una linea murina *knock out* di *Hdac7* nel fegato (H7livKO). I topi H7livKO sono stati nutriti con una dieta "western type" per verificare l'effetto della delezione di *Hdac7* sul metabolismo del colesterolo nel fegato.

**Risultati.** L'ablazione di *Hdac7* incrementa l'espressione del gene *Cyp7a1* di due volte, portando, di conseguenza, ad un incremento della sintesi di acidi biliari, come dimostrato dall'aumentato contenuto di acidi biliari nel fegato, nel plasma e nelle feci. In particolare, nel fegato è stato riscontrato un aumento di acidi biliari idrofi-

lici (acidi muricolici,  $\alpha$ MCA e  $\beta$ MCA, e di acido ursodesossicolico, UDCA) i quali, secondo quanto dimostrato in letteratura, potrebbero contribuire a proteggere la funzionalità epatica. L'espressione di FXR e del suo target FGF15 aumenta rispettivamente di 1,4 e circa 2 volte nell'intestino dei topi H7livKO, confermando funzionalmente l'aumentata sintesi di acidi biliari. Tuttavia l'aumentata espressione di FGF15, un noto repressore della trascrizione, non riduce la trascrizione di *Cyp7a1* in quanto nei topi H7livKO i livelli di espressione del suo recettore epatico FGFR4 sono diminuiti di 3,5 volte. La delezione di *Hdac7* comporta una riduzione del 25% del colesterolo totale nel plasma e del 30% di quello epatico, evidenziando anche una protezione verso lo sviluppo di steatosi epatica. Inoltre nei topi H7livKO si riscontra una riduzione di marcatori proinfiammatori come IL1 $\beta$  e iNOS, suggerendo che la delezione di *Hdac7*, riducendo il contenuto lipidico epatico, possa prevenire la progressione della steatosi epatica in steatoepatite.

**Conclusioni.** Complessivamente questi studi dimostrano che nel fegato HDAC7 ha un ruolo cruciale nella repressione della conversione del colesterolo in acidi biliari e la sua delezione migliora la funzionalità epatica e riduce l'ipercolesterolemia in un modello murino di alterazione del metabolismo epatico del colesterolo.

(Finanziato da FP6 SOUTH LSHM-CT2006-037498, CARIPLO2008 2008.2511 e FP7 HUMAN 602757).

## RUOLO DELLA LIPOPROTEINA X NELLO SVILUPPO DELLA MALATTIA RENALE IN UN MODELLO DI DEFICIT DI LCAT

F. Lucca<sup>1</sup>, A. Ossoli<sup>1</sup>, C. Vitali<sup>1</sup>, G. Franceschini<sup>1</sup>, A.T. Remaley<sup>2</sup>, L. Calabresi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Lipoprotein Metabolism Laboratory, NHLBI, NIH, Bethesda, MD, United States

L'enzima Lecitina: colesterolo Aciltransferasi (LCAT) è l'unico enzima nell'uomo in grado di esterificare il colesterolo circolante nel plasma e gioca un ruolo chiave nel processo di trasporto inverso del colesterolo. La totale assenza di attività dell'enzima porta allo sviluppo di una patologia chiamata Familial LCAT Deficiency (FLD), caratterizzata da un'alterazione nel profilo lipidico e lipoproteico, opacità corneale, anemia e danno renale; il danno renale rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nei soggetti affetti da FLD. Le cause che portano alla comparsa della malattia renale sono tutt'ora sconosciute, tuttavia sembra che la presenza in circolo di una lipoproteina anomala chiamata LpX sia correlata allo sviluppo della patologia renale nei soggetti affetti da FLD.

In laboratorio è stata sintetizzata *in vitro* una particella LpX sintetica che mantenga struttura e composizione in lipidi e lipoproteine analoghe a quella della LpX isolata da pazienti affetti da FLD. Gli effetti tossici della LpX sintetica sono stati verificati tramite iniezione in topi wild-type e LCAT KO. L'iniezione di LpX sintetica ha causato un'alterazione del normale profilo lipidico e lipoproteico in entrambi i modelli murini presi in esame. Inoltre i topi LCAT KO iniettati hanno mostrato un aumento del rapporto microalbumina/creatinina nelle urine, indice di marker di danno renale; di contro non i topi wild-type iniettati con LpX, né i topi LCAT KO iniettati con soluzione salina hanno mostrato cambiamenti significativi. Un'analisi in microscopia confocale ha mostrato la presenza di LpX fluorescente a livello del rene dei topi LCAT KO iniettati, che sembra quindi essere l'organo deputato alla captazione della LpX; inoltre analisi in microscopia elettronica hanno mostrato la presenza di danni a livello della membrana glomerulare

basale, coerenti con i danni riscotrati in pazienti affetti da FLD. Al contrario nei topi wild-type trattati con LpX non è stata rivelata alcuna anomalia morfologica clinicamente rilevante.

In conclusione la presenza di LpX sembra essere direttamente coinvolta nella patogenesi della glomerulosclerosi in soggetti affetti da FLD e la totale assenza di attività enzimatica di LCAT è cruciale nello sviluppo del danno renale in presenza di LpX.

## LA DELEZIONE EPATO-SPECIFICA DEL GENE PPAP2B AGGRAVA L'ATEROSCLEROSI IN TOPI APOE<sup>-/-</sup>

S. Manzini<sup>1</sup>, M. Busnelli<sup>1</sup>, G.S. Ganzetti<sup>1</sup>, C. Parolini<sup>1</sup>, M. Hilvo<sup>2</sup>, R. Hurme<sup>2</sup>, M. Jänis<sup>2</sup>, F. Dellera<sup>1</sup>, R. Laaksonen<sup>2</sup>, G. Chiesa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Zora Biosciences Oy, Biologinkuja, Espoo, Finland

La fosfatasi dei lipidi fosfati 3 (*lipid phosphate phosphatase 3*, LPP3), codificata dal gene PPAP2B, è un enzima ubiquitario che defosforila diversi substrati lipidici. Studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) identificano PPAP2B come un gene che gioca un ruolo chiave nella suscettibilità alla malattia coronarica (CAD). Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'effetto del *knockout* di Ppap2b sullo sviluppo di aterosclerosi nel modello murino ApoE *knockout* (apoE<sup>-/-</sup>), prono allo sviluppo di questa patologia. Poiché l'eliminazione costitutiva di Ppap2b nei topi risulta in un fenotipo embriofetale, sono stati generati dei topi condizionali con *knockout* di Ppap2b specifico a livello degli epatociti, generati mediante l'incrocio di topi con Ppap2b floxato (Ppap2b<sup>f/f</sup>) con topi che esprimono Cre ricombinasi sotto il controllo del promotore epato-specifico del gene di Albumina (Alb). Questi topi sono stati infine incrociati con topi apoE<sup>-/-</sup>, ottenendo topi Ppap2b<sup>f/f</sup>/apoE<sup>-/-</sup>/Alb-Cre<sup>+</sup> e topi Ppap2b<sup>f/f</sup>/apoE<sup>-/-</sup>/Alb-Cre<sup>-</sup>, questi ultimi utilizzati come controllo.

Topi di entrambi i genotipi sono stati alimentati a dieta chow o Western, rispettivamente per 40 o 12 settimane. Al termine dei trattamenti dietetici, è stato valutato lo sviluppo di aterosclerosi ed è stata eseguita un'analisi lipidomica sul plasma. A dieta Western, topi Ppap2b<sup>f/f</sup>/apoE<sup>-/-</sup>/Alb-Cre<sup>+</sup> hanno sviluppato lesioni aterosclerotiche con un'estensione significativamente maggiore sia a livello del seno aortico, sia a livello dell'aorta rispetto a topi Ppap2b<sup>f/f</sup>/apoE<sup>-/-</sup>/Alb-Cre<sup>-</sup>. L'analisi lipidomica ha inoltre dimostrato come la delezione epato-specifica del gene Ppap2b aumenti in modo significativo le concentrazioni plasmatiche dei lipidi che giocano un ruolo nello sviluppo di aterosclerosi, come lactosilceramidi, acido lisofosfatidico, lisofosfatidil inositolo e globotriosil ceramide. In conclusione, lo studio dimostra per la prima volta che l'ablazione di Ppap2b a livello epatico è associata ad un aggravamento dello sviluppo di aterosclerosi e supporta l'osservazione clinica degli GWAS relativa al gene PPAP2B, per quanto riguarda la suscettibilità a CAD. Infine, l'analisi lipidomica suggerisce che la delezione di Ppap2b può promuovere lo sviluppo di aterosclerosi aumentando i livelli plasmatici di diverse specie lipidiche pro-aterogene, fornendo così una base molecolare per i risultati osservati.

