

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

XV Congresso della Sezione Lombardia

Milano, 20 ottobre 2016

L'edizione 2016 del Congresso Regionale della Lombardia ha aperto, come già l'anno precedente, il Congresso Nazionale SITeCS. La giornata, dedicata alla ricerca clinica e di base nell'ambito dell'aterosclerosi, ha visto la partecipazione attiva, attraverso la presentazione di numerosi contributi, di giovani che svolgono la propria attività presso istituzioni lombarde. I temi affrontati nelle letture magistrali sono stati l'importanza del microbiota nel determinare il rischio cardiometabolico e se la terapia ipolipemizzante sia di beneficio per tutti. Inoltre un simposio è stato dedicato al futuro dei grandi trial clinici e al rapporto tra etica e ricerca nel progresso scientifico. All'interno del Congresso SITeCS sono stati inoltre organizzati un simposio "Nuovi fattori di rischio lipidici: il ruolo delle lipoproteine ricche in trigliceridi" e, in collaborazione con AMD, SID e SITeCS, un simposio su "Effetti cardiovascolari e nefroprotettivi della terapia con farmaci ipoglicemizzanti innovativi".

COMUNICAZIONI ORALI

DIFFERENTI COMPOSIZIONI DEL MICROBIOTA INTESTINALE INFLUENZANO IL METABOLISMO LIPIDICO E L'OMEOSTASI INTESTINALE

M. Busnelli¹, S. Manzini¹, A. Boukadiri², A. Bruneau³, C. Philippe³, P. Gérard³, G. Chiesa¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-Josas, France; ³Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1319 Microbiologie de l'alimentation au service de la santé, Jouy-en-Josas, France

La malnutrizione proteico-energetica, caratterizzata da severo ritardo di crescita, infiammazione della mucosa intestinale, malassorbimento e steatosi epatica, causa ogni anno la metà dei decessi di bambini entro i cinque anni di età. Questo studio ha cercato di determinare se differenti composizioni del microbiota fossero in grado di limitare gli effetti devastanti determinati dalla carenza dietetica di proteine, prendendo spunto da recenti osservazioni secondo cui, nei mammiferi, la capacità di ottenere energia, macro- e micronutrienti dal cibo dipende in gran parte dal microbiota intestinale, il consorzio di batteri, virus e funghi che risiedono nel canale digerente.

A questo scopo, poiché la composizione del microbiota intestinale può essere modificata dal tipo di dieta, diversi microbiota sono stati ottenuti alimentando per cinque settimane topi "donatori" C57Bl/6 *Specific-Pathogen-Free* con differenti diete:

1. dieta standard per roditori (SD);
2. dieta a elevato contenuto di lipidi (HFD);
3. dieta a ridotto contenuto proteico (LPD). I tre differenti contenuti cecali prelevati dai topi "donatori" sono stati inoculati in topi "riceventi" *germ-free*, completamente privi di batteri e

altri microrganismi, che sono stati in seguito alimentati per dodici settimane con una dieta a ridotto contenuto proteico. Nonostante i tre diversi microbiota non abbiano variato il peso corporeo tra i gruppi, analisi successive hanno mostrato che:

1. topi riceventi il microbiota SD avevano maggiore propensione allo sviluppo di steatosi epatica e maggiore lunghezza dei villi intestinali;
2. topi riceventi il microbiota HFD avevano una alterata composizione di acid grassi a catena corta a livello cecale; aumentata concentrazione di fosfolipidi circolanti; ridotta lunghezza dei villi e delle cripte intestinali, associata ad aumentata espressione di geni indicativi di uno stato infiammatorio della mucosa intestinale;
3. topi riceventi il microbiota LPD erano caratterizzati da aumento significativo della concentrazione plasmatica di HDL-colesterolo.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che differenti microbiota modulano i livelli dei lipidi plasmatici e l'accumulo di lipidi nel parenchima epatico che conduce a steatosi. Inoltre, il microbiota ottenuto da animali alimentati con dieta iperlipidica modifica in modo marcato la struttura intestinale e l'espressione di geni che indicano una aumentata interazione tra il microbiota e la mucosa dell'intestino.

L'ISTONE DEACETILASI 3 DETERMINA IL FENOTIPO METABOLICO ED IL "BROWNING" DEL TESSUTO ADIPOSO BIANCO

R. Longo¹, A. Ferrari¹, N. Mitro¹, G. Cermenati¹, R. Silva¹, E. Fiorino¹, D. Caruso¹, E. De Fabiani¹, S.W. Hiebert², M. Crestani¹
¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA

Introduzione. L'obesità è un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari e l'epidemia di obesità ha incrementato il

rischio di patologia cardiovascolare in tutto il mondo. Le modificazioni dell'epigenoma stanno emergendo quali eventi chiave nella fisiopatologia di obesità e disordini metabolici. In particolare, molti studi evidenziano un legame tra le istone deacetilasi e la regolazione del metabolismo in diversi organi.

Risultati preliminari e scopo. Studi preliminari condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'istone deacetilasi 3 (Hdac3) gioca un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo energetico in diversi tessuti, in particolare nel tessuto adiposo. Alla luce di queste osservazioni lo scopo di questo lavoro è stato di determinare il ruolo della HDAC3 nella regolazione del metabolismo del tessuto adiposo e a tal fine è stata creata una linea murina con delezione di Hdac3 selettivamente in questo tessuto (H3atKO).

Risultati. Conseguentemente alla delezione di Hdac3, il tessuto adiposo dei topi H3atKO modifica profondamente il proprio metabolismo con una contemporanea attivazione di lipolisi e lipogenesi. Abbiamo infatti osservato un aumento della lipasi dei trigliceridi del tessuto adiposo, ATGL ($1,0 \pm 0,04$ vs $6,4 \pm 1,09$), che produce acidi grassi liberi come substrati per la β -ossidazione, e della ATP-citrato liasi, Acly (aumento di espressione genica: $1,0 \pm 0,29$ vs $3,4 \pm 0,78$; aumento di nuclei positivi ad Acly: $0,4 \pm 0,08$ vs $0,6 \pm 0,02$), un enzima coinvolto nella sintesi degli acidi grassi e nell'acetilazione della cromatina. Allo stesso tempo abbiamo notato una riduzione dei livelli di acidi grassi (μg palmitato/mg proteine: $119,2 \pm 15,77$ vs $70,3 \pm 8,23$) e del malonil-CoA (ng malonil-CoA/mg proteine: $0,2 \pm 0,05$ vs $0,10 \pm 0,01$). Esperimenti di marcatura isotopica in vitro hanno dimostrato aumento di β -ossidazione e sintesi di acidi grassi in adipociti con silenziamento di Hdac3. L'instaurarsi di un ciclo futile di lipolisi e lipogenesi sostiene il "browning" del tessuto, che acquisisce caratteristiche simili al tessuto adiposo bruno, con un'aumentata espressione della proteina disaccoppiante UCPI ($1,00 \pm 0,26$ vs $11,09 \pm 3,27$) ed attivazione della termogenesi (AUC dopo 24 h di esposizione al freddo $829,45 \pm 5,34$ vs $858,40 \pm 3,15$ p value = $0,0009$).

Conclusioni. Questo lavoro dimostra che HDAC3 è determinante per la definizione del fenotipo metabolico del tessuto adiposo e una sua ablazione dal tessuto adiposo innesca meccanismi che potrebbero essere esplorati per nuove strategie terapeutiche contro l'obesità e le complicanze cardiovascolari ad essa associate.

Funded by FP7 NR-NET PITN-GA-2013-606806 and by CARIPLO Foundation 2015-0641.

MALATTIA CORONARICA E PROPROTEINA CONVERTASI SUBTILISINA/KEXINA 9 (PCSK9): UN NUOVO ATTIVATORE DELLA RISPOSTA PIASTRINICA

L. Rossetti¹, N. Ferri², C. Ricci³, B. Canciani¹, D. Trabattoni¹, F. Santilli⁴, G. Davi⁴, E. Tremoli¹, M. Camera^{1,3}

¹Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano; ²Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Padova; ³Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ⁴Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università degli Studi di Chieti

Introduzione. La proproteina convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) induce degradazione del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR), incrementando il colesterolo LDL cir-

colante. I livelli di PCSK9 predicono eventi cardiovascolari ricorrenti in pazienti con angina stabile (SA+). Studi sperimentali suggeriscono che il contributo di PCSK9 agli eventi cardiovascolari potrebbe essere mediato da meccanismi diversi dal legame a LDLR, ad oggi non ancora noti. L'attivazione piastrinica svolge un ruolo fondamentale nelle complicazioni trombotiche e nella progressione dell'aterotrombosi. In pazienti con malattia cardiovascolare si è recentemente osservata un'associazione positiva tra i livelli plasmatici di PCSK9 e la conta piastrinica. Scopo dello studio è: comprendere se PCSK9 moduli attivazione/agggregazione piastrinica; valutarne l'espressione in piastrine di volontari sani (VS) e di pazienti SA+, con e senza diabete (DM). **Metodi.** L'effetto di PCSK9 ($5 \mu\text{g/ml}$) sull'attivazione piastrinica è stato valutato mediante aggregazione indotta da epinefrina in plasma-ricco-in-piastrine (PRP). L'espressione dei marcatori di attivazione piastrinica (P-selettina, glicoproteina IIb/IIIa attivata, PAC-1, Fattore Tessutale, TF) indotta da PCSK9 e la presenza di PCSK9 nelle piastrine sono state valutate mediante citofluorimetria in sangue intero. Inoltre i livelli di PCSK9 sono stati misurati in lisati piastrinici da 30 pazienti SA+, 15 DM+ e 15 DM-, 10 pazienti SA-/DM+ e 10 VS mediante ELISA.

Risultati. PCSK9 potenzia significativamente l'agggregazione piastrinica indotta da epinefrina ($0,6 \mu\text{M}$; +40% AUC; +78% slope; -15% lag-time; +15% massima aggregazione; $p < 0,05$). Inoltre, abbiamo osservato un'aumentata espressione di PAC-1, P-selettina e TF (+50%, +40%, +25%, rispettivamente) in piastrine stimulate da epinefrina+PCSK9 rispetto a solo epinefrina. Il 20% delle piastrine è risultato PCSK9+ e 1/6 è TF+. Le piastrine da pazienti SA+/DM+ contengono una quantità doppia di proteina rispetto agli altri gruppi ($20 \pm 5 \text{ pg}/\mu\text{g}$ proteina, $p < 0,001$); questo si associa ad iperattivazione piastrinica in termini di livelli basali di PAC-1, P-selettina e TF.

Conclusioni. Questi dati mostrano per la prima volta che PCSK9 è espressa nelle piastrine. Livelli significativamente maggiori sono presenti in pazienti SA+/DM+ rispetto ai pazienti SA+/DM-, SA-/DM+ e VS. Inoltre la proteina è coinvolta nell'attivazione e nell'agggregazione piastrinica. Considerando il ruolo delle piastrine nelle malattie cardiovascolari, questi risultati potrebbero aiutare a chiarire la basi molecolari dell'iperreattività piastrinica in pazienti SA+ e SA+/DM+.

STUDIO DELLA BASI EPIGENETICHE DI PATOLOGIE METABOLICHE LEGATE ALL'INVECCHIAMENTO IN UN MODELLO MURINO CON FEGATO UMANIZZATO

M. Zocchi, N. Mitro, D. Caruso, E. De Fabiani, M. Crestani
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano

Background. I disordini metabolici legati all'invecchiamento (es. T2D) e le loro complicazioni (es. patologie cardiovascolari) sono il risultato di una complessa interazione tra predisposizione genetica e fattori ambientali. Il progetto europeo HUMAN si propone di validare i polimorfismi associati a queste patologie (es. alleli TCF7L2 rs7803146 e APOE4) attraverso la generazione di modelli murini con fegato umanizzato, ottenuti mediante la ripopolazione del fegato murino con epatociti umani derivanti dal differenziamento di cellule staminali pluripotenti.

