

SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELL'ATEROSCLEROSI (SISA)

XVI Congresso della Sezione Emilia Romagna

Parma, 24 settembre 2016

Il Congresso si è svolto il 24 settembre 2016 a Parma. I temi trattati sono stati la terapia dell'ipercolesterolemia con gli inibitori del PCSK9, evidenziando le caratteristiche dei soggetti cui questi farmaci sono indicati. Inoltre si è affrontato il problema del possibile ruolo di questi nuovi farmaci nel metabolismo lipidico cerebrale. Si è dato ampio spazio ai giovani ricercatori che hanno presentato relazioni sulla stiffness arteriosa e aterosclerosi, sui nuovi approcci dietologici, sui dati di correlazione tra mortalità cardiovascolare e Lp(a) nella popolazione di Brisighella e sulle basi genetico-molecolari della Abetalipoproteinemia. Si è inoltre parlato della rete nazionale per l'identificazione dei pazienti affetti da Ipercolesterolemia Familiare. Le comunicazioni selezionate hanno trattato temi di ricerca di base: PCSK9 ed espressione della proteina ABCA1; il ruolo della trimetil ammina-n-ossido nella formazione delle foam cells; i rapporti tra sfingosina 1 fosfato e aterosclerosi; la diagnosi molecolare delle ipertrigliceridemie. Temi di ricerca applicata: differenze nel profilo lipidico in diversi gruppi etnici: studio HLIUS e i livelli di vitamina D e funzionalità delle HDL. Inoltre si è parlato dell'Iperlipidemia Familiare Combinata e della terapia delle Ipercolesterolemie Familiari Omozigoti con Lomitapide.

COMUNICAZIONI ORALI

PCSK9 INIBISCE L'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA ABCA1 E L'EFFLUSSO DI COLESTEROLO NEL MACROFAGO

M.P. Adorni¹, I.A. Zanotti¹, E. Cipollari¹, E. Favari¹, F. Zimetti¹, A. Corsini², C. Ricci², F. Bernini¹, N. Ferri³

¹Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma;

²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,

Università degli Studi di Milano; ³Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova

Obiettivo. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) è una proteina di 692 aminoacidi appartenente alla famiglia delle proproteine convertasi. PCSK9 è maggiormente espressa nel fegato, nell'intestino tenue, nel rene e nel sistema nervoso centrale. La principale funzione di PCSK9 è quella di regolare i livelli circolanti di LDL-C andando ad indurre nel fegato la degradazione del recettore per le LDL (LDLR). Tuttavia, l'attività di PCSK9 non è ristretta alla degradazione di LDLR ma contribuisce anche alla regolazione di altre funzioni cellulari a livello di tessuti extraepatici come il macrofago del lume vascolare. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare un possibile ruolo di PCSK9 esogena nella modulazione dell'omeostasi del colesterolo a livello macrofagico ponendo particolare attenzione al processo di efflusso di colesterolo mediato dalla proteina ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), uno tra i meccanismi ateroprotettivi maggiormente descritti.

Materiali e Metodi. L'efflusso del colesterolo è stato valutato in macrofagi peritoneali murini ottenuti da topi wild type (WT) e knock-out per il gene di LDLR (LDLR^{-/-}). Le cellule sono state esposte a PCSK9 ricombinante in presenza e in assenza

degli agonisti LXR/RXR, 22-OH-colesterolo e acido 9-cis retinoico, per stimolare l'espressione di ABCA1. L'efflusso è stato misurato attraverso una tecnica radioisotopica. L'espressione proteica e genica sono state valutate rispettivamente tramite western blotting e real time PCR.