## LA PENTRAXINA LUNGA 3 (PTX3) SVOLGE UN RUOLO CHIAVE NELL'IMMUNO-MODULAZIONE DELL'OBESITÀ INDOTTA DA DIETA AD ALTO CONTENUTO DI GRASSI NEL TOPO

A. Moregola<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, U. Guerrini<sup>1</sup>, E. Bonavita<sup>2</sup>, C. Garlanda<sup>2</sup>, A. Mantovani<sup>2,3</sup>, A.L. Catapano<sup>1,4</sup>, G.D. Norata<sup>1,5,6</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>IRCCS Humanitas Research Foundation (Rozzano, Milano); <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano; <sup>4</sup>IRCCS Multimedia, Milano; <sup>5</sup>Centro SISA per lo studio dell'aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (Milano); <sup>6</sup>William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University (Londra)

**Scopo.** La sindrome metabolica e l'obesità sono caratterizzate da uno stato di infiammazione cronica moderata. Scopo di questo lavoro è stato studiare il ruolo di PTX3, una componente essenziale del braccio umorale dell'immunità innata, durante l'obesità.

**Metodi e risultati.** PTX3 KO e WT littermates sono stati sottoposti a dieta arricchita in grassi (Kcal fornite dai grassi pari al 45%) per 20 settimane. Durante il periodo sperimentale gli animali PTX3 KO hanno mostrato un minor guadagno di peso rispetto agli animali WT (AUC guadagno di peso 147,22 vs 182,91; p<0,05). L'analisi mediante risonanza magnetica per imaging (MRI) ha mostrato, sia a 10 che a 20 settimane di dieta, una deposizione di tessuto adiposo, viscerale (VAT) e sottocutaneo (SCAT) significativamente inferiore nei PTX3 KO, associato anche ad una minor ipertrofia degli adipociti. Esperimenti di tolleranza al glucosio e all'insulina hanno escluso un ruolo diretto di PTX3 nell'omeostasi del glucosio. Al sacrificio è stato effettuato l'immunofenotyping degli animali tramite citofluorimetria e l'analisi dell'espressione genica, focalizzando l'attenzione sulla risposta infiammatoria nel tessuto adiposo. Nel VAT degli animali PTX3 KO è stata osservata una ridotta infiltrazione di monociti/macrofagi (p<0,05), e ridotta espressione di MCP-1 e IL-6, citochine pro-infiammatorie, oltre che un aumento di espressione di CD31 e VEGF, marker dell'angiogenesi. L'analisi dei macrofagi isolati tramite sorter dal VAT mostra un aumento dell'espressione di molecole associate ai macrofagi M2 (Arg, YM1) negli animali PTX3 KO rispetto agli animali controllo.

**Conclusioni.** La mancanza di ptx3 risulta in un ridotto sviluppo di obesità nei modelli animali. Questo effetto sembra essere una conseguenza della ridotta infiltrazione di monociti/macrofagi nel VAT e dell'aumentata polarizzazione di questi verso un profilo di tipo anti-infiammatorio.

## ASSOCIAZIONE TRA LA CONCENTRAZIONE DI SUBSETS MONOCITARI CIRCOLANTI E SEGNI DI NEOVASCOLARIZZAZIONE NELL'ATEROSCLEROSI CAROTIDEA

F. Moroni<sup>1</sup>, E. Ammirati<sup>1,2</sup>, M. Magnoni<sup>1</sup>, S. Di Terlizzi<sup>3</sup>, C. Villa<sup>3</sup>, F. Sizzano<sup>3</sup>, F. Tripiciano<sup>4</sup>, I. Scotti<sup>5</sup>, L. Gianolli<sup>6</sup>, E. Busnardo<sup>6</sup>, O. Rimoldi<sup>6</sup>, P. Camici<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Cardioracovasculari, Istituto Scientifico San Raffaele e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento Cardioracico e Vascolare, AO Niguarda Ca' Granda, Milano;

<sup>3</sup>FRACAL - Flow Cytometry Resource Advanced Cytometry Technical Applications Laboratory, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano;

<sup>4</sup>Servizio di Ematologia e Medicina Trasfusionale, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano; <sup>5</sup>Dipartimento di Reumatologia, Istituto Ortopedico Gaetano Pini, Milano; <sup>6</sup>U.O. Medicina Nucleare e Centro PET, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano

58 pazienti asintomatici consecutivi, con stenosi carotidea <70%, sono stati sottoposti a esame ecocolor Doppler ed eco-contrastografico (CEUS) delle carotidi. Sono stati registrati l'entità della massima stenosi, il carico aterosclerotico totale misurato come total plaque area (TPA) ed il numero di placce con evidenza di neovascolarizza-

zione all'esame CEUS. È stata altresì effettuata l'analisi in citometria a flusso policromatica delle sottopopolazioni monocitarie circolanti sulla base dell'espressione di CD14 e CD16. Sono state identificate 4 popolazioni monocitarie principali: monociti CD14<sup>+</sup>; monociti classici CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>; monociti intermedi CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>; monociti non classici CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. Per ogni popolazione è stata identificata la frazione attivata sulla base dell'espressione di HLA-DR. Un sottogruppo di 7 pazienti è stato altresì sottoposto ad imaging ibrido con tomografia ad emissione di protoni e tomografia computerizzata (PET/CT), usando 11C-PK11195, in grado di marcare selettivamente i macrofagi attivati. Per ciascun paziente è stato registrato lo standardized uptake value (SUV) per 11C-PK11195 nella placca determinante la massima stenosi. L'età media dei soggetti era 68 anni, il 53% erano maschi. Il rischio cardiovascolare a 10 anni stimato con lo score Framingham in media era 11%. L'evidenza di neovascolarizzazione di placca nel distretto carotideo è risultata associata a una ridotta concentrazione di monociti CD14<sup>+</sup> e di monociti classici CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,039$  e  $p=0,029$ , rispettivamente). Nel sottogruppo sottoposto a PET/CT, le frazioni attivate HLA-DR<sup>+</sup> delle stesse popolazioni monocitarie sono risultate inversamente associate al SUV per 11C-PK11195 ( $r=-0,786$ ,  $p=0,048$ ). I monociti non classici CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> sono risultati inversamente correlati con il SUV di placca ( $r=-0,883$ ,  $p=0,012$ ).

In conclusione, questi risultati suggeriscono una ridistribuzione differenziale delle popolazioni monocitarie, specialmente quelle attivate, all'interno di placche con elevata attività infiammatoria. L'associazione con la neovascolarizzazione inoltre permette di avanzare l'ipotesi che tale ridistribuzione possa avvenire proprio attraverso i neovasi all'interno delle lesioni.

## RUOLO DI SOCS3 E TNF- $\alpha$ NELLA DE NOVO LIPOGENESI E NELL'INDUZIONE DI PCSK9 IN CELLULE HEPG2

C. Ricci<sup>1</sup>, M. Ruscica<sup>1</sup>, C. Macchi<sup>1</sup>, P. Magni<sup>1</sup>, R. Cristofani<sup>1</sup>, A. Corsini<sup>1,2</sup>, N. Ferri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Multimedica IRCCS, Milano