Scopo. HUMAN genererà modelli umanizzati sia da donatori sani che da pazienti con patologie metaboliche e ne caratte-

rizzerà il fenotipo mediante approcci su larga scala. Il nostro ruolo nel consorzio consiste nello studio delle modificazioni dell'epigenoma associate alle alterazioni metaboliche.

Metodi. Sono state messe a punto le condizioni sperimentali per immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) di regioni selettive del genoma arricchite da due marcatori istonici (H3K4me3 e H3K27ac) e dall'RNA polimerasi II, in modo da ottenere DNA in quantità e qualità adatte per il successivo sequenziamento. I passaggi maggiormente critici (sonicazione della cromatina, quantità di cromatina e anticorpo e validazione mediante qPCR) sono stati ottimizzati prima su fegato murino e quindi su fegato murino umanizzato.

Risultati. Per tutti e tre i protocolli è stata ottenuta una quantità di DNA sufficiente per il sequenziamento (8,3±3,1 ng per l'H3K4me3, 35,2±7.9 ng per l'H3K27ac e 8±0.9 ng per l'RNA polimerasi II). Grazie ad analisi mediante qPCR, i protocolli sono risultati in tutti e tre i casi altamente specifici: tutte le regioni di controllo positive utilizzate (es. transcription start site di GAPDH per H3K4me3 e RNA polimerasi II o enhancer dell'albumina per H3K27ac) risultano arricchite in modo significativo rispetto alle regioni di controllo negative (es. per GAPDH 6%±0.4 vs 0,09%±0,02; n=5).

Conclusioni. Il protocollo ottimizzato su fegato murino è risultato funzionale anche su fegato murino umanizzato. Il sequenziamento del DNA immunoprecipitato permetterà di studiare il "landscape" epigenetico dei topi umanizzati che recano i polimorfismi dei donatori di partenza e di valutarne l'eventuale rimodellamento in seguito a variazioni nella dieta o in presenza di stress ambientali (supported by FP7 HUMAN 602757).

RUOLO DI PCSK9 (PROPROTEINA CONVERTASI SUBTILISINA/KEXINA DI TIPO 9) NEL METABOLISMO LIPIDICO E GLUCIDICO IN MODELLI SPERIMENTALI

G. Balzarotti¹, G. Tibolla¹, M. Ruscica¹, M. Straba-Badiale¹, A.L. Catapano^{1,2}, G.D. Norata^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Centro SISA per lo studio dell'aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (Milano)

Obiettivo. PCSK9, enzima della classe delle proteasi, viene secreto nel circolo sanguigno dove regola i livelli plasmatici di lipoproteine a bassa densità (LDL) favorendo la degradazione dei recettori per le LDL (LDLR) principalmente a livello epatico. Tuttavia, la presenza del LDLR e di altri recettori target di PCSK9 in numerosi tessuti extra-epatici, potrebbe indicare un ruolo importante della proteina anche in altre patologie metaboliche. Dunque, considerando la crescente importanza che l'inibizione farmacologica di PCSK9 sta assumendo nel trattamento delle ipercolesterolemie, risulta fondamentale una migliore comprensione del ruolo suo fisiologico.

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. Non sono state evidenziate differenze significative nel guadagno di peso fra topi PCSK9 KO e WT, mentre, 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 SFD, 86,1±2,1 mg/dl vs 123,4±5,2 mg/dl HFD, p<0,05). Test

di tolleranza al glucosio (GTT) e test di tolleranza all'insulina (ITT) hanno evidenziato un ridotto controllo della glicemia nei topi PCSK9 KO rispetto ai controlli (GTT-AUC +25%±11% SFD; +40%±9% HFD, p<0,05), non associata a resistenza all'insulina. L'assenza di PCSK9 si associa inoltre a una significativa riduzione dei livelli plasmatici di insulina (4,3±0,6 ng/ml WT vs 3,2±0,2 ng/ml KO), a un incremento dei livelli pancreatici (104±7 ng/ml WT vs 138±12 ng/ml KO) e ad alterazioni morfologiche delle isole di Langherans.

Conclusioni. I nostri dati suggeriscono che PCSK9 gioca un ruolo importante nella fisiologia del metabolismo glucidico.

PCSK9 E INFIAMMAZIONE: STUDIO IN VITRO SU MACROFAGI UMANI

C. Ricci¹, A. Corsini^{1,2}, M.R. Accomazzo¹, G. Rovati¹, M. Camera^{1,3}, L. Rossetti³, N. Ferri⁴

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Multimedica IRCCS, Milano; ³Centro Cardiologico Monzino, Milano; ⁴Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova

L'infiammazione cronica è direttamente collegata a gravi disordini metabolici, quali aterosclerosi ed obesità, dove le cellule infiammatorie infiltrate nel tessuto adiposo, rilasciano mediatori quali TNF-alfa, IL-6, leptina e resistina, contribuendo così allo sviluppo di uno stato di infiammazione cronica sub-clinica. PCSK9 e resistina, entrambe correlate con lo sviluppo di aterosclerosi, presentano un'omologia strutturale in corrispondenza del dominio carbossi-terminale (porzione ricca in cisteina) e condividono molte attività fisiopatologiche. Infatti, entrambe risultano essere positivamente correlate con un'aumentata produzione epatica di VLDL e apoB100 e con i livelli sierici di trigliceridi a digiuno e regolano, inoltre, la degradazione del LDLR. Nel presente studio, abbiamo valutato la possibile attività resistino-simile di PCSK9 su cellule macrofagiche immortalizzate ed umane.

In seguito al trattamento dei macrofagi THP-1 derivati con concentrazioni crescenti di PCSK9 (0,25, 0,5, 1,0 e 2,5 µg/ml) e resistina (20 e 50 ng/ml) per 24 h, abbiamo osservato un significativo aumento dell'espressione genica di alcune delle più note citochine proinfiammatorie. Tale aumento, concentrazione-dipendente, risulta particolarmente elevato in seguito al trattamento con PCSK9 2,5 µg/ml: 200±13,9, per IL-6, 80,04±13 per TNF-alfa, 17±6,8 per MCP-1, 42,57±0,01 per MIP-2alfa 9,7±1.2 per IL-1beta.

È stato osservato, inoltre, un aumento nell'espressione proteica di IL-6 e TNF-alfa, tramite saggio ELISA specifico.

Un significativo aumento dell'espressione genica e proteica delle stesse citochine è stato osservato anche trattando macrofagi umani provenienti da volontari sani, anche se l'entità dell'incremento risulta più modesta.

Considerando la via del segnale di resistina e del suo recettore (CAPI) è stata valutata la possibile interazione tra PCSK9 e tale recettore, in modo da spiegare questa sua azione proinfiammatoria.

Resistina, tramite CAPI, esercita la sua attività grazie all'aumento dei livelli intracellulari di cAMP e, conseguentemente, all'induzione di NF-kB.

In seguito al trattamento dei macrofagi THP-1 derivati con PCSK9 2,5 µg/ml, abbiamo osservato un aumento dei livelli di

cAMP significativo e paragonabile a quello ottenuto in seguito al trattamento con resveratrol 50 ng/ml. Questi risultati supportano una possibile attività proinfiammatoria di PCSK9, potenzialmente con un'azione resveratrol-simile. Nei prossimi mesi verrà determinato il coinvolgimento del LDLR e di CAP1, entrambi espressi sulla superficie macrofagica, nella risposta infiammatoria.

BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) NELL'ATEROTROMBOSI: UN NUOVO LEGAME TRA ATTIVAZIONE PIASTRINICA E AUMENTO DEL FATTORE TESSUTALE (TF) MONOCITARIO NEI FUMATORI

P. Amadio¹, D. Baldassarre^{1,2}, L. Sandrini¹, B.B. Weksler³, E. Tremoli¹, S.S. Barbieri¹

¹Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; ²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; ³Division of Hematology-Medical Oncology, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

Il fumo di sigaretta attiva le piastrine, promuove la disfunzione vascolare, e aumenta l'espressione di Fattore Tessutale (TF) nei monociti circolanti favorendo uno stato pro-aterotrombotico.

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), un membro della famiglia delle neurotrofine coinvolto nella sopravvivenza, nella crescita, e nella maturazione dei neuroni, sembra inoltre svolgere un ruolo importante anche a livello del sistema cardiovascolare. Infatti, il BDNF è abbondantemente presente nelle piastrine, ed è rilasciato in seguito alla loro attivazione. Poco chiaro è se e come i livelli di BDNF nel plasma e nel siero siano regolati dal fumo di sigaretta, e soprattutto quale specifica funzione svolga il BDNF a livello circolante, in particolare nel processo aterotrombotico.

In questo lavoro, abbiamo dimostrato che le piastrine umane trattate con un estratto acquoso del fumo di sigaretta (CSE) rilasciano BDNF in modo dose-dipendente. Inoltre, l'incubazione di monociti umani con BDNF o con il surnatante di piastrine stimolate con CSE aumentano marcatamente l'attività del TF mediante un meccanismo dipendente dall'attivazione del recettore Tropomiosina chinasi B (TrkB), recettore specifico per il BDNF. Infatti, il pre-trattamento dei monociti con un anticorpo anti-TrkB previene completamente il TF indotto dal surnatante di piastrine attivate con CSE o con collagene.

Infine, un significativo aumento sia dell'attività del TF associata a microparticelle (MP-TF) sia dei livelli di BDNF, è stato misurato nei campioni di plasma ottenuti da 29 maschi fumatori rispetto a quanto misurato nel plasma di 12 maschi non fumatori. Al contrario, i livelli di BDNF nel siero hanno un andamento opposto, riducendosi di conseguenza nei fumatori.

Nel loro insieme questi risultati mostrano che il BDNF rilasciato dalle piastrine è coinvolto nella regolazione dell'attività del TF monocitario e suggeriscono un nuovo meccanismo con cui il fumo di sigaretta, svolgendo un ruolo chiave in questo processo, favorisce il processo aterotrombotico.

L'ATTIVAZIONE DI SIRT1 MEDIANTE TRATTAMENTO CON RESVERATROLO PREVIENE IL FENOTIPO PRO-TROMBOTICO NEI TOPI BDNFMET/MET

L. Sandrini¹, P. Amadio¹, F.S. Lee², E. Tremoli¹, S.S. Barbieri¹

¹Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; ²Department of Psychiatry, Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, NY, USA

Una variazione nella sequenza del gene che codifica per il BDNF (brain-derived neurotrophic factor), il polimorfismo BDNFVal66Met, notoriamente associato alla depressione ed all'ansia è risultato prevalente nei pazienti con infarto miocardico acuto. È interessante notare che il topo recante questo polimorfismo ben ricapitola il fenotipo umano mostrando un fenotipo depressivo associato a propensione alla trombosi arteriosa. Tuttavia, il meccanismo con cui il polimorfismo BDNFVal66Met influenza la trombosi arteriosa è ancora sconosciuto.

Noi dimostriamo che l'attivazione di SIRT1 indotta dalla somministrazione di resveratrol riduce il numero di piastrine e leucociti circolanti e previene l'iperreattività piastrinica e lo stato pro-coagulante osservato nei topi BDNFMet/Met. Inoltre, il resveratrol aumenta l'espressione di SIRT1 e riduce l'espressione di Gelsolina e TF riportandoli ai valori delle aorte WT. Infine, questo trattamento previene completamente la formazione di trombi carotidei indotti da FeCl₃ solo nei topi BDNFMet/Met. L'inibizione di SIRT1 con sirtinolo aumenta l'espressione di TF e di Gelsolina in topi WT, inducendo un fenotipo simile a quello osservato nei topi BDNFMet/Met.

In accordo con i dati in vivo, le cellule HeLa trasformate con il plasmide BDNFMet (HeLaMet) hanno elevati livelli di TF e Gelsolina, e ridotti livelli di SIRT1 rispetto alle cellule di controllo (HeLaVal). Anche in questo caso l'attivazione di SIRT1 mediante resveratrol o CAY10591 riporta l'espressione dei geni analizzati ai livelli delle cellule controllo. Infine, l'inibizione di SIRT1 con sirtinolo o con specifici SIRT1-siRNA, aumenta l'espressione di Gelsolina e TF solo nelle cellule HeLaVal.