Risultati. PCSK9 inibisce del 55% (p<0,05) l'efflusso cellulare del colesterolo ABCA1-mediato indotto dagli agonisti LXR/RXR nei macrofagi WT ma non nei macrofagi LDLR^{-/-}. Parallelamente PCSK9 inibisce l'espressione della proteina ABCA1 solo nei macrofagi WT. L'espressione genica di Abca1, in seguito a stimolo con gli agonisti LXR/RXR, viene inibita da PCSK9 ricombinante del 64% (p<0,001) nei macrofagi WT e, in misura minore, nei macrofagi deficitari di LDLR (-35%, p<0,001). PCSK9 ha un effetto nullo o marginale sull'espressione genica rispettivamente di Abcg1 ed Sr-bi, altri trasportatori coinvolti nel processo di efflusso di colesterolo.

Conclusioni. PCSK9 ha un ruolo diretto sul processo di efflusso di colesterolo ABCA1-mediato nel macrofago attraverso l'inibizione dell'espressione genica del trasportatore ABCA1. Questo effetto potrebbe essere rilevante in alcune fasi della patogenesi della malattia aterosclerotica come la formazione delle foam cells a livello della parete arteriosa.

LA TRIMETIL AMMINA-N-OSSIDO PROMUOVE LA FORMAZIONE DI FOAM CELLS IN VITRO

L. Mele¹, A.A. Adamo², R. De Francesco², G. Aragonès³, D. Del Rio¹, F. Bernini², I.A. Zanotti²

¹Dipartimento di Scienze della Nutrizione, Università degli Studi di Parma;

²Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma;

³Department of Biochemistry and Biotechnology, University Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Obiettivo. In seguito all'ingestione di alimenti quali la carne rossa, il pollame, le uova, la L-carnitina e la colina in essi contenuta vengono trasformate in trimetilammina, ad opera del microbiota intestinale e in Trimetil Ammina-N-Ossido (TMAO), in seguito a metabolismo epatico. Recenti studi metabolomici hanno evidenziato come i livelli plasmatici di questa molecola si associno all'insorgenza di eventi cardiovascolari, suggerendo quindi la misura di TMAO come un nuovo potenziale biomarker di rischio cardiovascolare. Tuttavia, gli studi che descrivono l'attività proaterosclerotica di TMAO sono ancora latenti. Lo scopo di questo lavoro è stato valutare la capacità di TMAO di interferire con il metabolismo lipidico nei macrofagi, tra le principali cellule costituenti la placca aterosclerotica.

Materiali/Pazienti e Metodi. Colture di macrofagi peritoneali murini (MPM) prelevati da topi C57BL/6 sono state esposte per 24 ore a TMAO 100 μ M. La formazione di foam cells è stata valutata incubando le cellule con lipoproteine acetilate (AcLDL) 25 μ g/ml e quantificando il contenuto intracellulare di colesterolo tramite metodica fluorimetrica. L'effetto di TMAO di alterare l'efflusso di colesterolo è invece stata indagata con tecnica radioisotopica, in seguito a marcatura delle cellule con 3 H-colesterolo 2 μ Ci/ml ed esposizione ad HDL 12,5 μ g/ml. L'effetto di TMAO sull'espressione del recettore scavenger CD36 è stato indagato attraverso tecnica di western blot.

Risultati. La preincubazione di MPM con TMAO per 24 ore ha prodotto un significativo aumento del contenuto intracellulare di colesterolo, rispetto alle cellule trattate con solo AcLDL: 30,85 \pm 6,77 vs 16,20 \pm 0,86 (μ g colesterolo/mg proteina, media \pm deviazione standard; p<0.05). Al contrario, sia l'incubazione simultanea di TMAO con AcLDL, sia l'aggiunta di TMAO successivamente all'arricchimento di colesterolo dei MPM con AcLDL, non hanno determinato alterazioni del contenuto intracellulare di colesterolo. Analisi di western blot hanno rivelato come il pretrattamento delle cellule con TMAO induca un significativo aumento dell'espressione del recettore scavenger CD36. La capacità di TMAO di promuovere la formazione di foam cells non è invece associata alla riduzione del processo di efflusso di colesterolo, come dimostrato dalla quantificazione di 3 H-colesterolo rilasciato nel medium cellulare di MPM esposti o meno a TMAO: 3,5 \pm 0,7, 3,8 \pm 0,6 (% di 3 H-colesterolo rilasciato nel medium rispetto al totale, media \pm deviazione standard).