Le proteine SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling), regolatori negativi della JAK/STAT pathway, vengono attivate dalle citochine proinfiammatorie, tra cui il TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ). SOCS3, in particolare, è coinvolto nell'ipertrigliceridemia associata all'insulino resistenza, così come i livelli di PCSK9 (Pro-protein Convertase Subtilisin Kexine type 9) correlano positivamente ad insulino resistenza e concentrazioni plasmatiche di VLDL-TG (very low-density lipoprotein-triglycerides). Sulla base di queste premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare un possibile ruolo del TNF- $\alpha$  e della JAK/STAT pathway sulla de novo lipogenesi e sull'espressione di PCSK9 in HepG2. Il TNF- $\alpha$  induce in maniera concentrazione e tempo-dipendente l'espressione di SOCS3 e PCSK9, tale effetto è inibito a seguito della trasfezione con siRNA anti STAT3, suggerendo il coinvolgimento della JAK/STAT pathway. Per approfondire tale osservazione, abbiamo generato una linea cellulare di HepG2 sovraesprimente SOCS3. Come atteso, SOCS3 ha determinato una completa abrogazione della fosforilazione di STAT3, accompagnata da un aumento dei livelli di PCSK9 mRNA (3,48 $\pm$ 0,35 volte) e proteina intracellulare (1,53 volte) e secreta (2,18 $\pm$ 1,13 volte), senza variazioni significative dell'attività del suo promotore. Il ruolo di SOCS3 nella regolazione di PCSK9 è stato ulteriormente dimostrato mediante l'utilizzo di un siRNA

specifico per SOCS3, che ha ridotto l'espressione genica di PCSK9 (0,40 $\pm$ 0,10 volte), mentre il siRNA anti STAT3 ha prodotto l'effetto opposto (aumento di mRNA di 2,08 $\pm$ 0,30 volte). In associazione con queste variazioni, si è osservato aumento nell'espressione dei principali geni coinvolti nella de novo lipogenesi, quali sintasi degli acidi grassi, (mRNA aumentato di 3,59 $\pm$ 0,40 volte), steroil-CoA desaturasi (mRNA aumentato di 1,92 $\pm$ 0,12 volte e proteina di 3,81 $\pm$ 0,75 volte) ed apoB (mRNA aumentato di 4,08 $\pm$ 0,41 volte). A questo effetto si associano l'attivazione di SREBP-1, l'aumento dell'accumulo intracellulare di trigliceridi (22,1 $\pm$ 7,1  $\mu$ g/mg di proteina vs 38,3 $\pm$ 9,1  $\mu$ g/mg di proteina) e della secrezione di ApoB (3,47 $\pm$ 0,09 volte). Infine, la stimolazione con insulina ha prodotto un effetto additivo con la sovraespressione di SOCS3, causando un ulteriore aumento di PCSK9, SREBP1 e dei geni legati alla de novo lipogenesi, ed esso correlati. In conclusione, il presente studio candida PCSK9 come gene coinvolto nel metabolismo lipidico regolato dalla citochina proinfiammatoria TNF- $\alpha$ , in modo SOCS3 dipendente.

## INFLUENZA DELL'OXLDL SUL FENOTIPO DELLA CARDIOMIOPATIA ARITMOGENA

L. Arnaboldi<sup>2</sup>, I. Stadiotti<sup>1</sup>, S. Brambilla<sup>1</sup>, F. Cattaneo<sup>1</sup>, A. Corsini<sup>2</sup>, G. Pompilio<sup>1</sup>, C. Tondo<sup>1</sup>, E. Sommariva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Cardiologico Monzino, Vascular Biology and Regenerative Medicine Lab., Milano; <sup>2</sup>Università degli Studi di Milano, DISFeB

La Cardiomiopatia Aritmogena (ACM), malattia genetica caratterizzata da sostituzione fibro-adiposa del miocardio ventricolare, si manifesta con tachicardie ventricolari e morte improvvisa anche in soggetti giovani e atletici. Sono stati identificati diversi geni causativi, tra cui PKP2, ma penetranza ed espressività variabili suggeriscono il coinvolgimento di altri fattori genetici, epigenetici ed ambientali. In una casistica di 16 pazienti ACM consecutivi ricoverati al Centro Cardiologico Monzino abbiamo osservato aumenti nel colesterolo totale (211,3 $\pm$ 8,0 vs 185,0 $\pm$ 6,8;  $p=0,020$ ), LDL (133,4 $\pm$ 30,8 vs 111,1 $\pm$ 20,7;  $p=0,031$ ) e oxLDL (217,1 $\pm$ 88,5 vs 106,9 $\pm$ 36,6) plasmatici, rispetto a controlli sani paragonabili per sesso ed età. Si ipotizza quindi che lievi dislipidemie e stress ossidativo, indotto anche dall'esercizio fisico, possano essere cofattori dell'ACM.

Utilizzando cellule stromali mesenchimali cardiache (C-MSC) come modello in vitro di ACM (Sommariva et al., Eur Heart J, under revision) abbiamo dimostrato che un acido grasso ossidato, il 13HODE, che si ritrova anche nelle LDL, favorisce l'accumulo lipidico specificamente in C-MSC ACM ( $n=3$ ; 259,8 $\pm$ 42,5 vs 135,5 $\pm$ 24,4;  $p=0,019$ ), mentre l'attività antiossidante della N-acetilcisteina lo inibisce (21,3 $\pm$ 6,9 vs 105,3 $\pm$ 77,3;  $p=0,007$ ). Il 13HODE è un noto attivatore di PPAR $\gamma$  (Itoh et al., Nature structural & molecular biology 2008), uno dei principali regolatori dell'adipogenesi. Un'attivazione trascrizionale di PPAR $\gamma$  nelle cellule ACM ( $n=5$ ; 5,0 $\pm$ 1,3 vs 1,4 $\pm$ 0,7;  $p=0,044$ ) è stata osservata in parallelo a quella di CD36 (116,0 $\pm$ 67,8 vs 1,8 $\pm$ 0,5;  $p=0,042$ ), recettore delle oxLDL, la cui espressione è PPAR $\gamma$ -dipendente (Nicholson and Hajjar. Vascular pharmacology 2004).

Anche se il modello murino di ACM PKP2-KO non accumula adipociti nel cuore (Cerrone et al., Cardiovasc Res 2012) probabilmente per un meccanismo intrinseco di protezione, le loro C-MSC però sono predisposte in vitro all'accumulo lipidico maggiore rispetto ai controlli (22,8 $\pm$ 2,5% vs 12,7 $\pm$ 3,1%;  $p=0,015$ ). Somministrando ai topi ACM ( $n=5$ ) una dieta ad alto contenuto di grassi, (riportata aumentare le LDL circolanti; Sung et al., BMC complementary and alternative medicine 2014) abbiamo osservato una sostituzione fibro-adiposa in vivo.

Possiamo quindi ipotizzare che una mutazione nei geni ACM sia necessaria ma non sufficiente per la manifestazione severa della patologia e che elevati LDL plasmatiche e stress ossidativo siano cofattori della patogenesi. Analisi di lipidomica sono in corso per comprendere tali meccanismi.

### IL TRATTAMENTO CON ASA, INIBENDO L'ESPRESSIONE DEL FATTORE TISSUTALE CON UN MECCANISMO TROMBOSSANO DIPENDENTE, RIDUCE LA PROPENSIONE ALLO SVILUPPO DI TROMBI VENOSI NEL TOPO

E. Tarantino<sup>1</sup>, P. Amadio<sup>1</sup>, V. Cavalca<sup>2</sup>, B. Porro<sup>2</sup>, I. Squellerio<sup>2</sup>, E. Tremoli<sup>2,1</sup>, S.S Barbieri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Centro Cardiologico Monzino, IRCCS Milano

I processi fisiopatologici responsabili della trombosi venosa e di quella arteriosa sono da sempre ritenuti differenti, tanto da considerare queste due patologie ben distinte. Tuttavia, recenti studi epidemiologici hanno suggerito un'associazione tra trombosi venosa e aterosclerosi. Pazienti con aterosclerosi, infatti, manifestano un'aumentata tendenza a sviluppare fenomeni tromboembolici; inoltre fattori trombogenici sono coinvolti nello sviluppo dell'aterosclerosi. In questo contesto, come suggerito da alcuni recenti studi, farmaci comunemente utilizzati nel trattamento dell'aterosclerosi, quali antiaggreganti piastrinici e statine, potrebbero rappresentare un approccio alternativo o di supporto alla classica terapia antiacoagulante utilizzata nella trombosi venosa. Tuttavia, come questi farmaci possano prevenire fenomeni di tromboembolismo e trombosi venosa non è ancora del tutto chiaro.

Scopo dello studio è stato quello di valutare se l'acido acetil salicilico (ASA) è in grado di ridurre/prevenire la formazione di un trombo venoso in un modello murino, ed i potenziali meccanismi molecolari responsabili di tale effetto.

Il trattamento con ASA (3 mg/kg) è in grado di ridurre:

- le dimensioni del trombo venoso indotto mediante legatura della vena cava inferiore (IVC);
- l'attività del fattore tissutale nelle microparticelle plasmatiche (MP-TF);
- i livelli urinari di 2,3-dinor Thromboxane B2 (TXB-M), rispetto ai topi controllo.