I nostri dati dimostrano che il polimorfismo BDNFVal66Met predispone a un fenotipo pro-trombotico mediante l'inibizione di SIRT1. La modulazione di SIRT1 può offrire un nuovo approccio terapeutico per il trattamento della trombosi arteriosa in pazienti affetti da depressione.

RUOLO PREDITTIVO DELLE MICROPARTICELLE NELLA RI-OCCLUSIONE DEL BYPASS AORTOCORONARICO

P. Canzano¹, M. Brambilla¹, L. Rossetti¹, C. Zara¹, L. Cavallotti¹, A. Parolari^{2,3}, F. Veglia¹, E. Tremoli^{1,4}, M. Camera^{1,4}

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

Introduzione. Le microparticelle (MPs) sono vescicole eterogenee che vengono rilasciate nel plasma dopo attivazione cellulare o apoptosi e sono considerate biomarker di infiammazione e disfunzione vascolare nelle patologie cardiovascolari.

Tuttavia, il loro ruolo come potenziali predittori di patologia cardiovascolare e in particolare di ri-occlusione del bypass aortocoronarico (CABG), principale causa di prognosi negativa della rivascolarizzazione, non è stato ancora studiato.

Scopo. Valutare se le MPs possano essere predittori indipendenti di ri-occlusione del bypass.

Metodi. Il profilo delle MPs è stato valutato nel plasma di pazienti sottoposti a CABG, a cui è stato effettuato un prelievo il giorno prima dell'intervento. Il numero di MPs, l'origine cellulare e l'espressione di marker di attivazione piastrinica [Pselettina, CD40L, Tissue Factor (TF)], sono stati analizzati mediante citofluorimetria in 60 pazienti [30 che, alla valutazione della pervietà del bypass mediante TAC dopo 1 anno dall'intervento, erano risultati con graft occluso (Casi) e 30 con graft pervio (Controlli)]. Un modello multivariato (curve ROC) è stato applicato per determinare se i livelli di MPs possano incrementare il valore predittivo di occlusione del bypass rispetto ai classici fattori di rischio cardiovascolare.

Risultati. L'analisi del profilo delle MPs ha evidenziato che i Casi avevano un numero significativamente maggiore di MPs di origine piastrinica che esprimevano i marker di attivazione piastrinica Pselettina e CD40L (6 e 11 volte, rispettivamente; $p < 0,0001$) rispetto ai Controlli. Inoltre, le MPs piastriniche TF-positive risultavano 3 volte maggiori nei Casi rispetto ai Controlli (64 ± 40 vs 17 ± 7 MPs/ μ l; $p = 0,0002$). Le curve ROC hanno evidenziato che i livelli preoperatori di tali MPs risultavano avere un valore predittivo indipendente di ri-occlusione del graft entro 1 anno dall'intervento. Inoltre, i livelli di MPs di origine piastrinica TF-positive, Pselettina-positive e CD40L-positive incrementavano significativamente il valore prognostico rispetto ai classici fattori di rischio cardiovascolare (AUC=0,82, 0,79, 0,83, rispettivamente vs 0,67; $p < 0,0001$).

Conclusioni. I dati ottenuti indicano che uno specifico profilo preoperatorio di MPs, derivanti da piastrine attivate e che esprimono TF, è un predittore indipendente di ri-occlusione del graft entro 1 anno dall'intervento, candidando le MPs a potenziali biomarker utili nell'identificazione dei soggetti ad alto rischio di complicazioni post-procedurali.

UTILIZZO DI STATINE E RISCHIO DI DIABETE: UNA METANALISI DI STUDI OSSERVAZIONALI

F. Mozzanica¹, M. Casula¹, L. Scotti², A. Pirillo^{3,4}, E. Tragni¹, G. Corrao², A.L. Catapano^{1,4}

¹Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Statistica e Metodi Quantitativi, Sezione di Biostatistica, Epidemiologia e Salute Pubblica, Università degli Studi Milano-Bicocca; ³Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, (MI); ⁴IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI)

Contesto. Diverse metanalisi di trial hanno evidenziato un aumento del rischio di diabete, compreso tra il 9% e il 13%, in seguito all'utilizzo di statine. Tuttavia la quantificazione del rischio potrebbe risentire di alcuni limitazioni dei trial, tra cui brevi periodi di follow-up, mancata definizione del diabete come outcome primario, nonché assenza di criteri di diagnosi prestabiliti, determinando una possibile sottostima del rischio.

Scopo. Valutare l'associazione tra utilizzo di statine e inciden-

za di diabete tramite una metanalisi di tutti gli studi osservazionali pubblicati.

Metodi. Basandosi sulle linee-guida PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), è stata effettuata una revisione sistematica della letteratura in lingua inglese interrogando i database PubMed, Embase e MEDLINE fino al 30 giugno 2016. Sono stati esclusi gli articoli pubblicati come abstract. Nell'analisi sono stati inclusi studi di coorte e caso-controllo con una stima del rischio di diabete incidente in utilizzatori vs. non utilizzatori di statine (qualsiasi statina o una statina specifica) calcolata su almeno 1000 soggetti osservati per uno o più anni. Le stime sono state calcolate mediante un modello ad effetti variabili; l'eterogeneità tra studi è stata misurata tramite indice I². È stata inoltre condotta una influence analysis per pesare il contributo di ogni studio sulla stima di rischio calcolata.

Risultati. Nell'analisi sono stati inclusi 20 studi di cui 18 erano di coorte e 2 caso-controllo. Complessivamente, il rischio di nuova diagnosi di diabete era superiore tra gli utilizzatori di statine rispetto ai non utilizzatori (RR 1,44; IC 95% 1,31-1,58) e non mostrava alcuna variazione significativa in seguito ad influence analysis. La stima globale presentava un'elevata eterogeneità tra studi (I²=97%). Considerando le singole statine, tutte mostravano un aumento del rischio statisticamente significativo; per rosuvastatina (RR 1,61; 1,30-1,98) e atorvastatina (RR 1,49; 1,31-1,70) si è osservato il rischio più alto.

Conclusioni. L'aumento del rischio di diabete incidente in utilizzatori di statine, mostrato nella presente metanalisi, conferma le evidenze precedenti ma risulta più marcato supportando l'ipotesi di una sottostima di tale rischio negli studi clinici, in virtù dei loro limiti intrinseci. Inoltre, le stime calcolate per singola statina suggeriscono la presenza di un effetto diabetogeno di classe.

RIDUZIONE DEL COLESTEROLO LDL CON GLI INIBITORI DELLA PCSK9: METANALISI DI TRIAL RANDOMIZZATI CONTROLLATI

O. Bernocchi¹, M. Casula¹, L. Scotti², E. Tragni¹, G. Corrao², A.L. Catapano^{1,3}

¹Centro di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; ²Dipartimento di Statistica e Metodi Quantitativi, Divisione di Biostatistica, Epidemiologia e Sanità Pubblica, Università di Milano Bicocca, Milano; ³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI)

Contesto. PCSK9 è una proteina direttamente coinvolta nel metabolismo lipidico, mediando la degradazione del recettore per il colesterolo LDL (LDL-R). L'inibizione di questa proteina si traduce in una maggiore espressione del LDL-R a livello epatico e in un conseguente effetto ipolipemizzante. Sono stati sviluppati diversi anticorpi monoclonali (mAbs). Obiettivo di questa metanalisi era di valutare l'efficacia comparativa dei diversi inibitori della PCSK9 in tutti i trial randomizzati controllati (RCT) pubblicati.

Metodi. È stata condotta una ricerca in Pubmed, MEDLINE ed EMBASE per individuare gli RCT pubblicati fino al 8 settembre 2016, utilizzando parole chiave e MeSH terms riferiti agli effetti ipolipidemizzanti degli inibitori di PCSK9. Sono stati inclusi RCT:

1. pubblicati in lingua inglese;
2. di fase 2 o fase 3;
3. che confrontassero il trattamento con anticorpi anti-PCSK9 rispetto a un controllo;
4. che riportassero gli effetti sul colesterolo LDL;
5. con trattamenti di durata ≥ 8 settimane.

Come endpoint primario è stata considerata la differenza media (MD) tra la variazione dei livelli di LDL prima e dopo il trattamento nel gruppo di pazienti trattati con anticorpi anti-PCSK9 e nel gruppo di controllo.

Risultati. Sono stati selezionati 29 RCT. I pazienti inclusi erano 15.838, di cui 9.469 nei bracci di trattamento con anti-PCSK9 e 6369 nei bracci di controllo. Complessivamente, gli mAbs anti-PCSK9 si sono dimostrati notevolmente efficaci nella riduzione del colesterolo LDL, con MD pari a -52,82 (IC 95% da -56,36 a -49,27). La stima relativa a alirocumab era di -51,71 (da -58,72 a -44,69); quella a evolocumab era di -54,95 (da -59,09 a -50,81). Le stime aggregate in funzione dei differenti dosaggi dei farmaci hanno mostrato una relazione dose effetto solo per alirocumab: da MD -41,55 (da -54,74 a -28,37) per alirocumab 75 mg a -59,81 (da -66,35 a -53,27) per alirocumab 150 mg. Relativamente agli studi che hanno confrontato gli inibitori di PCSK9 con un trattamento attivo (ezetimibe), si è osservata una MD di -38,49 (da -42,64 a -34,32), in particolare di -39,45 (da -51,37 a -27,52) per alirocumab e di -37,84 (da -39,86 a -35,82) per evolocumab.

Conclusioni. Questa metanalisi aggiornata con gli ultimi trial pubblicati conferma l'evidenza emersa dagli studi clinici e dalle metanalisi precedenti di una importante capacità dei diversi mAbs anti-PCSK9 finora studiati di ridurre i livelli di colesterolo LDL, anche rispetto al trattamento con ezetimibe.

NEUROTRASMISSIONE SIMPATICA NELLO SVILUPPO DELL'ATEROSCLEROSI: UN BERSAGLIO NON RICONOSCIUTO DELLA DISLIPIDEMIA?

S. Manzini¹, M. Busnelli¹, D.S. Horner², M. Chiara², G.S. Ganzetti¹, F. Dellerà¹, C. Parolini¹, G. Chiesa¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano

Obiettivi. Con l'obiettivo di scoprire nuovi geni/*pathway* coinvolti nell'aterosclerosi indotta da dislipidemia, è stata condotta un'analisi trascrittomiche su aorte di linee transgeniche caratterizzate da diversi profili lipidici/lipoproteici e diversa suscettibilità all'aterosclerosi.

Metodi. Sono stati impiegati topi *wild-type* C57BL/6, apoE-*knockout* (EKO), apoE/apoA-I-*knockout* (EKO/A-IKO) e apoE/apoA-I-*knockout* esprimenti apoA-I umana (EKO/A-IKO/HA-I), alimentati a dieta chow o dieta Western a partire da 8 settimane di età. Dopo 22 settimane di dieta è stato analizzato il profilo delle lipoproteine plasmatiche mediante FPLC e l'aterosclerosi aortica attraverso l'analisi en-face. L'intero profilo di espressione genica dell'aorta (trascrittomiche) è stata ottenuta mediante sequenziamento *high-throughput*.

Risultati. A dieta chow, si è osservato uno sviluppo di placca solo nell'arco aortico di topi EKO (alte VLDL/LDL, basse HDL) e EKO/A-IKO (alte VLDL/LDL, HDL assenti). L'iper-

lipidemia e la formazione di placca negli archi aortici di topi EKO e EKO/A-IKO sono state incrementate dalla dieta Western, risultando solo in un modesto sviluppo di aterosclerosi in topi EKO/A-IKO/HA-I (alte VLDL/LDL e alte HDL).