Conclusioni. TMAO esplica un'azione proaterosclerotica in vitro aumentando la formazione di foam cells, in seguito all'aumento dell'espressione del recettore scavenger CD36. Ulteriori indagini, che si estenderanno ad altre proteine deputate alla captazione di colesterolo nei macrofagi e coinvolgeranno analisi di espressione genica e di miRNA, permetteranno di descrivere in maniera più dettagliata il meccanismo d'azione di TMAO a livello molecolare.

SFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P) ED ATEROSCLEROSI: NUOVE EVIDENZE DA MODELLI ANIMALI TRANSGENICI

F. Poti^{1,3}, T. Mancini¹, L.B. Giva^{2,3}, M. Simoni^{2,3}, J.-R. Nofer⁴

¹Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Farmacologia, Università degli Studi di Parma;

²Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Unità di Endocrinologia,

Università di Modena e Reggio Emilia, Modena;

³Azienda USL di Modena;

⁴Centro per la Medicina di Laboratorio,

Osedale Universitario di Münster, Münster (Germany)

Obiettivo. Evidenze recenti suggeriscono che gli effetti ateroprotettivi delle HDL possano essere in parte attribuiti alla sfingosina 1-fosfato (S1P), un lisosfingolipide capace di legare ed attivare specifici recettori accoppiati a proteine G (GPCR). Dei cinque sottotipi recettoriali finora identificati, le isoforme S1PR1 e S1PR3 sembrano essere le più rilevanti a livello cardiovascolare. Pertanto, il nostro lavoro mira a chiarire l'impatto di S1P endogena sull'aterosclerosi in vivo, utilizzando peculiari modelli murini transgenici capaci di sovraesprimere in modo tessuto specifico le isoforme recettoriali S1PR1 e S1PR3.

Materiali/Pazienti e Metodi. La sovraespressione dei recettori S1PR1 e S1PR3 in cellule rilevanti per l'aterosclerosi, come macrofagi ed endotelio, è stata ottenuta generando topi transgenici che sfruttano la tecnologia Cre-LoxP. Gli animali, in background genetico suscettibile all'aterosclerosi (ApoE^{-/-} o chimere LDLR^{-/-}), sono stati sottoposti a dieta iperlipidica per 16-24 settimane e poi sacrificati. L'analisi dell'aterosclerosi è stata condotta su criosezioni di cuore a livello delle radici aortiche e su arteria brachiocefalica dopo colorazione con Oil-Red-O/ematosilina ed espressa come area totale delle lesioni o come rapporto tra l'area della placca e l'area totale del vaso (media \pm SD).

Risultati. Gli animali che sovraesprimono S1PR1 nei macrofagi presentano una riduzione massiva delle lesioni aterosclerotiche rispetto ai controlli, sia a livello delle radici aortiche (719749,75 \pm 76145,30 vs 378623,85 \pm 98072,97) sia a livello dell'arteria brachiocefalica (47383,53 \pm 20251,24 vs 11288,12 \pm 11085,16). Analogamente, nell'endotelio, la sovraespressione di S1PR1 (0,35 \pm 0,28 vs 1,38 \pm 0,53) o di S1PR3 (0,30 \pm 0,13 vs 1,38 \pm 0,53) induce una riduzione significativa delle lesioni rispetto ai controlli.

Conclusioni. Il nostro studio dimostra, per la prima volta, che l'amplificazione del signalling mediato da S1P endogena è un fattore protettivo nei confronti dell'aterogenesi e tali azioni possono essere attribuite, almeno in parte, ad entrambi i recettori S1PR1 e S1PR3.