Interessante notare la correlazione positiva emersa tra la dimensione del trombo e l'attività di MP-TF plasmatiche, e tra l'attività delle MP-TF plasmatiche e i livelli di TXB-M urinari. Inoltre, una riduzione nel numero di monociti e di cellule TF-positive è osservata nei trombi degli animali trattati con ASA. Studi in vitro su macrofagi peritoneali murini dimostrano che il trattamento con SQ 29,548 (antagonista selettivo del recettore del trombossano) previene completamente l'aumento dell'attività del TF indotto da I-BOP (analogo stabile del trombossano), e dal surnatante di piastrine attivate (sPLT). In conclusione, il trattamento con ASA, mediante la soppressione di trombossano, riduce le dimensioni del trombo venoso, con un meccanismo dipendente dall'inibizione dell'attività del TF nei monociti/macrofagi.

Questo nuovo meccanismo d'azione dell'ASA crea una possibile relazione tra attivazione piastrinica e l'insorgenza di aterotrombosi/trombosi venosa, ponendo le basi per un possibile utilizzo di tali farmaci anche nel trattamento di quest'ultima patologia.

### ATORVASTATINA RIDUCE IN VIVO L'ESPRESSIONE DEL GENE EGR1 NEI PAZIENTI CON SINDROME CORONARICA ACUTA

C. Zara<sup>1,2</sup>, A. Severino<sup>1</sup>, D. Flego<sup>1</sup>, S. Ucci<sup>1</sup>, F. Trotta<sup>1</sup>, D. Pedicino<sup>1</sup>, A.F. Giglio<sup>1</sup>, L.M. Biasucci<sup>1</sup>, G. Liuzzo<sup>1</sup>, F. Crea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università Cattolica del Sacro Cuore, Dipartimento di Medicina Cardiovascolare, Roma; <sup>2</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano

**Introduzione.** Le statine, oltre a ridurre la sintesi di colesterolo, hanno effetti anti-infiammatori e immuno-regolatori, che potrebbero, almeno in parte, spiegare i loro effetti benefici nella sindrome coronarica acuta. In un precedente studio *ex vivo*, atorvastatina migliorava il profilo funzionale delle cellule T CD4+ isolate da pazienti con sindrome coronarica acuta "naive" alle statine e come emerso da un'analisi di PCR-arrays, comprendenti numerosi geni, riduceva marcatamente l'espressione del gene di risposta precoce EGR1 (early growth response gene 1). EGR1 è un fattore di trascrizione con una rapida cinetica di espressione che regola positivamente una vasta gamma di geni pro-infiammatori, mentre a livello post-trascrizionale regola negativamente l'espressione dell'interleuchina-10, citochina con azione anti-infiammatoria. Si può ipotizzare, pertanto, che EGR1 possa mediare gli effetti immuno-regolatori dell'atorvastatina nella sindrome coronarica acuta.

**Scopo dello studio.** Per verificare gli effetti in vivo dell'atorvastatina su EGR1, è stata analizzata la sua espressione genica e proteica nelle cellule T CD4+ isolate da 10 pazienti con sindrome coronarica acuta "naive" alle statine a livello basale, ovvero prima della terapia con statine (T0), e dopo 24 h (T24) e 48 h (T48) di terapia con atorvastatina 80 mg/giorno.

**Risultati.** Dall'analisi dei risultati della qPCR è emerso che l'atorvastatina riduce l'espressione in vivo dell'mRNA di EGR1 da un valore medio di 26,7±5,7 fold expression (media±S.E.M.) a T0, ad un valore medio di 8,5±1,9 fold expression (media±S.E.M.) a T24h (p=0.01) e 5,9±2,1 fold expression (media±S.E.M.) dopo 48 h di terapia (P=0,005). In aggiunta, si osserva una riduzione significativa dei livelli proteici di EGR1 dopo 48 h di terapia con atorvastatina 80 mg/giorno.

**Conclusione.** Gli effetti anti-infiammatori dell'atorvastatina in pazienti con sindrome coronarica acuta possono essere associati, almeno in parte, alla diretta inibizione del fattore di trascrizione EGR1. Questi risultati potrebbero offrire una spiegazione del perché le statine hanno effetti benefici nella fase precoce del manifestarsi della sindrome coronarica acuta.

## POSTER MODERATI

### STUDIO DEL MECCANISMO D'AZIONE DELL'EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO DI DONATORI DI OSSIDO D'AZOTO (FUROSSANI) IN CELLULE MUSCOLARI LISCE. VIA LIBERA PER UN POSSIBILE APPROCCIO ANTIATEROSCLEROTICO INNOVATIVO?

L. Arnaboldi<sup>1</sup>, L. Cannizzaro<sup>1</sup>, M. Lombardi<sup>1</sup>, B. Rolando<sup>2</sup>, L. Lazzarato<sup>2</sup>, R. Fruttero<sup>2</sup>, A. Gasco<sup>2</sup>, A. Corsini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Torino

L'aterosclerosi è una patologia caratterizzata da ossidazione, alterata produzione di NO e proliferazione delle cellule muscolari lisce

(CML) nella tonaca intima vascolare. Per cercare nuovi approcci farmacologici in grado di controllarla, abbiamo sintetizzato molecole NO-donatrici (furossani) in grado di rilassare il tessuto aortico in modo NO-dipendente e di inibire la proliferazione di CML. Sulla base della struttura del 4-fenil-1,2,5-ossadiazol-N-ossido (4-fenil-furossano), dai nostri studi è stato possibile evidenziare come l'entità dell'effetto antiproliferativo sia direttamente correlata al crescere del potere elettronattrattore del sostituente in posizione 3 dell'anello aromatico. Esperimenti condotti sui corrispondenti composti nor-derivati 4-fenil-1,2,5-ossadiazoli (furazani) hanno dimostrato invece una potenza inibitoria pressoché nulla. Siccome le nostre evidenze sperimentali escludono che l'attività antiproliferativa dei furossani sulle CML sia mediata da NO attraverso la via della guanilato ciclasi o delle poliamine, abbiamo valutato se l'effetto farmacologico di tali molecole fosse ancora presente in seguito a trattamento concomitante con NO-scavenger classici (globuli rossi, emoglobina). Queste molecole, sembrano riuscire a prevenire l'effetto antiproliferativo dei furossani, ma tale effetto è aspecifico, soprattutto in quanto presentano gruppi tiolici, in grado di degradare le molecole, senza farle giungere al bersaglio. Dopo aver saggiato anche la cobalamina (inefficace), ci stiamo rivolgendo alla valutazione degli effetti del PTIO, NO-scavenger senza tioli: gli esperimenti sono in corso. Dal momento che non possiamo escludere che l'effetto antiproliferativo dei furossani non sia (o quantomeno parzialmente) NO-dipendente), ci siamo orientati verso un approccio proteomico più complesso e sistematico. Mediante elettroforesi mono- e bidimensionale dei lisati cellulari ed analisi di immagine stiamo evidenziando possibili bersagli proteici ed enzimatici, per poi passare alla spettrometria di massa. Modificazioni biologiche apportate dai furossani (iperepressione, fosforilazione, S-nitrosilazione di proteine implicate nella fase G1/S del ciclo cellulare) potrebbero essere le responsabili dell'effetto antiproliferativo. Una volta conosciuto il meccanismo d'azione di queste interessanti molecole, esse potranno essere utilizzate come antiproliferativi, o essere ibridate con altri farmacofori per un approccio più innovativo nella terapia dell'aterosclerosi.

## L'ATEROSCLEROSI SUBCLINICA SIA ASSOCIATA CON LO SPESSORE DI TESSUTO ADIPOSO EPICARDICO E CON LA STEATOSI EPATICA NELLA POPOLAZIONE GENERALE

A. Baragetti<sup>1,2</sup>, G. Pisano<sup>3</sup>, C. Bertelli<sup>3</sup>, K. Garlaschelli<sup>1</sup>, L. Grigore<sup>1</sup>, A.L. Fracanzani<sup>3</sup>, S. Fargion<sup>3</sup>, G.D. Norata<sup>2,4</sup>, A.L. Catapano<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan; <sup>2</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Centro Studi Malattie Metaboliche del Fegato - Cà Granda IRCCS Fondazione Ospedale Policlinico, Milan; <sup>4</sup>William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry Queen's Mary University, London, United Kingdom; <sup>5</sup>Multimedia Hospital, IRCCS, Sesto San Giovanni, (Milan)

**Introduzione e scopo.** L'obesità addominale e la steatosi epatica sono depositi di grasso ectopico associate con la Sindrome Metabolica. Lo spessore di tessuto adiposo epicardio (EFT) è un nuovo marcatore di grasso ectopico, maggiore nei soggetti obesi, nei diabetici e in presenza di disturbi cardio-metabolici. Pertanto abbiamo valutato se differenti marcatori di grasso ectopico, e l'EFT in particolare, sono associati con la MetS e i marcatori di malattia cardiovascolare subclinica nella popolazione generale.