Su un totale di 23K+ geni, circa il 10% è stato identificato come differenzialmente espresso (DE) in almeno una condizione (genetica o dietetica). Nei genotipi atero-proni, la dieta Western è risultata, rispetto alla dieta chow, in una ridotta espressione di geni chiave per la sintesi di catecolamine e di proteine di struttura delle vescicole sinaptiche. L'espressione degli stessi geni è risultata diminuita nei topi EKO/A-IKO rispetto a EKO/A-IKO/HA-I in entrambe le condizioni dietetiche.

Conclusioni. I risultati suggeriscono che le condizioni di dislipidemia, che predispongono allo sviluppo di aterosclerosi (iperlipidemia, basse HDL) possono interferire sull'attività simpatica diminuendo l'espressione di geni coinvolti nella sintesi di neurotrasmettitori e di proteine strutturali vescicolari.

NELLE CELLULE HEPG2 L'ESPRESSIONE DI PCSK9 È REGOLATA DALLE ADIPOCHINE LEPTINA E RESISTINA

M. Botta¹, N. Ferri², E. Giorgio¹, C. Macchi¹, A. Corsini¹, P. Magni¹, M. Ruscica¹

¹Università degli Studi di Milano; ²Università degli Studi di Padova

Scopo. Evidenze cliniche, genetiche e sperimentali indicano come la "proprotein convertase subtilisin/kexin 9" (PCSK9) possa essere sia causa che effetto della sindrome metabolica (MetS). Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato come la proteina PCSK9 sia regolata dalla citochina pro-infiammatoria TNF-alpha in modo SOCS-3 dipendente (Ruscica et al., JBC, 2016). Basandoci su tale evidenza, scopo del presente lavoro è stato quello di esplorare se le adipochine leptina e resistina avessero qualche effetto sull'espressione di PCSK9 e sulla de novo lipogenesi.

Metodi. Le cellule di carcinoma epatico (HepG2) e le cellule HepG2 sovra-esprimenti in modo stabile PCSK9 (HepG2PCSK9) sono state utilizzate come modello in vitro. Inoltre sono state utilizzate tecniche di qPCR, Western blot, ELISA, luciferasi reporter assays, e siRNA verso STAT3.

Results. Le cellule HepG2 esprimono il recettore della leptina ObRb e il recettore della resistina CAP-1. Tale espressione non viene modificata dalla sovraespressione di PCSK9. Un trattamento di 48 ore con leptina (dose, 100 ng/mL) e con resistina (dose, 50 ng/mL) ha determinato un aumento statisticamente significativo dell'espressione genica di PCSK9 (rispettivamente di 2,0 e 3,5 volte). In modo simile, l'espressione genica di JAK/STAT e dei alcuni geni coinvolti nella de novo lipogenesi (SREBP-1, FAS e SCD-1) sono risultati aumentati dopo trattamento con leptina e resistina. L'attivazione di PCSK9, di SREBP-1, FAS e SCD-1 dopo trattamento con leptina e resistina è stata inibita dall'utilizzo dei siRNA per STAT3. Inoltre, l'attività del promotore di PCSK9 è aumentata dopo 24 e 48 ore di trattamento con leptina (100 ng/mL). Quest'ultima è in grado anche di aumentare il rilascio di PCSK9 nel medium delle cellule HepG2 (+15%).

Conclusioni. Le adipochine leptina e resistina attivano sia l'espressione di PCSK9 che quella di alcuni geni coinvolti nella de novo lipogenesis in modo STAT3 dipendente.

RUOLO DI RAC1 NELLA MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PCSK9 INDOTTA DA STATINE

S. Marchianò¹, A. Corsini^{1,2}, N. Ferri³

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

³Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università degli Studi di Padova

Introduzione. L'aumento dell'espressione della Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9 (PCSK9) dovuta al trattamento con le statine è largamente conosciuta. Diverse evidenze sperimentali, hanno suggerito che la regolazione dell'espressione di PCSK9 potrebbe avvenire a livello intracellulare e con un meccanismo indipendente dall'effetto ipocolesterolemizzante delle statine. Questo meccanismo potrebbe dipendere da una diversa attivazione delle proteine prenilate, anch'esso dovuto al trattamento con statine.

Obiettivo. In questo studio abbiamo valutato il possibile coinvolgimento delle proteine prenilate, quali Rac1, RhoA e Cdc42, come potenziali nuovi modulatori dell'espressione di PCSK9 dovuta a statine.

Materiali e Metodi. L'espressione di PCSK9 è stata valutata in cellule di adenocarcinoma al colon umane (Caco-2) dopo il trattamento con 40µM di simvastatina, in particolare: i livelli di RNAm attraverso la Real-Time PCR, la concentrazione con il dosaggio ELISA e la misura dell'attività del promotore per PCSK9 tramite saggio della luciferasi; gli stessi esperimenti sono stati ripetuti con l'aggiunta di mevalonato (M), geranilgeraniolo (GGOH) e farnesolo (FOH). Il dosaggio G-LISA è stato utilizzato per valutare l'attivazione delle proteine G-monomeriche mentre l'effetto di Rac1 sull'espressione di PCSK9 è stato valutato tramite l'uso di inibitori farmacologici e siRNA e misurato tramite qRT-PCR.

Risultati. La simvastatina aumenta PCSK9 sia a livello di RNAm (+14,3±3,9) sia di proteina secreta misurata con saggio ELISA (+2,0±0,07), effetto recuperato parzialmente, ma in maniera significativa, dopo l'aggiunta di M, GGOH e FOH. L'attività del promotore per PCSK9, aumentata in presenza di simvastatina, è prevenuta dalla co-incubazione con M e GGOH ma non dal FOH. La simvastatina riduce in modo significativo solo i livelli di Rac1-GTP (forma attiva) del 18,3±2,4%, mentre non ci sono differenze per RhoA- e Cdc42-GTP. Anche questo effetto è prevenuto dalla co-incubazione con M e GGOH. L'inibizione di Rac1, dopo aggiunta di un inibitore, aumenta significativamente i livelli di PCSK9 mentre l'effetto della simvastatina su PCSK9 è contrastato dal silenziamento di Rac1.

Conclusioni. Questi risultati indicano un nuovo meccanismo di regolazione dell'espressione di PCSK9 indotta da statine, che potrebbe avere Rac1 come principale protagonista.

HISTONE DEACETYLASE 3 REGULATES METABOLISM AND BROWNING OF WHITE ADIPOSE TISSUE

Rui Silva, A. Ferrari, R. Longo, M. Crestani

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

Background. Obesity is one of the leading causes of health care issues all over the world. A multitude of health problems like atherosclerosis, cardiovascular diseases, type 2 diabetes and other metabolic disorders are associated with obesity. Based on obesity and its related co-morbidities, intense research has focused their attention in pathophysiology of adipose tissue and in therapies directed at improving their function. Beige cells are inducible brown-like adipocytes generated within white adipose tissue (WAT) through a process known as WAT browning, which increases energy expenditure and may reduce obesity and obesity-related health problems. We previously showed that histone deacetylases (HDACs) have the ability to regulate patterns of gene expression regulating energy metabolism.

Aim of the study. To investigate the functional role of HDAC3 in regulating metabolism and browning of white adipose tissue.

Methods: We generated the adipose-specific Hdac3 KO mouse model by Cre-lox technology and analyzed the regulatory pathways by gene expression, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and metabolomics analyses.

Results. Adipose deletion of HDAC3 promoted lipolysis and fatty acid β-oxidation, as shown by the increased expression of genes such as Atgl (18.469 fold increase versus floxed) and Acadl (18.954 fold increase versus floxed). Surprisingly, we also observed higher expression of genes involved in fatty acid (FA) synthesis such as Fasn (43.156 fold increase versus floxed) and Acaca (28.370 fold increase versus floxed). These results suggest an activation of a futile cycle of FA metabolism, which may feed the system with citrate and acetyl-CoA required for histone acetylation. Metabolic analysis showed decreased levels of both citrate (0,601±0,012 vs 0,059±0,002) and acetyl-CoA (0,276±0,0023 vs 0,123±0,001) in KO mice fed LFD supporting the hypothesis of their involvement in FA synthesis and histone acetylation.

Adipose deletion of HDAC3 also increased acetylation of a potent enhancer of Pparg gene (10,36±0,942 vs 20,84±2,683), as well as the enhancers of Ucp1 (2,590±0,317 vs 5,288±0,286) and Ppara (4,283±0,313 vs 8,778±1,023) genes, a typical condition that is present during brown adipocyte differentiation. Of note, we also found that these effects were lost when mice were fed high diet.

Conclusions. Our results highlight the important role of HDAC3 in regulating white adipose tissue physiology through specific transcriptional circuits regulated at the epigenome modifications in response to metabolic cues.

(supporting by FP7 Marie Curie ITN NR-NET 606806 and CARIPLO Foundation 2015-0641).

ZINC FINGER CCCH-TYPE CONTAINING 10 (ZC3H10) CONTROLLA LA FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DEL MUSCOLO SCHELETRICO

M. Audano¹, G. Cermenati¹, M. Crestani¹, D. Caruso¹, M. Pelizzola², S. Ghisletti³, E. Saez⁴, E. De Fabiani¹, N. Mitro¹
¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DisFeb), Università degli Studi di Milano, ²Center for Genomic Science of IIT@SEMM, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Milano; ³Department of Experimental Oncology, European Institute of Oncology (IEO), Milano; ⁴The Skaggs Institute for Chemical Biology, Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA

Introduzione. Grazie al ruolo centrale nel metabolismo energetico, i mitocondri risultano essere di fondamentale importanza per il corretto svolgimento dei principali processi cellulari, come ad esempio la staminalità, il differenziamento e la proliferazione cellulare. Inoltre, è largamente noto come disfunzioni mitocondriali siano responsabili anche di alcune patologie metaboliche, come ad esempio il diabete di tipo 1 e 2 (DT1&2). Recenti studi dimostrano, inoltre, che pazienti affetti da entrambe le forme di diabete presentano una ridotta capacità rigenerativa dei progenitori muscolari (MuSC), suggerendo la possibilità dell'esistenza di una stretta associazione tra riprogrammazione metabolica, differenziamento muscolare e insulino resistenza nel muscolo scheletrico.

Scopo. L'obiettivo di tale ricerca è di identificare e caratterizzare nuovi regolatori mitocondriali per meglio caratterizzare i meccanismi intrinseci coinvolti nello corretto sviluppo muscolare e lo sviluppo di insulino resistenza nel muscolo scheletrico. **Metodi.** I putativi regolatori mitocondriali sono stati individuati mediante uno screening su larga in cui è stata valutata la capacità di tali geni di regolare positivamente l'attività del promotore di Tfam, la densità e la funzionalità mitocondriale. L'overespressione e il silenziamento del regolatore individuato sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di un vettore adenovirale umano (Ad5) in cellule muscolari murine C2C12.

Risultati. Zinc Finger CCCH-type containing 10 (Zc3h10) è stato identificato come migliore candidato per ulteriori analisi di validazione. Analisi biochimiche e di immunofluorescenza dimostrano che Zc3h10 è una proteina nucleare espressa unicamente nelle prime fasi dello sviluppo muscolare. La sua overespressione porta ad un aumento dei livelli di Tfam, ad un aumento della funzionalità mitocondriale e del differenziamento muscolare. Contrariamente, il suo silenziamento diminuisce l'attività mitocondriale e lo sviluppo muscolare. Analisi di immunoprecipitazione dell'RNA, di cinetica dell'RNA e metilazione del trascrittoma indicano che Zc3h10 regola selettivamente il metabolismo di alcuni mRNA coinvolti nel metabolismo del ferro e del differenziamento muscolare come mitoferrina, miogenina, titina e actina e del long non-coding RNA H19. Inoltre, analisi di citochimica e spettrofotometria dimostrano come il silenziamento di Zc3h10 sia causa di un accumulo di ferro in mioblasti e miotubi (Controllo: 0.99 µg/µg di proteina vs ShZc3h10: 1.40 µg/µg di proteina), mentre il ripristino dell'espressione di Zc3h10 è sufficiente per ripristinare i livelli di ferro pari al controllo (Controllo: 0.91 µg/µg di proteina vs ShZc3h10: 0.79 µg/µg di proteina). In conclusione, i nostri risultati contribuiscono a comprendere il ruolo biologico di

Zc3h10 nella fisiologia del muscolo scheletrico, identificandolo come nuovo regolatore positivo sia della funzionalità mitocondriale sia dello sviluppo muscolare. Ulteriori analisi precliniche aiuteranno a definire il suo ruolo anche in contesto patologico come quello dell'insulino resistenza e del diabete di tipo 2.