**Materiali e metodi.** Sono stati inclusi 868 soggetti dello studio PLIC e di questi sono state raccolte le informazioni cliniche, cardio-metaboliche e la storia farmacologica. Informazioni sull'EFT, la presenza di calcificazione aortiche addominali, lo spessore medio-intimale carotideo (c-IMT) e su altri parametri ecocardiografici sono stati ottenuti tramite ultrasonografia; il danno vascolare subclinico è stato definito per la presenza di lesioni aterosclerotiche sia in sede carotidea sia a livello aortico. La presenza di steatosi epatica è stata definita secondo un sistema di scoring validato. L'adiposità addominale è stata quantificata tramite assorbimetria duale a raggi-X (DEXA).

**Risultati.** Indipendentemente dall'età, le donne presentavano valori più alti di EFT rispetto agli uomini (4,5 (0,20-9,00) mm vs 4,00 (0,10-8,00) mm,  $p=0,013$ ); EFT era più spesso nelle donne in menopausa (indipendentemente dalla terapia ormonale sostitutiva). EFT, la presenza di steatosi epatica e l'adiposità addominale aumentavano in presenza di MetS ( $p<0,001$ ). EFT era l'unico marcatore di adiposità ectopica associato con la disfunzione ventricolare a fine diastole (OR=1,340 [1,088-1,651 95% C.I.,  $p=0,006$ ); la presenza di steatosi epatica e valori più alti di EFT erano associati con il danno vascolare subclinico (OR=2,529 [1,328-4,819] 95% C.I.,  $p<0,001$  e OR=1,195 [1,008-1,299] 95% C.I.,  $p=0,042$ ; rispettivamente). Aggiunto a tutti i fattori di rischio classici, solo EFT discriminava più sensibilmente sia i soggetti con disfunzione ventricolare sinistra a fine diastole sia quelli con danno vascolare subclinico.

**Conclusioni.** EFT si associa sia con la disfunzione ventricolare sinistra a fine diastole sia con la presenza di lesioni aterosclerotiche. I nostri dati suggeriscono che EFT potrebbe rappresentare uno strumento utile per la stratificazione del rischio cardiovascolare.

## EFFETTO DI UN SEMPLICE INTERVENTO INFORMATIVO PER AUMENTARE L'ADERENZA ALLA TERAPIA CON STATINE IN MEDICINA GENERALE

M. Casula<sup>1</sup>, E. Tragni<sup>1</sup>, R. Piccinelli<sup>2</sup>, A. Zambon<sup>3</sup>, L. De Fendi<sup>2</sup>, L. Scotti<sup>3</sup>, G. Corrao<sup>3</sup>, M. Gambera<sup>2</sup>, A.L. Catapano<sup>1,4</sup>, A. Filippi<sup>5†</sup>  
<sup>1</sup>Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Servizio farmaceutico, ASL di Bergamo; <sup>3</sup>Dipartimento di Statistica e Metodi Quantitativi, Sezione di Biostatistica, Epidemiologia e Sanità Pubblica, Università di Milano-Bicocca, Milano; <sup>4</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (Milano); <sup>5</sup>Società Italiana di Medicina Generale (SIMG), Firenze

**Contesto.** L'aderenza alla terapia con statine è generalmente scarsa, con conseguente inefficacia del trattamento, aumento della morbilità e della mortalità e spreco di risorse.

**Obiettivo.** Valutare l'efficacia di un intervento informativo/educativo rivolto ai medici di medicina generale, volto a migliorare l'aderenza alla terapia con statine.

**Metodi.** Lo studio è stato condotto nella ASL di Bergamo, in Lombardia. È stato predisposto un report per ogni medico con:

- 1) un breve documento scientifico sulla dislipidemia e sulle statine;
- 2) dati aggregati sull'uso di statine e sull'aderenza nel 2006 per i suoi pazienti rispetto alle medie del suo distretto e della ASL.

Ogni medico ha ricevuto il materiale elencato (intervento 1); inoltre, un campione di 7 distretti (selezionati in modo casuale tra i 14 distretti di Bergamo) ha ricevuto anche una tabella dei livelli di aderenza per i singoli pazienti (intervento 2). I dati a livello del paziente

sono stati recuperati dai database amministrativi sanitari della ASL. Le misure di aderenza (percentuale di pazienti con una sola prescrizione, medication possession ratio [MPR] e proporzione di pazienti non persistenti) sono state valutate dopo un anno di follow-up.

**Risultati.** Nel complesso, sono stati arruolati 5833 e 4788 nuovi utilizzatori di statine rispettivamente prima e dopo l'intervento. La percentuale di pazienti con una sola prescrizione era inferiore dopo l'intervento (da 28,0% a 23,9%;  $p < 0,001$ ). L'MPR era aumentato dal 70,3% al 76,0% ( $p < 0,001$ ), come anche la percentuale di pazienti con MPR  $\geq 80\%$ , dal 45,4% al 56,4% ( $p < 0,001$ ). Anche la persistenza mostrava un miglioramento, sia in termini di diminuzione percentuale dei pazienti non persistenti (dal 51,9% al 41,4%;  $p < 0,001$ ) che di aumento della durata di una terapia continuata (da 235 a 264 giorni medi di terapia persistente;  $p < 0,001$ ). L'effetto dell'intervento sui vari parametri non era significativamente differente tra tipo 1 e 2.

**Conclusioni.** L'intervento attuato ha portato a un miglioramento complessivo della aderenza alla terapia nel breve termine. Questa pratica può essere replicata in altri contesti locali e per altre terapie croniche, ove siano disponibili i dati di prescrizione.

## RUOLO DELLO STATO OSSIDATO O RIDOTTO DI HIGH-MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1) NELLA REGOLAZIONE DELLE FUNZIONI DEI FIBROBLASTI CARDIACI E SULLA FUNZIONALITÀ CARDIACA DOPO INFARTO DEL MIOCARDIO

S. Di Maggio<sup>1</sup>, G. Milano<sup>2</sup>, M. Bertolotti<sup>1</sup>, F. De Marchis<sup>3</sup>, T. Glorioso<sup>1</sup>, E. Sommariva<sup>2</sup>, M.C. Capogrossi<sup>4</sup>, G. Pompilio<sup>2</sup>, M. E. Bianchi<sup>3</sup>, A. Raucchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Experimental Cardio-oncology and Cardiovascular Aging Unit, Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan; <sup>2</sup>Vascular Biology and Regenerative Medicine Unit, Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan; <sup>3</sup>Division of Genetics and Cell Biology, San Raffaele Scientific Institute, Milan; <sup>4</sup>Laboratory of Vascular Pathology, Istituto Dermopatico dell'Immacolata IRCCS, Rome

HMGB1 è un fattore nucleare che, quando secreto, è in grado di segnalare danno tissutale. HMGB1 è anche coinvolto nella rigenerazione e nel rimodellamento cardiaco dopo infarto del miocardio (MI). L'attività extracellulare di HMGB1 dipende dal suo stato redox: la forma completamente ridotta ha un effetto chemotattico, la forma parzialmente ridotta induce l'espressione di citochine, mentre la forma totalmente ossidata è apparentemente inattiva. Il presente studio si propone di esaminare il ruolo delle diverse isoforme di HMGB1 e del mutante non ossidabile, chiamato 3S-HMGB1, sulle funzioni dei fibroblasti cardiaci (hcFbs) umani in vitro e di valutare l'effetto sul rimodellamento cardiaco in vivo usando un modello murino di MI.

Abbiamo riscontrato che la forma completamente ridotta e il mutante 3S, ma non la forma parzialmente ridotta, inducono la migrazione dei hcFbs ed entrambe ne inibiscono l'adesione. Inoltre, solo il mutante 3S non essendo ossidabile, è in grado di stimolare la migrazione anche in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HcFbs esprimono il recettore CXCR4 ma non TLR4 e RAGE. Il trattamento di queste cellule con l'inibitore di CXCR4, AMD3100, blocca la migrazione indotta dalla isoforma completamente ridotta ma non dal mutante 3S, indicando una maggiore affinità del mutante 3S per CXCR4. La forma parzialmente ridotta e il mutante 3S non modulano i livelli di espressione di citochine infiammatorie, probabilmente per l'assenza del recettore TLR4. In vivo, studi preliminari hanno confermato un aumento

della funzionalità cardiaca nei topi infartuati e trattati con la forma completamente ridotta rispetto al veicolo a 1, 2 e 4 settimane dopo MI. Il trattamento con il mutante 3S ha un effetto peggiorativo. I nostri risultati suggeriscono che la migrazione dei hcFbs indotta da HMGB1 è dipendente da CXCR4 e l'azione svolta in vitro dalla forma completamente ridotta e dal mutante 3S sono simili, sebbene il mutante 3S sia attivo anche in condizioni ossidanti, che si verificano anche in seguito a MI. Se questo sia il motivo dell'effetto peggiorativo del mutante 3S sulla funzionalità cardiaca osservata in vivo deve ancora essere determinato.

## STUDI SULLA DISFUNZIONALITÀ CARDIACA E L'INFIAMMAZIONE INDOTTA DA OBESITÀ, USANDO *DROSOPHILA* COME MODELLO SPERIMENTALE

Z. Mirzoyan<sup>1</sup>, J.B. Pollard<sup>2</sup>, M. Cassinelli<sup>2</sup>, V. Lupi<sup>2</sup>, M. Frattaroli<sup>2</sup>, S. Zola<sup>3</sup>, V. Kuo<sup>3</sup>, M. Pasini<sup>1</sup>, L. Arnaboldi<sup>1</sup>, S. Bellosta<sup>1</sup>, P. Bellosta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>2</sup>Einstein High School of Science, Milano; <sup>3</sup>Columbia University, New York, USA

Numerosi studi documentano come nell'obesità le cellule del sistema immunitario (macrofagi) migrino nel tessuto adiposo inducendo nel paziente un'infiammazione cronica di basso grado. Questo fenomeno è stato associato ad un alterato metabolismo degli adipociti ed a perturbazioni nell'omeostasi lipidica, quali un'aumentata lipolisi (processo attivo durante stati di digiuno e nelle cellule adipose di soggetti obesi). Dati recenti hanno dimostrato che gli acidi grassi liberi (FFA) prodotti dalle cellule del paziente obeso fungono da chemioattrattori per i macrofagi. Per cercare di comprendere i meccanismi responsabili di questa chemiotassi ci siamo avvalsi di una relazione funzionale conservata (e non documentata in precedenza) nella *Drosophila* tra gli emociti, cellule del sistema immunitario (simili a macrofagi), e gli adipociti che costituiscono il tessuto adiposo detto "fat body" o FB).

Il FB di *Drosophila* è un tessuto con funzioni metaboliche e fisiologiche simili al tessuto adiposo ed al fegato dei mammiferi, funge da unità funzionale nel controllo dei processi metabolici essenziali e nelle risposte immunitarie, oltre a svolgere anche funzioni di accumulo di lipidi e di zuccheri. Riducendo le concentrazioni dell'ormone responsabile del controllo dello sviluppo e della crescita (ecdysone), abbiamo ottenuto larve in grado di crescere e nutrirsi fino a raggiungere un fenotipo obeso. Questi animali hanno elevati contenuti in trigliceridi, FFA, glucosio nel sistema circolatorio o emolinfa e presentano insulino-resistenza nel tessuto adiposo larvale. L'analisi lipidomica dimostra delle perturbazioni nella composizione dei lipidi negli animali obesi rispetto al controllo. Inoltre le larve obese posseggono un maggior numero di emociti nel FB, evento che viene stimolato durante la lipolisi, uno stato simile allo stato di infiammazione cronica descritto nei pazienti obesi. Da ultimo, abbiamo osservato negli stessi animali un'aumentata attività contrattile cardiaca, aspetto che richiama la disfunzione cardiaca ampiamente descritta nei pazienti obesi.

In conclusione, questi dati dimostrano, per la prima volta, come l'infiltrazione delle cellule immunitarie nel tessuto adiposo sia un processo evolutivamente conservato e come possa fornire un'opportunità per sviluppare un modello di *Drosophila* per studiare i processi critici della chemiotassi delle cellule immunitarie nel tessuto adiposo ed i meccanismi responsabili di patologie collegate quali l'arteriosclerosi.

## VALUTAZIONE DEI BENEFICI SALUTISTICI DELL'ASSUNZIONE DI PROTEINE DELLA SOIA IN PAZIENTI CON MODERATA SINDROME METABOLICA

B. Morlotti<sup>1</sup>, M. Ruscica<sup>2</sup>, C. Pavanello<sup>1</sup>, M. Gomaschi<sup>2</sup>, C. Macchi<sup>2</sup>, R. Bosisio<sup>1</sup>, C. Vitali<sup>2</sup>, C. Sirtori<sup>1,2</sup>, L. Calabresi<sup>2</sup>, A. Arnoldi<sup>3</sup>, P. Magni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Dislipidemie, A.O. Niguarda Cà Granda, Milano;

<sup>2</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Milano

**Introduzione.** Il profilo lipidico rappresenta un fattore di rischio modificabile nel contesto delle malattie cardiovascolari (CVD) e il suo miglioramento rappresenta un fattore di prevenzione. La correzione della dislipidemia mediante intervento dietetico è il primo provvedimento nella riduzione del rischio cardiovascolare. In soggetti con moderato rischio di CVD e con colesterolo totale (TC) e LDL (LDL-C) borderline, l'uso di proteine vegetali, in particolare di soia, ha un forte razionale scientifico. Scopo: Valutare gli effetti dell'assunzione giornaliera di 30 g di proteine di soia (in sostituzione di altrettante proteine di origine animale) sui parametri lipidici, sull'accumulo di tessuto adiposo viscerale e sui livelli di adipochine. **Disegno dello studio.** Randomizzato, parallelo, monocentrico; durata del trattamento: 12 settimane. Pazienti: 66 soggetti (32 M/34 F) con sindrome metabolica moderata (3/5 criteri NCEP-ATPIII) sono stati randomizzati a dieta con proteine di soia (dieta ipolipidica con 30g/die di proteine della soia; N=36; 17 M/19 F) o dieta controllo (dieta ipolipidica con proteine animali; N=28 15 M/13 F).

**Risultati.** La dieta con proteine di soia, rispetto a quella di controllo, ha ridotto significativamente i valori di TC (-6,66%, p=0,001), LDL-C (-6,65%, p=0,013) e apo-B (-13,48%, p=0,002). Il colesterolo HDL e le relative sottoclassi sono rimasti invariati. I pazienti che hanno seguito la dieta con proteine di soia, rispetto ai soggetti controllo, hanno mostrato una riduzione significativa del peso corporeo (-2,14%, p=0,015) e del BMI (-2,17%, p=0,019), mentre la circonferenza vita si è ridotta in entrambi i gruppi. I livelli circolanti di leptina si sono ridotti nel gruppo che assumeva soia rispetto al gruppo controllo (-18,15%, p=0,03). L'adiponectina è rimasta invariata in entrambi i bracci dello studio, determinando quindi una riduzione significativa del rapporto leptina:adiponectina solo in pazienti che assumevano la soia. s-ICAM1 è risultata ridotta nei soli pazienti che assumevano le proteine vegetali (-5,32%, p=0,007).

**Conclusioni.** I risultati del presente studio hanno evidenziato un'elevata compliance e sicurezza di questo intervento nutrizionale. L'integrazione dietetica con 30 g/die di proteine di soia si associa con un significativo miglioramento di una serie di biomarkers associati al rischio cardio-metabolico primario.