LA DE NOVO SINTESI DEGLI ACIDI GRASSI INFLUENZA L'ATTIVAZIONE DELLE CELLULE IMMUNITARIE: FOCUS SU SREBP1C NEI LINFOCITI T

F. Bonacina^{1*}, G. Cermenati^{1*}, D. Caruso¹, A. L. Catapano^{1,2}, N. Mitro¹ and G. D. Norata^{1,3,4}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²IRCSS MultiMedica, Milan; ³Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (Milano); ⁴William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University (London, UK)

*Questi autori hanno contribuito equamente al lavoro

Il metabolismo intracellulare è stato recentemente riconosciuto come un fattore determinante nella differenziazione e attivazione delle cellule immunitarie. L'uso di modelli animali mancanti di geni chiave del metabolismo lipidico rappresenta un'importante strategia per indagare il loro impatto sulle risposte immunitarie e per sviluppare nuovi approcci terapeutici in ambito immunometabolico. SREBP1c è una delle tre isoforme appartenente alla famiglia delle sterol regulatory element-binding proteins ed è coinvolta nella regolazione della sintesi degli acidi grassi. È stato infatti recentemente dimostrato come ACC1 (acetil-CoA carbossilasi 1), un gene target di SREBP, sia cruciale nella polarizzazione dei linfociti CD4 verso un fenotipo regolatore (Treg).

Scopo del nostro lavoro è studiare il coinvolgimento di SREBP1c nella risposta immunitaria adattativa, con particolare attenzione ai linfociti T. Per questo motivo, è stata condotta una dettagliata caratterizzazione di topi SREBP1c KO e WT littermates, in particolare è stata effettuata l'analisi delle popolazioni linfocitarie tramite citofluorimetria e del profilo metabolico tramite espressione genica e metabolomica negli organi linfoidi di secondari.

La mancanza di SREBP1c modifica la distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie in linfonodi e milza provocando splenomegalia (0,31±0,015 vs 0,25±0,014 g milza/g peso corporeo, p<0,001). In particolare si osserva una riduzione dei linfociti CD4CD44+ (18,48±1,03% vs 22,85±0,54%, p<0,01), dei linfociti CD8CD44+ (11,63±0,82% vs 14,86±1,24%, p<0,05), e delle cellule T regolatorie (2,61± 0,25% vs 3,38 ±0,10%, p<0,01) nei topi KO. Infine, l'espressione genica e l'analisi metabolomica di linfonodi e milza hanno confermato che negli animali SREBP1c KO il pathway di sintesi degli acidi grassi è significativamente ridotto ed associato ad una disfunzione sia della glicolisi che del ciclo di Krebs, risultante in una ridotta produzione di ATP. SREBP1c gioca un ruolo fondamentale anche nel metabolismo delle cellule immunitarie e la sua mancanza è stata associata ad una differente distribuzione di sottopopolazioni linfocitarie negli organi linfoidi, suggerendo che una modulazione della sintesi degli acidi grassi possa rappresentare un'innovativa opzione terapeutica per la cura di patologie caratterizzate da alterazioni delle risposte immunitarie.

ABCA1 E HDL3: ELEMENTI CHIAVE NELLA MODULAZIONE DEI CAMBIAMENTI FENOTIPICI DELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE DOPO CARICO DI COLESTEROLO

S. Castiglioni¹, M. Monti¹, A. Vettore¹, L. Arnaboldi¹, A. Corsini¹, S. Bellosta²

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari;

²Dipartimento di Oncologia ed Emato-Oncologia, Università degli Studi di Milano

Nella placca aterosclerotica più del 50% delle cellule schiumose (foam cells, FCs) origina da cellule muscolari lisce (SMCs). Dopo accumulo di colesterolo, le SMCs modificano il loro fenotipo da contrattile a sintetico/proliferativo, diminuendo l'espressione di markers tipici delle SMCs (come ACTA-2) e aumentando quella di markers di tipo macrofagico (come Mac-2 e SRB1). Le SMCs esprimono ABCA1, trasportatore di membrana coinvolto nel trasporto inverso del colesterolo. Al fine di caratterizzare il ruolo di ABCA1 in questo processo di modulazione fenotipica, abbiamo valutato i cambiamenti indotti da carico di colesterolo in SMCs isolate da topi controllo (WT) e ABCA1 knock out (KO) e come la presenza di HDL3 moduli questi cambiamenti. Nelle cellule WT la presenza di HDL3 normalizza i valori di ACTA-2 e dei markers macrofagici, rispettivamente ridotti ed aumentati dopo carico di colesterolo. L'effetto preventivo delle HDL3 è completamente perso nelle cellule KO. Il silenziamento di ABCA1, tramite l'utilizzo di siRNA, abolisce completamente, nelle cellule WT, l'effetto preventivo indotto dalle HDL3.

Il carico di colesterolo riduce, sia nelle cellule WT sia nelle KO, l'espressione della miocardina (-55%, $p < 0,01$ vs controllo), un coattivatore chiave della trascrizione miogenica coinvolto nella regolazione della differenziazione delle SMCs. Le HDL3 normalizzano i livelli di miocardina nelle cellule WT, mentre non hanno alcun effetto nelle KO. Risultati simili sono stati ottenuti per miR143/145, regolatori della differenziazione-miocardina dipendente delle SMCs.

L'espressione basale del KLF4, fattore che reprime l'espressione della miocardina e l'attivazione dei geni tipici delle SMCs indotta da miocardina, raggiunge nelle cellule KO valori doppi rispetto alle cellule WT, mentre, inaspettatamente, i valori di KLF4, dopo carico di colesterolo non aumentano in entrambe le linee. I nostri risultati indicano che le HDL3, interagendo con ABCA1, attivano l'asse miR143/145-miocardina e prevenendo, nelle cellule WT, i cambiamenti fenotipici indotti da carico di colesterolo. L'assenza di ABCA1 nelle cellule KO inibisce questa via metabolica. La modulazione del cambiamento fenotipico delle SMCs potrebbe, alla luce dei nostri dati, rappresentare un importante bersaglio nel trattamento dell'aterosclerosi.

STRESS OSSIDATIVO E QUADRO LIPIDICO ALTERATO QUALI COFATTORI DELLA CARDIOMIOPATIA ARITMOGENA: STUDI IN CELLULE MESENCHIMALI STROMALI CARDIACHE UMANE

L. Arnaboldi¹, S. De Metrio¹, I. Stadiotti², S. Brambilla², G. Milano², A. Scopece², F. Cattaneo², A. Granata¹, A. Corsini¹, C. Tondo², G. Pompilio^{2*}, E. Sommariva^{2*}

¹Università degli Studi di Milano, DISFeB; ²Centro Cardiologico Monzino IRCCS

*Questi autori hanno contribuito equamente al lavoro

La Cardiomiopatia Aritmogena (AC), caratterizzata dalla sostituzione fibro-adiposa delle pareti ventricolari cardiache, provoca aritmie e morte improvvisa, soprattutto in giovani atleti. Nonostante la AC sia trasmessa in modo autosomico dominante, presenta penetranza ed espressività altamente variabili, suggerendo il coinvolgimento di possibili cofattori determinanti la manifestazione clinica.

Studi clinici condotti dal Centro Cardiologico Monzino hanno documentato come colesterolo (totale, -LDL) e ox-LDL nel plasma siano aumentati nei pazienti AC rispetto ai controlli, evidenziando che alterato quadro lipidico e esercizio fisico intenso, causa di stress ossidativo e di rilascio di radicali liberi (ROS), possano contribuire alla progressione della patologia. Pertanto, abbiamo condotto studi su cellule mesenchimali stromali cardiache (C-MSC) umane derivate da biopsie di pazienti AC e NON-AC.

Già in condizioni basali nelle C-MSC AC, ROS ($5,73 \pm 0,8$ vs $3,73 \pm 0,4$) e espressione di PPARgamma ($5 \pm 1,1$ vs $1,4 \pm 0,7$; $p = 0,05$) e CD36 ($116 \pm 57,8$ vs $1,8 \pm 0,5$; $p = 0,05$) sono aumentati rispetto alle NON-AC.

Quando coltivate in medium adipogenico, le C-MSC presentano un incremento nella massa di tutte le classi lipidiche esaminate (significativo per colesterolo libero ($9,37 \pm 1,65$ vs $7,9 \pm 0,9$) e trigliceridi ($35,80 \pm 5,8$ vs $19,45 \pm 3,7$) vs controlli).

Per comprendere il possibile meccanismo d'azione della AC, stiamo validando nelle C-MSC quello già documentato *in vitro* nei macrofagi, ovvero l'iperattivazione di PPARgamma e la trascrizione di fattori proadipogenici, dopo interazione del recettore scavenger CD36 con le ox-LDL, tramite l'acido grasso ossidato 13-HODE.

A tale scopo, abbiamo coltivato C-MSC in medium adipogenico addizionato con 13-HODE, documentando un accumulo di lipidi neutri ($259,8 \pm 42,5$ vs $135,5 \pm 24,4$) e un'espressione di PPARgamma (4,1 volte) e di CD36 (7,4 volte) significativamente maggiori vs NON-AC.

Alla luce di queste evidenze, ipotizziamo che la mutazione genica sia condizione necessaria ma non sufficiente per la manifestazione della patologia e proponiamo la dislipidemia e lo stress ossidativo come cofattori esacerbanti.

Abbiamo programmato studi in vivo ed ex vivo su stress ossidativo e dislipidemia in un modello murino apoE KO mutato nel gene della placofilina (coinvolto nella patogenesi della AC), nutrito con dieta western arricchita in 13-HODE e sottoposto ad esercizio fisico intenso, per contribuire alla comprensione della patologia, allo scopo ultimo di identificare un trattamento farmacologico specifico.

CARATTERIZZAZIONE DELLA SINDROME METABOLICA NELLA COORTE PLIC

L. Chiodo¹, M. Casula¹, A. Baragetti^{2,3}, L. Grigore³, F. Pellegatta³, K. Garlaschelli³, L. Redaelli³, C. Tidone³, E. Loggia¹, A. Tincani³, G.D. Norata^{2,3}, A.L. Catapano^{1,4}, E. Tragni¹

¹Centro di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ³Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI); ⁴IRCCS MultiMedica Sesto S. Giovanni (MI)

Background. La Sindrome Metabolica (SM) viene definita come un "cluster" di fattori di rischio (ipertensione, obesità viscerale, alterato metabolismo glucidico, dislipidemia aterogena) che determina un incremento del rischio cardiovascolare. Scopo dello studio era determinare la prevalenza di SM e dei suoi determinanti in una coorte di soggetti adulti "sani" e valutarne i trend temporali.

Metodi. La coorte proviene dallo studio PLIC, uno studio osservazionale trasversale e prospettico su soggetti arruolati su base volontaristica negli anni 1998-2000 e seguiti per un periodo medio di follow-up di 11 anni. L'analisi è stata condotta sui soggetti che hanno effettuato tutte e 4 le visite previste. La prevalenza di SM è stata definita mediante i criteri proposti dalle linee guida armonizzate (IDF, NHLBI, AHA, ATP-III), secondo cui un soggetto è affetto da tale condizione se presenta almeno 3 dei seguenti parametri: circonferenza vita superiore a 102 cm negli uomini e 88 cm nelle donne; livelli di trigliceridi (TG) di almeno 150 mg/dL o in terapia con fibrati; colesterolo HDL (c-HDL) inferiore a 40 mg/dL nei maschi e 50 mg/dL nelle femmine; pressione arteriosa (PA) superiore a 130/85 mmHg o in terapia con farmaci antipertensivi; livelli di glucosio superiori a 100 mg/dL o in trattamento con ipoglicemizzanti.