## ASSOCIAZIONE TRA IL PROFILO DI LINFOCITI T CD4+, L'ESTENSIONE DEL CARICO ATEROSCLEROTICO E L'EVIDENZA IN VIVO DI NEOVASCULARIZZAZIONE DELLA PLACCA CAROTIDEA

F. Moroni<sup>1</sup>, E. Ammirati<sup>1,2</sup>, M. Magnoni<sup>1</sup>, S. Di Terlizzi<sup>3</sup>, I. Scotti<sup>4</sup>, C. Villa<sup>3</sup>, F. Sizzano<sup>3</sup>, M. Impellizzeri<sup>5</sup>, G. Fanelli<sup>5</sup>, Esposito<sup>1</sup>, R. Chiesa<sup>1</sup>, P. Camici<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Cardiotoracovascolare, Istituto Scientifico San Raffaele e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano;

<sup>2</sup>Dipartimento Cardiotoracico e Vascolare, AO Niguarda Cà Granda, Milano; <sup>3</sup>FRACAL - Flow Cytometry Resource Advanced Cytometry Technical Applications Laboratory, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano; <sup>4</sup>Dipartimento di Reumatologia, Istituto Ortopedico Gaetano Pini, Milano; <sup>5</sup>Dipartimento di Neurologia, Istituto di Neurologia Sperimentale, IRCCS Ospedale San Raffaele e Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Il presente lavoro analizza la relazione tra le caratteristiche morfologiche di placca valutate con ecocolordoppler e ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) e il profilo circolante di sottopopolazioni di cellule T CD4+ putativamente implicate nella patogenesi dell'aterosclerosi. 60 pazienti asintomatici con stenosi carotidea <70% secondo criteri velocimetrici sono stati sottoposti a ecocolordoppler e CEUS carotideo. Sono stati valutati il grado di massima stenosi e il carico di aterosclerosi del distretto carotideo, misurato con la total plaque area (TPA). Per ogni soggetto è stata inoltre valutata l'attività neoangiogenica delle placche carotidee come numero totale di lesioni in cui il segnale del contrasto all'esame CEUS raggiunge il core della placca. L'analisi del profilo T-cellulare sul sangue periferico è stata effettuata usando un approccio di citometria a flusso policromatica, sfruttando i marcatori di superficie CD3, CD4, CCR7, CD45RO e HLA-DR. Sono state pertanto identificate 7 popolazioni principali di cellule T: cellule T CD4+, con sottopopolazione attivata HLA-DR+; cellule T memoria CD4+CD45RO+; cellule T central memory CD4+CD45RO+CCR7+, con sottopopolazione attivata HLA-DR+; e infine T effector memory CD4+CD45RO+CCR7-, con sottopopolazione HLA-DR+. L'età media dei soggetti esaminati era 69 anni, il 53% erano maschi. All'imaging carotideo sono state identificate 259 lesioni totali, con un numero mediano di lesioni per soggetto pari a 4. Il 24% delle lesioni esaminate mostrava attività neoangiogenica all'esame CEUS; il numero mediano di lesioni novascularizzate per paziente era 1. La TPA mediana era 0,73 cm<sup>2</sup>. La TPA è correlata significativamente con ridotti livelli di cellule T CD4+HLA-DR+ (r=-0,242, p=0,03). La stessa popolazione cellulare correla inversamente con il numero di lesioni neovascularizzate (r=-0,396, p=0,002). Pazienti con una più intensa attività neoangiogenica avevano anche ridotte conte di cellule T effector memory HLA-DR+ (p=0,03). La riduzione di frazioni attivate di cellule T putativamente aterogeneiche in pazienti con carico aterosclerotico maggiore e intensa attività angiogenica suggerisce una ridistribuzione di queste componenti cellulari nelle placche aterosclerotiche e fa avanzare l'ipotesi che i neovasi di placca possano essere la via di accesso.

## IL DIFFERENZIAMENTO DEI FIBROBLASTI IN MIOFIBROBLASTI NELLA FIBROSI CARDIACA DA IPERTENSIONE ARTERIOSA È ASSOCIATO A UNA MAGGIORE ESPRESSIONE DI TGF-β1 E DI INTEGRINA αVβ5

G.L. Perrucci<sup>1</sup>, M. Corliano<sup>2</sup>, D. Tosi<sup>3</sup>, P. Nigro<sup>2</sup>, G. Pompilio<sup>1,2</sup>, G. Bulfamante<sup>3</sup>, F. Lombardi<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Laboratorio di Biologia Vascolare e Medicina Rigenerativa, Università di Milano;

<sup>2</sup>Laboratorio di Biologia Vascolare e Medicina Rigenerativa, Centro Cardiologico, IRCCS Monzino, Milano; <sup>3</sup>Unità di Patologia, Dipartimento di Scienze della Salute, Ospedale San Paolo, Università di Milano; <sup>4</sup>Unità di Cardiologia, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Il fattore di crescita tumorale β1 (TGF-β1) svolge un ruolo chiave nella fibrosi cardiaca associata a ipertensione arteriosa, agendo sul

differenziamento dei fibroblasti cardiaci in miofibroblasti. Questi ultimi esprimono  $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) e sono perciò cellule contrattili. Per trasduzione meccanica mediata dalle integrine transmembrana, proteine in grado di legarsi al complesso extracellulare di latenza del TGF- $\beta$ 1, la contrazione dei miofibroblasti favorisce il rilascio del TGF- $\beta$ 1 dalla sua forma latente, rendendolo in questo modo attivo. L'integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5 viene espressa dal tessuto cardiaco ed è stato descritto in letteratura essere coinvolta nell'attivazione del TGF- $\beta$ 1. In questo studio è stato verificato se lo stimolo ipertensivo in modello di ratto fosse sufficiente per se ad attivare il TGF- $\beta$ 1 attraverso meccanismo di trazione mediato dall'integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5.

Saggi di immunostochimica e Western Blot sono stati condotti su tessuto cardiaco di ratti spontaneamente ipertesi (SHR) e ratti normotesi Wistar Kyoto (WKY).

I risultati mostrano come in tessuto cardiaco di ratto SHR ci sia un maggiore grado di fibrosi, legato alla deposizione di matrice extracellulare (ECM), in particolare nella regione perivascolare. Anche la positività del segnale per TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA, proteina legata al TGF- $\beta$ 1 latente-1 (LTBP-1) e integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5 è risultata essere significativamente superiore nei cuori di ratti SHR.

Gli studi condotti su fibroblasti cardiaci isolati da tessuto cardiaco dei due strain di ratto e trattati con 5 ng/ml di TGF- $\beta$ 1 ricombinante hanno dimostrato una maggiore espressione genica e proteica dei marker legati all'attivazione del TGF- $\beta$ 1 (p-SMAD2/3,  $\alpha$ -SMA e LTBP-1) e dell'integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5 nei fibroblasti isolati da cuori di ratto iperteso. È possibile quindi concludere che l'ipertensione, come noto, abbia promosso la deposizione di ECM, caratteristica principale e distintiva della fibrosi cardiaca reattiva. È stato inoltre osservato che lo stimolo ipertensivo abbia comportato una sovraregolazione di TGF- $\beta$ 1 ed integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5 su tessuto cardiaco e che la stimolazione con TGF- $\beta$ 1 in vitro dei fibroblasti cardiaci isolati dai cuori di ratto iperteso porti a una sovraespressione di  $\alpha$ -SMA, LTBP-1 ed integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5 rispetto a fibroblasti di ratto normoteso.

Questi risultati e studi futuri su questo meccanismo di attivazione del TGF- $\beta$ 1 aprono alla possibilità di intervenire selettivamente su questa e altre integrine, al fine di ridurre la progressione patologica di fibrosi cardiaca.

## ANALISI DEL PROFILO LIPIDICO SIERICO ED EPATICO DI RATTI CON STEATOSI EPATICA INDOTTA DA DIETA PRIVA DI METIONINA E COLINA E TRATTATI CON EUROSIL85

L. Arnaboldi<sup>1</sup>, R. Sala<sup>1</sup>, A. Granata<sup>1</sup>, S. De Metro<sup>1</sup>, L. Cavicchioli<sup>2</sup>, A. Corsini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>MEDA/Rottapharm, Monza

Il fegato grasso non alcolico (NAFLD) è una patologia che si sviluppa dalla steatosi, può progredire in steatoepatite-fibrosi e giungere a cirrosi/epatocarcinoma. I suoi fattori di rischio sono obesità, insulino-resistenza, iperglicemia a digiuno ed ipertrigliceridemia. Siccome secondo l'ipotesi dei "two hits", il primo insulto provoca accumulo lipidico ed il secondo infiammazione e fibrosi (per deposizione di collagene), lipidi, stress ossidativo ed infiammazione sono coinvolti prepotentemente nello sviluppo della NAFLD. Siccome non esistono trattamenti farmacologici mirati, si è alla ricerca di nuove terapie, utilizzando molecole con proprietà antiinfiammatorie, ipolipidizzanti, antifibrotiche, antiossidanti. Tra queste annoveriamo la silimarina, miscela di flavonolignani estratti dai semi del

Silybum Marianum. La migliorata biodisponibilità della nuova forma farmaceutica (Eurosil85 Rottapharm/MEDA) ci ha spinti a valutarne gli effetti nella NAFLD in un modello animale di steatosi epatica (56 ratti maschi Wistar). I ratti, divisi in 4 gruppi (14 ciascuno), sono stati alimentati con:

- dieta ricca in grassi e saccarosio, senza metionina-colina (MCD);
- dieta MCD addizionata in Eurosil85 40- o 200 mg/kg/die;
- dieta MCD ma con metionina-colina (MCS);
- dieta controllo) per 1 o 3 mesi.