Risultati. Il campione era rappresentato da 1445 pazienti, di cui il 21,6% (M 24,3%, F 19,7%) presentava SM nella prima visita. La prevalenza aumentava nel corso delle visite, raggiungendo il 25,2% in visita 4. Stratificando per classi d'età si osserva una maggiore prevalenza di SM nella classe d'età ≥65 anni (V1 29,2%). Il determinante che, in ogni visita, era maggiormente presente nei soggetti con SM era la PA superiore ai cut-off (95,5%; 69,3% nel campione totale); a partire dalla visita 3, i pazienti con SM con valori di glucosio superiori al cut-off aumentavano, fino a raggiungere il 78% in visita 4 (30,6% nel campione totale); lo stesso trend era evidente anche per la circonferenza vita. Al contrario, la prevalenza dei determinanti riferiti ai valori di c-HDL e TG diminuiva nel corso delle visite.

Conclusioni. L'elevata percentuale di soggetti affetti da SM dovrebbe richiamare l'attenzione sulla gestione e soprattutto la prevenzione di tutti quei fattori di rischio cardiometabolici che, singolarmente e ancor di più in associazione, possono portare ad un aumento dell'incidenza di eventi cardiovascolari, a prescindere dall'età.

NORMALIZZAZIONE DEL PROFILO LIPOPROTEICO DURANTE LA GRAVIDANZA IN UN SOGGETTO CON DEFICIT GENETICO DI LCAT

A. Ossoli¹, E. Hanna², S. Simonelli¹, R. Mullan³, S. Chamney⁴, J. Chestnutt², F. Stewart⁵, G. Franceschini¹, L. Calabresi¹

¹Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Department of Biochemistry and ³Renal Unit, Antrim Hospital, Northern Health and Social Care Trust, UK; ⁴Department of Ophthalmology, Royal Victoria Hospital; ⁵Department of Genetics, Belfast City Hospital, Belfast Health and Social Care Trust, UK

I soggetti affetti da deficit genetico di LCAT mostrano marcate alterazioni del profilo lipidico e lipoproteico plasmatico. La presenza di una lipoproteina anomala, chiamata Lipoproteina X (LpX), sembra essere coinvolta nello sviluppo della patologia renale.

Questo lavoro descrive la normalizzazione del profilo lipoproteico durante il periodo di gestazione in un soggetto con deficit di LCAT. La portatrice è una donna di 29 anni che presenta opacità corneale, ridotti livelli di colesterolo HDL e proteinuria (creatinina 113.7 mg/mmol). Campioni di sangue sono stati raccolti alla ventiduesima settimana di gestazione e 14 settimane dopo il parto. Analisi genetiche confermano la diagnosi di deficit di LCAT con la presenza di due diverse mutazioni sul gene che codifica per questa proteina.

La massa, l'attività e il rapporto tra colesterolo non esterificato/colesterolo totale sono rimasti invariati durante la gravidanza e nel periodo post-partum. Le concentrazioni di colesterolo totale, colesterolo HDL e fosfolipidi sono invece aumentate durante il periodo di gestazione. La gravidanza è stata poi complicata da una severa ipertrigliceridemia (613 mg/dL), molto più marcata di quella osservata nei normali cambiamenti fisiologici che avvengono durante la gestazione.

Sorprendentemente, i livelli di proteinuria misurati sono significativamente migliorati durante la gravidanza (creatinina 13,9 mg/mmol), nonostante la sospensione del trattamento con ACE inibitore. I livelli di proteinuria sono però nuovamente peggiorati dopo il parto (creatinina 131,6 mg/mmol). L'analisi del profilo lipoproteico mostra la presenza di LpX solo dopo il parto, mentre questa proteina anomala non è rilevabile durante la gravidanza.

LpX sembra essere direttamente coinvolta nello sviluppo della malattia renale nei soggetti con deficit di LCAT e la sua scomparsa durante la gestazione porta ad un miglioramento della proteinuria e della funzionalità renale.

INFLUENZA DEL FENOTIPO DELL'APOLIPOPROTEINA E SUL QUADRO LIPIDICO BASALE E DOPO SEI MESI DI CONSULENZA NUTRIZIONALE IN UN CAMPIONE DI BAMBINI CON IPERCOLESTEROLEMIA

C. Pederiva, C. Frattini, S. Fedeli, E. Verduci, G. Banderali
Centro Dislipidemie in Età Pediatrica, Clinica Pediatrica, ASST Santi Paolo e Carlo, Università degli Studi di Milano

Introduzione. L'apolipoproteina E riveste un ruolo regolatorio importante del metabolismo lipidico. Il locus genico dell'apo E è polimorfico e comprende tre varianti alleliche che codificano per tre fenotipi omozigoti (E2E2, E3E3, E4E4) e tre eterozigoti (E3E2, E4E3, E4E2). È stato descritto che il fenotipo E4 determina livelli più elevati di colesterolo totale ed LDL, con maggiore risposta alla dieta ipolipidica.

Scopo dello studio. Scopo dello studio è quello di valutare l'influenza del genotipo apo E sul quadro lipidico basale e dopo 6 mesi di intervento dietetico nutrizionale in un gruppo di bambini ipercolesterolemici afferenti per la prima volta al nostro Centro, che non avevano ricevuto alcuna indicazione specifica precedente.

Soggetti e Metodi. 82 bambini, 39 maschi e 43 femmine di età compresa tra 2 e 14 anni (mediana 7) sono stati sottoposti all'ingresso a determinazione di: 1) genotipo dell'apo E (amplificazione con PCR e analisi dei polimorfismi di restrizione con HhaI), 2) assetto lipidico: colesterolo totale, colesterolo LDL (CT-LDL), colesterolo HDL (CT-HDL) e trigliceridi (TG) con metodo enzimatico; dopo 6 mesi di consulenza nutrizionale è stato nuovamente valutato il quadro lipidico. Statistica: test t di Student.

Risultati. Gli 82 bambini sono stati classificati in base al genotipo apo E nei gruppi E2 (fenotipo E2/E3, 1 bambino), E3 (fenotipo E3E3, 66 bambini) ed E4 (fenotipi E3/E4 o E4/E4, 15 bambini). Il gruppo E4 presentava, rispetto al gruppo E3, valori medi (mg/dl±DS) significativamente più bassi di CT (242±46 vs 268±55, p=0,04) e CT-LDL (172±49 vs 203±58, p=0,05). Dopo 6 mesi di consulenza nutrizionale la diminuzione media di CT e CT-LDL negli 82 bambini è stata 20 mg/dl (p<0,001), paragonabile nei 2 gruppi E3 ed E4 mentre i valori medi di TG e CT-HDL sono rimasti invariati.

Discussione. I valori di CT e CT-LDL basali sono risultati inaspettatamente inferiori nei soggetti E4 e nessuna differenza nella risposta alla dieta è stata osservata tra i due gruppi. Una possibile spiegazione è che la restrizione lipidica già messa in atto dai genitori nei bambini ipercolesterolemici prima della consulenza nutrizionale possa avere influito sui livelli di colesterolemia con un impatto maggiore nel gruppo E4.

POSTER MODERATI

MISURA SENZA CONTATTO DELLA STIFFNESS ARTERIOSA TRAMITE TRIANGOLAZIONE LASER

V. Favalli¹, L.P. Giuliani¹, M. Benedetti², A. Di Toro¹, M. Di Giovannantonio¹, P. Minzioni³, Guido Giuliani^{2,3}, Eloisa Arbustini¹
¹Centro Malattie Genetiche Cardiovascolari Irccs Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia; ²Julight s.r.l., Pavia; ³Dept. of Electrical, Computer and Biomedical Engineering, Università degli Studi di Pavia

La stiffness arteriosa (SA) è descritta in letteratura come predittore di rischio cardiovascolare. Viene valutata tramite la velocità di propagazione dell'onda pressoria nell'aorta e nelle altre arterie (PWV). La PWV è misurata in maniera non invasiva mediante trasduttori piezoelettrici per contatto o tecniche ecografiche.

Durante il progetto UE "NISTAS" (n. 606668), abbiamo misurato la PWV utilizzando un metodo senza contatto di rilevazione dello spostamento della pelle del collo (100 µm) in concomitanza con la propagazione dell'onda pressoria nelle arterie carotidee sottostanti: registrando il ritardo di spostamento in due punti sul collo a distanza nota (40 mm), abbiamo calcolato la velocità dell'onda come spazio/tempo di propagazione.

Due lame LED blu vengono proiettate sul collo del soggetto, e lo spostamento della pelle sottostante viene rilevato da un sensore CCD. Il ritardo tra le due onde viene calcolato tramite cross-correlazione lungo ciascuna lama (trasversale al lume della carotide studiata), individuando due picchi corrispondenti al passaggio dell'onda.

Il prototipo include una testa ottica con 2 LED e una CCD camera, orientabile e fissata al lettino con un braccio meccanico, una unità di acquisizione dati e ad un computer.

Criteri di esclusione erano: età <18, ipertensione trattata, diabete mellito 1 o 2, ipercolesterolemia, malattia coronarica o cerebrovascolare, stenosi carotidea arteriosa, malattia vascolare periferica grave, cardiomiopatia ipertrofica o dilatativa, insufficienza cardiaca congestizia, valvulopatie, chirurgia cardiaca, cardiopatia congenita, malattie sistemiche (cancro, malattie endocrine o autoimmuni), assunzione di terapia regolare.

Abbiamo eseguito misure in triplicato sulle carotidi comuni in 25 volontari sani adulti, di età media 43,2±5,67 anni (tra 23 e 55). La PWV media (±SD) era 5,37±0,92 m/s nella carotide destra e 5,31±0,97 m/s nella carotide sinistra. Nei maschi la PWV media (±SD) era 5,35±0,95 (a destra) e 5,2±1,04 (a sinistra); nelle femmine la PWV media era 5,42±1,03 e 5,23±1,04 nella carotide destra e sinistra rispettivamente.

Sebbene un'ottimizzazione del prototipo sia ancora necessaria prima di passare a una sperimentazione clinica su un'ampia popolazione, i risultati ottenuti sono confrontabili con quelli della letteratura e promettenti per lo sviluppo di un sistema rapido, non invasivo, non operatore dipendente per lo studio della SA.

L'ESPRESSIONE SREGOLATA DEL GENE "ANKYRIN REPEAT DOMAIN 1" DURANTE LO SVILUPPO MIOCARDICO CAUSA RITORNO VENOSO POLMONARE ANOMALO E DIFETTI MORFOGENETICI ATTRAVERSO UNA COMPROMISSIONE DEL RIMODELLAMENTO CARDIACO

M. Campione¹, G.S. Ganzetti², S. Manzini², L. Monti³, G. Chiesa², M. Busnelli², F. Dellerà², I. Badi⁴, F. Acquati³, C. Parolini²

¹CNR - Istituto di Neuroscienze, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova; ²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ³Dipartimento di Scienze Teoriche e Applicate, Università degli Studi dell'Insubria, Varese; ⁴Experimental Cardio-Oncology and Cardiovascular Aging Unit, Centro Cardiologico Monzino-IRCCS, Milano

La proteina CARP (Cardiac Ankyrin Repeat Protein 1), codificata dal gene *Ankyrin repeat domain 1* (*Ankrd1*), è stata identificata nelle cellule endoteliali dei vasi, nei cardiomiociti, nel muscolo scheletrico e nelle cellule muscolari lisce. Studi di embriogenesi hanno evidenziato come CARP mRNA sia espresso nel miocardio di embrioni a partire da 8,5 giorni di gestazione per poi gradualmente diminuire nei neonati e nell'adulto. Questo pattern di espressione suggerisce che CARP possa funzionare come un inibitore dell'espressione genica cardiaca e possa svolgere un ruolo fondamentale nella morfogenesi cardiaca. Risultati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca hanno portato all'identificazione del gene *Ankrd1* come uno dei geni responsabili del ritorno venoso anomalo polmonare totale (TAPVR). Il TAPVR è una malattia cardiaca congenita in cui le vene polmonari non confluiscono nell'atrio sinistro ma in una struttura venosa sistemica. In particolare, due pazienti affetti da TAPVR presentavano una sovraespressione della proteina CARP: a livello di trascritto, nel portatore della traslocazione 10;21, mentre nel portatore della mutazione missense T116M (sostituzione di una treonina con una metionina) a livello di una maggior stabilità della proteina. Questi dati suggeriscono che la sovraespressione di CARP durante la morfogenesi cardiaca possa essere associata a una connessione anomala delle vene polmonari. Per questo motivo sono state generate due linee transgeniche murine che sovraesprimono rispettivamente la proteina CARP wild-type (WT-CARP) e la proteina mutata (T116M-CARP) sotto il controllo del promotore del gene murino per la catena pesante della miosina, al fine di ottenere un'espressione del transgene esclusivamente a livello del miocardio. Embrioni da topi WT-CARP e T116M-CARP sono stati prelevati 10,5 e 14,5 giorni dopo l'accoppiamento e processati per analisi morfologiche e di espressione. In parallelo sono stati prelevati anche embrioni da topi non transgenici. Rispetto ai cuori di embrioni controllo, i cuori di embrioni WT-CARP e T116M-CARP presentavano difetti morfogenetici e connessioni anomale delle vene polmonari, associati a marcate alterazioni strutturali tipiche di TAPVR. Inoltre, il cuore degli embrioni transgenici presentava atri di dimensioni anomale con alterazioni del setto interatriale. Infine, la trabecolazione delle camere cardiache era significativamente maggiore rispetto a quanto osservato nelle camere dei cuori controllo. In conclusione, possiamo definire CARP come una "critical sensor-signaling molecule" in grado di modulare le proprietà dei cardiomiociti

durante lo sviluppo neonatale. I nostri risultati aggiungono nuovi livelli di complessità nella regolazione genetica dello sviluppo cardiaco.

IL PARADOSSO DELLE STATINE IN CELLULE VALVOLARI TRICUSPIDI E BICUSPIDI

P. Songia, E. Tremoli, P. Poggio
Centro Cardiologico Monzino, IRCCS

Introduzione. Le statine sono prescritte principalmente per la loro capacità di abbassare il colesterolo, ma hanno anche effetti benefici non correlati al metabolismo del colesterolo. Negli ultimi dieci anni, diversi studi clinici sono stati eseguiti per arrestare la progressione della calcificazione della valvola aortica (AV), mostrando sostanziale equivalenza tra trattamenti e placebo. È stato ipotizzato che la terapia fosse stata iniziata troppo tardi per essere efficace. Infatti, in letteratura è stato descritto il "paradosso delle statine", in cui il trattamento con statine ha portato alla diminuzione di marcatori osteoblastici in miofibroblasti valvolari, aumentando però gli stessi in osteoblasti valvolari. Le cellule interstiziali valvolari (VIC) sono plastiche, nella valvola sana sono in uno stato quiescente e durante lo sviluppo della patologia dell'AV si differenziano prima in miofibroblasti e infine in osteoblasti.

Metodi. Abbiamo isolato VIC da AV tricuspidi (TAV; n=5) e da AV bicuspidi (BAV; n=5). Abbiamo utilizzato basse concentrazioni di fosfato-inorganico (lowPi; 2 mM) per simulare lo stadio iniziale della patologia e alte concentrazioni (highPi; 5 mM) per gli stadi avanzati. Le cellule sono state trattate per 7 giorni in presenza di statine (pravastatina, simvastatina e atorvastatina) a diverse concentrazioni per valutarne l'effetto sulla calcificazione delle VIC.

Risultati. Il trattamento con lowPi ha portato alla calcificazione sia di TAV-VIC che di BAV-VIC senza differenze (121±14,0 vs 167±21,9 ng). Il trattamento con highPi ha mostrato differenze significative (p<0,001) tra le due popolazioni, dove BAV-VIC hanno prodotto più depositi di calcio (390±41,6 ng) rispetto TAV-VIC (97±23,0 ng). I trattamenti con pravastatina+lowPi, hanno mostrato un netto aumento delle calcificazioni in TAV-VIC (p<0,01), mentre hanno portato a una significativa riduzione in BAV-VIC (p<0,05). La simvastatina ha diminuito le calcificazioni in entrambe le popolazioni (p<0,001) e l'atorvastatina le ha aumentate in entrambe (p<0,05). In presenza di highPi, tutte e tre le statine hanno aumentato significativamente le calcificazioni in TAV-VIC (p<0,001), mentre solo la pravastatina le ha aumentate in BAV-VIC (p<0,05).

Conclusioni. I nostri esperimenti mostrano che la simvastatina può avere un effetto benefico nelle fasi iniziali della calcificazione della valvola aortica, mentre gli effetti della pravastatina sono legati alla morfologia della valvola stessa.

MACROFAGI E ATEROSCLEROSI CORONARICA: STUDIO IN VITRO E IMAGING DI PLACCA

S. Fiorelli¹, S. Eligini¹, N. Cosentino¹, F. Fabbicocchi¹, G. Niccoli², A. Bonomi¹, F. Crea², G. Marenzi¹, E. Tremoli¹

¹Centro Cardiologico Monzino I.R.C.C.S., Milano;

²Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Introduzione. L'aterosclerosi coronarica rappresenta una delle maggiori cause di morte nei paesi occidentali. La tomografia ottica a contrasto di fase (OCT) è una tecnica invasiva che permette la visualizzazione in vivo ad alta risoluzione (10 µm) delle placche coronariche. Mediante questa tecnica è possibile analizzare la morfologia delle placche in termini di spessore del cappuccio fibroso, contenuto lipidico, presenza di trombi e contenuto macrofagico. I macrofagi svolgono un ruolo fondamentale in tutti gli stadi della patologia coronarica (CAD), dalla comparsa della stria lipidica fino alla lesione complicata. Sono cellule eterogenee in termini di morfologia e funzione e la prevalenza di un fenotipo può influenzare la progressione della patologia e la stabilità della placca. I macrofagi di placca non sono disponibili e macrofagi ottenuti per differenziamento spontaneo dei monociti isolati dal sangue periferico (MDM) rappresentano un buon surrogato, tuttavia ad oggi non ci sono informazioni relative alle caratteristiche delle cellule ottenute in vitro nelle diverse presentazioni cliniche della patologia aterosclerotica.

Scopo. Analizzare le correlazioni tra le proprietà morfologiche e funzionali degli MDM isolati dal sangue periferico di pazienti affetti da CAD e le caratteristiche delle placche coronariche in vivo analizzate mediante OCT.

Risultati. L'analisi morfologica degli MDM ottenuti da volontari sani mostra la presenza di cellule lunghe e cellule tonde presenti in ugual misura. Al contrario, gli MDM ottenuti da pazienti affetti da CAD mostrano una prevalenza di cellule aventi morfologia tondeggianti, che correla positivamente con la presenza di un cappuccio fibroso sottile, con il contenuto lipidico e con il numero di macrofagi intraplacca valutati *in vivo* mediante OCT. Gli MDM dei pazienti hanno una ridotta capacità di fagocitare cellule apoptotiche (efferocitosi) rispetto ai volontari sani. Tale capacità correla positivamente con l'area minima luminale, valutata mediante OCT. Inoltre, gli MDM dei pazienti CAD presentano livelli di fattore tissutale superiori ai volontari sani. Tali livelli correlano positivamente con la presenza di una placca rotta, la presenza di trombo e la presenza di macrofagi intra-placca.

Conclusioni. Gli MDM dei pazienti con CAD presentano un profilo pro-infiammatorio e pro-trombotico che si associa alla presenza di una placca vulnerabile, ad alto rischio e prona alla rottura.

IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE: APPROCCIO TERAPEUTICO E ADERENZA ALLA TERAPIA IN SOGGETTI <40 ANNI IN LOMBARDIA

M. Casula¹, L. Scotti², E. Tragni¹, G. Corrao², A.L. Catapano^{1,3}

¹Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Statistica e Metodi Quantitativi, Sezione di Biostatistica, Epidemiologia e Sanità Pubblica, Università di Milano-Bicocca, Milano; ³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI)

Contesto. Nonostante una prevalenza non trascurabile, l'elevato rischio cardiovascolare ad essa associato e i benefici terapeutici del trattamento con statine, l'ipercolesterolemia familiare (FH) è una patologia sottotrattata. Obiettivo di questo studio è descrivere l'approccio terapeutico in giovani pazienti con diagnosi di FH eterozigote, i cambi di terapia e l'aderenza al trattamento.

Metodi. Dai database amministrativi della Regione Lombardia, sono stati identificati gli individui che avevano ricevuto esenzione per FH eterozigote nel periodo 1/1/2003-31/12/2011 e che avessero meno di 40 anni al rilascio dell'esenzione. Tra questi, sono stati selezionati i nuovi utilizzatori di statine. Nel primo anno di trattamento, sono stati stimati numero e tipologia di cambi e aderenza e persistenza alla terapia.

Risultati. Di 1404 pazienti, di età media±DS 33,3±5,4 anni, il 33,4% ha iniziato il trattamento con simvastatina, il 29,6% con rosuvastatina e il 21,6% con atorvastatina; il 4,6% ha ricevuto inizialmente la combinazione simvastatina+ezetimibe. Il 42,4% della coorte è stato inizialmente trattato con una statina ad alta potenza. Il 23,4% della coorte ha effettuato almeno un cambio di principio attivo e/o di dosaggio entro il primo anno. I cambi riguardavano una riduzione della potenza (34,5%) o un aumento della potenza (46,0%). Il 9,2% dei soggetti ha abbandonato la terapia dopo la prima prescrizione. In media, la copertura a un anno era pari al 61,6%±26,3% e il 47,0% dei pazienti era persistente alla terapia. L'aderenza ottimale (≥80%) era significativamente associata con la prima statina prescritta (atorvastatina, Rischio Relativo 1,28 [IC 95% 1,09-1,51] e rosuvastatina RR 1,21 [1,01-1,44], vs simvastatina), storia di eventi cardiovascolari (RR 1,33 [1,12-1,59]), almeno un cambio di terapia (RR 1,86 [1,43-2,41]) e almeno un test lipidico (RR 1,28 [1,15-1,43]). Un pattern simile è stato osservato per la persistenza.

Conclusioni. L'analisi di questa coorte di pazienti <40 anni con esenzione per FH eterozigote ha mostrato un sottoutilizzo delle statine ad alta potenza. Il cambio di terapia è abbastanza frequente, e riflette probabilmente la necessità di aggiustare la terapia per evidenze di intolleranza o di scarsa efficacia. L'aderenza, nonostante il miglioramento nel tempo, resta complessivamente inadeguata anche in questa popolazione a rischio cardiovascolare particolarmente alto.

ELEVATI LIVELLI DI LP(A) SONO ASSOCIATI AD UN AUMENTATO SPESSORE INTIMALE CAROTIDEO IN PAZIENTI CON IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE GENETICAMENTE DETERMINATI

K. Garlaschelli¹, F. Pellegatta¹, L. Grigore^{1,3}, A. Baragetti^{1,2}, G.D. Norata^{1,2,4}, A.L. Catapano^{1,2,3}

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

Introduzione. Livelli elevati di Lipoproteina (a) risultano essere un fattore causale per gli eventi cardiovascolari, specialmente in pazienti ad alto rischio cardiovascolare. Alla luce di questo abbiamo investigato la possibile associazione tra aumentati livelli di Lp(a) e lo spessore intimale medio carotideo (c-IMT), un marker surrogato di aterosclerosi pre-clinica, sia nella popolazione generale sia in pazienti ipercolesterolemici familiari portatori di mutazione, su uno dei geni target, in forma eterozigote (HeFH).