Un mese di trattamento è sicuro (ALT e GGT costanti), anche se la dieta MCD non consente la crescita ponderale degli animali. Il colesterolo sierico totale aumenta nei ratti MCS vs MCD, ma Eurosil85 200 mg/kg/die lo riduce in modo significativo (-30%). Mentre la dieta MCS aumenta i trigliceridi sierici, (vs MCD), Eurosil85 non li altera significativamente (vs MCD), incrementando però il potere antiossidante del siero rispetto ai ratti MCD. Analizzando i lipidi epatici (1 mese di trattamento), la dieta MCD (vs MCS) provoca accumuli di colesterolo estere, trigliceridi ed acidi grassi liberi, con generale aumento degli acidi polinsaturi nelle loro composizioni, a scapito di quelli saturi, mentre diminuisce la massa dei fosfolipidi (per diminuita sintesi di fosfatidilcolina, sintetizzata dalla colina, mancante nella dieta). Eurosil85 200 mg/kg/die diminuisce la massa del colesterolo libero epatico, ma non altera gli altri parametri analizzati.

Stiamo attualmente analizzando lipidi epatici, parametri di infiammazione, ossidazione e fibrosi dopo tre mesi di trattamento per comprendere se Eurosil85 possa rappresentare un valido trattamento farmacologico per la cura della NAFLD.

## EFFETTO BENEFICO DELLA DIETA IPOPROTEICA SULLA PROGRESSIONE DELL'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

C. Visinoni<sup>1</sup>, A. Baragetti<sup>1,2</sup>, Baragetti L.<sup>3</sup>, Biazzi C.<sup>3</sup>, Garlaschelli K.<sup>1</sup>, Grigore L.<sup>1</sup>, Pozzi C.<sup>3</sup>, Norata G.D.<sup>2,5</sup>, Catapano A.L.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini Cinisello Balsamo (Milano); <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>U.O. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (Milano); <sup>4</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto San Giovanni (Milano); <sup>5</sup>The Blizard Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry Queen's Mary University, London, United Kingdom

**Introduzione.** I livelli di creatinina e la proteinuria sono parametrici essenziali per il controllo della progressione dell'insufficienza renale cronica (CKD); per questo si considera generalmente l'approccio farmacologico anti-ipertensivo, sebbene il suo uso sia dibattuto nell'insufficienza renale terminale (ESRD). Inoltre, potrebbe anche essere utile il controllo dell'apporto proteico alimentare.

Tuttavia, ad oggi, vi sono pochi studi randomizzati con follow-up ristretti che hanno valutato l'effetto del controllo dell'apporto proteico alimentare sulla progressione di CKD in soggetti con moderata riduzione della funzionalità renale (GFR). Pertanto, abbiamo valutato l'associazione tra il controllo dell'apporto proteico alimentare e la progressione di CKD.

**Materiali e metodi.** L'apporto proteico giornaliero è stato valutato su 140 pazienti CKD (GFR mediano basale =20,0 [15,0-25,0] mL/min/1,73 m<sup>2</sup>; età 68 [60-80]), da due diestiste, in conformità alle Linee Guida del National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI). I pazienti sono stati così divisi in tre gruppi: dieta libera (DL), dieta a basso apporto proteico (LPD) (0,8 g/kg/die) e dieta ad apporto proteico molto basso (VLPD) (0,6

g/kg/die). Di questi pazienti è stata raccolta la storia clinica, i parametri antropometrici e biochimici, in un follow-up di 7 anni per valutare la progressione di CKD (ingresso in dialisi).

**Risultati.** La valutazione del regime dietetico ha permesso di individuare 22 pazienti con DL, 87 con VLPD e 31 con LPD. La GFR basale non era significativamente differente tra i tre gruppi (16,2+6,1 vs 16,8+6,8 vs 20,9+9,8 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, per dieta libera, VLPD e LPD rispettivamente, P=0,066). Dopo il periodo di follow-up, 64 sono entrati in dialisi. Di questi, 33 (51.5%) erano con DL, 27 erano con

VLPD e 4 (6.2%) erano con LPD. In generale, il controllo dell'apporto proteico giornaliero era associato con una minore incidenza di ingresso in dialisi, se confrontata con DL (P<0,001). Infine, abbiamo osservato che l'effetto del controllo dell'apporto proteico era indipendente dalla terapia anti-ipertensiva.

**Conclusioni.** La dieta ipoproteica si associa a una ridotta progressione della CKD. Inoltre, questo effetto è risultato indipendente dalla terapia farmacologica anti-ipertensiva, suggerendo l'utilità clinica del regime alimentare ipoproteico sul controllo della CKD.

SOCIETÀ ITALIANA IPERTENSIONE ARTERIOSA (SIIA)  
E SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELL'ARTERIOSCLEROSI (SISA)

## Spring Meeting dei Giovani Ricercatori SIIA e SISA

IPERTENSIONE ARTERIOSA, DISLIPIDEMIE ED ATEROSCLEROSI:  
NUOVI LINK FISIOPATOLOGICI E TERAPEUTICI

Rimini, 11-12 Marzo 2016

### COMUNICAZIONI GIOVANI RICERCATORI

*Abstracts selezionati dalla Commissione Scientifica:*

*Rosa Maria Bruno, Arrigo F.G. Cicero, Elda Favari, Giuseppe Danilo Norata e Martina Rosticci*

### COMUNICAZIONI ORALI

#### THE EFFECT OF MELATONIN ON SMALL MESENTERIC ARTERIES AND AORTA OF AGING MICE

C. Agabiti Rosei, C. De Ciuceis, C. Rossini, E. Porteri, R. Rezzani<sup>1</sup>, L.F. Rodella<sup>1</sup>, G. Favero<sup>1</sup>, A. Sarkar, E. Agabiti Rosei, D. Rizzoni  
*Clinica Medica and <sup>1</sup>Chair of Human Anatomy, Department of Clinical and Experimental Sciences, University of Brescia*

**Background.** It has been previously demonstrated that inflammation in adipose tissue may be implicated in vascular dysfunction (Circulation 2009; 119: 1661-1670). A senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) is a model of age-related cognitive decline and vascular dysfunction. Several studies demonstrated that SAMP8 suffers from increased oxidative stress and that accelerated senescence was associated with decreased eNOS and nNOS and increased O(2) synthesis. Aim of the study was to investigate contractile response and age-related vascular changes on the endothelium of small mesenteric arteries and aorta in SAMP8 in normal conditions and after chronic treatment with melatonin, an endogenous hormone with antioxidant and vasculoprotective properties.

**Materials and methods.** We investigated 7 SAMP8 and 7 SAMR1 normal controls. In each mice we analysed markers of aging on endothelium of aorta. Mesenteric small resistance arteries were dissected and mounted on a wire myograph (internal diameter 200 µm). A concentration-response to noradrenaline (NA, from 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-5</sup> Mol/l) was evaluated in vessels with intact perivascular fat tissue (WF) and in vessels in which perivascular fat tissue was removed (NoF).

Investigations were repeated in 7 SAMP8 and 7 SAMR1 after 54 weeks of treatment with melatonin.

**Results.** In SAMP8 mice we have observed an overexpression of marker of oxidative stress. In SAMR1 control mice anticontractile effect of perivascular fat was present (WF vs. NoF: ANOVA p=0.04), while in aging SAMP8 mice the effect was less pronounced (WF vs NoF: ANOVA p=NS). Long-term treatment with melatonin had no effect in SAMR1, while in SAMP8 it was able to increase some vasculo-protective markers and to restore the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (ANOVA p<0.001).

**Conclusion.** The anticontractile effect of perivascular fat is impaired in SAMP8, compared with controls. A long-term treatment with melatonin seems to reduce oxidative stress and to restore anticontractile effect of perivascular fat in SAMP8, maybe through its antioxidant properties.