Metodi. Sono stati dosati i livelli di Lp(a) in 1,369 soggetti appartenenti allo Studio PLIC e in 105 pazienti FH (47 uomini e 58 donne) con diagnosi genetica positiva (portatori di mutazione in forma eterozigote su uno dei seguenti geni: LDLR, PCSK9, APOB). Inoltre, sono stati raccolti, per tutti, parametri biochimici, anamnesi familiari e farmacologica. Le misurazioni dello spessore per la carotide comune, interna e del bulbo sono state eseguite mediante ecografo con sonda ad ultrasuoni ed è stata calcolata la media dei valori medi di tutti e tre i tratti. I livelli di Lp(a) sono stati dosati mediante un test quantitativo turbidimetrico, a multicalibratori e non influenzato dalle isoforme di apo(a).

Risultati. Nella popolazione generale, la mediana dei livelli plasmatici di Lp(a) è risultata essere di 20,10 (3,00-91,70) mg/dL; i soggetti nel terzile di Lp(a) più alto mostrano 5 mg/dL di C-LDL e 3 mg/dL di apoB in più rispetto ai soggetti appartenenti al terzile più basso ($p=0,016$ and $p=0,008$ rispettivamente). Mentre i livelli di Lp(a) non correlano con c-IMT, il quale variava da 0,840 (0,632-1,139) mm nel primo terzile di Lp(a) vs 0,857 (0,663-1,143) mm nel terzo ($p>0,05$). Inoltre, Lp(a) non risulta essere correlata con la presenza di placche focali.

All'interno del gruppo dei pazienti FH (HeFH) sono stati inclusi nella analisi 41 soggetti in quanto non in terapia ipolipemizzante. I livelli medi di C-LDL per questi soggetti è di 265,82±59,59 mg/dL; inoltre, è da segnalare la presenza di 1 paziente con precedente infarto miocardico, incluso nell'analisi. In questi soggetti HeFH non è presente una correlazione di Lp(a) con i livelli di C-LDL; mentre, analizzando i terzili di Lp(a), i soggetti appartenenti a quello più alto mostrano uno spessore intimale carotideo più elevato (0,66 (0,593-0,698) mm) rispetto a quelli inclusi nel primo terzile (0,51 (0,452-0,615) mm) ($p=0,011$). I livelli di Lp(a) non mostrano invece differenze a seconda del tipo di mutazione e del gene sulla quale è presente.

Conclusioni. I livelli di Lp(a) risultano essere associati, anche se non in maniera significativa, ad un aumentato c-IMT nella popolazione generale, mentre è nei pazienti FH geneticamente determinati, dove diventa evidente e confermata l'importanza di questo marker, soprattutto nei soggetti ad alto rischio cardiovascolare.

LO SCORE PREDIMED, INDICE DI ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA NELLA POPOLAZIONE GENERALE: DATI DELLO STUDIO PLIC

C. Visinoni¹, L. Redaelli¹, A. Baragetti^{1,2}, K. Garlaschelli¹, L. Grigore¹, G.D. Norata^{2,4}, A.L. Catapano^{2,3}

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

Introduzione. L'aderenza alla dieta mediterranea è un fattore protettivo per il rischio di eventi cardiovascolari (CV). Lo scopo dello studio è:

a) descrivere nella popolazione generale le abitudini alimentari e il livello di aderenza alla dieta. Mediterranea (attraverso lo score PREDIMED: Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet) e il loro cambiamento in un follow-up di 11 anni;

b) valutare se lo score e il suo cambiamento si associano con i determinanti del rischio CV e il danno aterosclerotico subclinico.

Materiali. Lo studio include 1398 soggetti (575 uomini e 823 donne, età 57 (49-62) anni) a cui è stato calcolato lo score PREDIMED alla visita basale e dopo un follow-up mediano di 11 anni. Sono state raccolte le informazioni circa la storia clinica e sono stati dosati i principali parametri biochimici; lo spessore medio-intimale carotideo (CCA-IMT) è stato determinato in entrambe le visite. In un sottogruppo di studio di 325 soggetti sono state valutate le assunzioni settimanali di carboidrati, proteine, lipidi (saturi e insaturi) per valutare il grado di correlazione tra lo score PREDIMED e l'assunzione di macronutrienti.

Risultati. L'analisi esplorativa condotta ha dimostrato che i soggetti con alta aderenza alla dieta mediterranea mostrano un aumentato intake calorico, un ridotto intake giornaliero di lipidi saturi, a parità del consumo di proteine. Tra i 1.398 soggetti, lo score era significativamente aumentato negli uomini alla visita basale ($p=0,001$), nei soggetti più anziani, mentre non era differente tra i soggetti in prevenzione primaria rispetto ai soggetti con pregresso evento cardiovascolare ($p=0,176$). Non vi erano differenze statisticamente significative tra lo score e i parametri biochimici, antropometrici e CCA-IMT ($p=0,067$).

Dopo il follow-up, 283 soggetti avevano mantenuto il livello di aderenza alla dieta mediterranea, 609 lo avevano aumentato, 506 lo avevano ridotto. Tali cambiamenti non si associavano a una variazione significativa nei parametri antropometrici, e nemmeno a una maggiore progressione annuale di CCA-IMT ($p=0,616$).

Conclusioni. Lo score PREDIMED si dimostra un utile indice dell'intake giornaliero di macronutrienti, sebbene la sua variazione nel tempo non riflette il cambiamento di parametri clinici e cardio-metabolici utili per la stratificazione del rischio cardiovascolare.

STUDIO DEL MECCANISMO D'AZIONE DELL'EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO DEI FUROSSANI IN CELLULE MUSCOLARI LISCE VASALI

L. Arnaboldi¹, M. Lombardi¹, M. Sinelli¹, B. Rolando², L. Lazzarato², R. Fruttero², A. Gasco², A. Corsini¹

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

L'aterosclerosi è una patologia multifattoriale caratterizzata da ossidazione, alterata produzione di NO e aumentata proliferazione delle cellule muscolari lisce (CML) nella tonaca intima vasale. I furossani, molecole NO donatrici ad azione vasodilatatoria, sono in grado di inibire la proliferazione delle CML in modo concentrazione-dipendente. Abbiamo già dimostrato che la potenza di tale effetto è correlata al potere elettronattrattore del sostituente in posizione 3 dell'anello aromatico. Allo scopo di chiarire il meccanismo di azione alla base dell'effetto antiproliferativo e di comprendere se NO giochi un ruolo diretto, abbiamo effettuato una serie di esperimenti che ci hanno permesso di escludere un contributo di NO mediato dalla via delle poliammine e da quella cGMP-dipendente. Ulteriori studi in cui sono state cosomministrate molecole NO-scavenger (globuli rossi freschi, emoglobina e PTIO) ai furossani hanno dimostrato l'incapacità delle stesse di prevenirne l'effetto antiproliferativo, suggerendo come NO non sia direttamente implicato nell'azione antiproliferativa. Abbiamo adottato perciò diversi approcci di proteomica per valutare quale sia la porzione della molecola furossanica ad effetto antiproliferativo. Mentre non abbiamo ottenuto risposte positive né da gel 1D e 2D accoppiati ad analisi di spettrometria di massa, né dalla tecnica con IodoTMT (atta allo studio ed alla valutazione di proteine S-nitrosilate), abbiamo recentemente sfruttato un protocollo di analisi SILAC, allo scopo di valutare la differente espressione di proteine che regolano la progressione G1/S del ciclo cellulare tra cellule in libera crescita o trattate con furossani. In quest'ultimo caso, dopo accurata selezione tra 700 proteine, è stata evidenziata una variazione significativa dell'espressione di 12 proteine cellulari, tra cui fattori nucleari implicati nei processi di replicazione degli acidi nucleici e di proteine regolate da geni quali BANF1 e SUMO1. Una ridotta espressione di quest'ultimo determina un blocco del ciclo cellulare in fase G1, grazie al blocco della sumoilazione di varie proteine (tra cui alcune chinasi ciclino-dipendenti) e può determinare l'effetto antiproliferativo mediato dai furossani sulle cellule muscolari lisce. Se il ruolo di tali composti nel contesto di tali modifiche dell'espressione proteica venisse confermato, i furossani (da soli o coniugati con altri farmacofori) potrebbero rappresentare un interessante approccio farmacologico nella prevenzione e nel trattamento dell'aterosclerosi.

L'EVOLUZIONE DELLA MALATTIA E LE FRAZIONI LINFOCITARIE T PREDICONO LO SVILUPPO DELL'ATEROSCLEROSI NEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

A Baragetti^{1,2}, GA Ramirez⁴, M Magnoni⁶, K Garlaschelli², L Grigore², M Berteotti⁶, I Scotti⁶, E Bozzolo⁴, A Bertì⁴, AA Manfredi⁴, E Ammirati⁵, AL Catapano^{1,3}, GD Norata^{1,2}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo (MI); ³IRCCS, Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni (MI); ⁴Unit of Medicine and Clinical Immunology, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan; ⁵Niguarda Ca' Granda Hospital, Milan; ⁶Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Vita-Salute San Raffaele Scientific Institute Milan

Introduzione. I pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES) mostrano una elevata mortalità cardiovascolare rispetto alla popolazione generale. In questo studio abbiamo investigato la relazione tra l'attività immuno-infiammatoria della malattia, i fattori di rischio cardiovascolari (CVRFs) e lo sviluppo di aterosclerosi in 5 anni.

Materiali e Metodi. Le informazioni cliniche, la storia farmacologica e le informazioni sui principali CVRFs sono state raccolte alla visita basale e dopo 5 anni in 40 LES (36 donne, 42 ± 9 età media; 14 ± 7 anni dalla diagnosi) e 50 controlli di simile età. Lo score SLEDAI (indice dell'attività della malattia) è stato calcolato ad ogni rivalutazione annuale, le informazioni sui flares e sui trend di malattia sono state raccolte secondo le linee guida. La presenza di aterosclerosi carotidea è stata valutata con ecografia alla visita basale e dopo 5 anni. L'analisi con citofluorimetria a flusso ha permesso la caratterizzazione dettagliata delle popolazioni linfocitarie CD4+.

Risultati. Alla visita basale, i LES mostravano un'aumentata circonferenza vita rispetto ai controlli; inoltre, circa il 32% dei LES hanno sviluppato aterosclerosi subclinica (non predetta dai marcatori anticorpali). I pazienti LES con SLEDAI basale elevato hanno sia ulteriormente mostrato un aumento annuale dell'indice di attività sia hanno sviluppato maggiormente aterosclerosi carotidea rispetto ai pazienti meno attivi. L'analisi al FACS ha confermato una riduzione della conta linfocitaria totale e di tutti i T helper (CD4+) nei LES rispetto ai controlli ($26832,24 \pm 1815,80$ vs $40136,24 \pm 1111,60$ and $8648,60 \pm 692,61$ vs $12631,18 \pm 383,68$, rispettivamente, $p < 0,001$); inoltre, nei pazienti LES che avevano sviluppato aterosclerosi carotidea è stata osservata una maggiore espansione delle cellule effettrici della memoria immunitaria (CD4+/RO+/RA-/CCR7-/HLADR+) ($750,38 \pm 189,33$ vs $457,81 \pm 69,33$ conta cellulare, $p = 0,006$).

Conclusioni. I pazienti con LES presentano un più rapido sviluppo dell'aterosclerosi carotidea, la quale è associata maggiormente all'attività di malattia e all'attivazione della risposta immunitaria adattativa piuttosto che ai CVRFs; questi dati supportano il ruolo fondamentale della risposta immuno-infiammatoria nell'evoluzione del processo aterosclerotico nei pazienti con malattie autoimmuni.