DIAGNOSI MOLECOLARE DELLE IPERTRIGLICERIDEMIE PRIMITIVE ATTRAVERSO LA PROCEDURA “NGS” (NEXT GENERATION SEQUENCING): RISULTATI E QUESTIONI APERTE

C. Rabacchi¹, E. Tenedini¹, I. Bernardis¹, M.L. Simone², E. Tagliafico¹, P. Tarugi²

¹Centro Interdipartimentale di Ricerche Genomiche, Università di Modena e Reggio Emilia; ²Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

Obiettivo. Caratterizzazione molecolare di pazienti con ipertrigliceridemia primitiva severa (Trigliceridemia >10 mmol/L) con accumulo di chilomicroni (chilomicronemia familiare). Questo disordine può essere dovuto a mutazioni di geni coinvolti nella cascata lipolitica, il processo di idrolisi dei trigliceridi trasportati da chilomicroni e VLDL.

Materiali/Pazienti e Metodi. È stata utilizzata la tecnologia “Next Generation Sequencing” (NGS, tecnologia “Ion Torrent”) che prevedeva l’analisi in parallelo di un pannello di 19 geni coinvolti nel metabolismo delle lipoproteine contenenti trigliceridi [geni: *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LMF1*, *APOE*, *LIPC*, *LIPG*, *APOC3*, *GPD1*, *ANGPTL3*, *ANGPTL4*, *ANGPTL8*, *CREB3L3*, *GALNT2*, *MLXIPL*, *TRIB1*, *GCKR*, *APOB* (esoni 26 e 29)]. Sono stati investigati 12 pazienti con ipertrigliceridemia primitiva identificati in strutture Ospedaliere italiane o straniere. Le varianti genomiche riscontrate con NGS sono state confermate con il metodo di sequenziamento Sanger.

Risultati. L’analisi ha portato all’identificazione di tre condizioni definite come assetto genotipico:

1. “atteso” caratterizzato da mutazioni o varianti funzionali dei geni candidati maggiori;
2. “inatteso” caratterizzato da mutazioni o varianti funzionali di geni minori;
3. “complesso” caratterizzato dalla presenza di multiple varianti genomiche rare in vari geni.

Sei pazienti con assetto genotipico “atteso” sono risultati portatori di mutazioni patogenetiche o varianti funzionali nei geni candidati “maggiori” coinvolti nella cascata lipolitica: *LPL*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *LIPC*. Questo gruppo comprendeva:

1. un omozigote per una mutazione non senso p.Cys89* di *GPIHBP1*;
2. un etero-composto per mutazioni (p.Arg214Ile/p.Arg282*) di *LPL* ed eterozigote semplice per la mutazione p.Gly248Val di *LIPC*;
3. un doppio eterozigote per una mutazione di *LPL* (p.Trp113Arg) ed una variante funzionale (p.Gly185Cys) di *APOA5*;
4. un doppio eterozigote per due varianti funzionali di *LPL* (p.Asn318Ser) e di *APOA5* (p.Ser19Trp);
5. due eterozigoti semplici per varianti funzionali di *LPL* (p.Asn318Ser) e di *GPIHBP1* (p.Cys14Phe).

Un paziente risultava avere un assetto genotipico “inatteso” essendo eterozigote semplice per una nuova variante missenso (p.Ala4148Glu) del gene *APOB* non coinvolto direttamente nella cascata lipolitica.

Un paziente risultava avere un assetto genotipico “complesso” essendo eterozigote per 4 varianti:

1. un polimorfismo funzionale di *LPL* (p.Asn318Ser);
2. una nuova mutazione di *LIPC* (p.Gly247AlaFs*12);
3. una nuova mutazione di *APOB* (p.Gln4368Argfs*26);
4. una nuova mutazione di *ANGPTL8* (p.Arg83Trp).

Quattro pazienti risultavano avere un assetto genotipico negativo per varianti nei geni esaminati.

Conclusioni. La procedura NGS consente di analizzare in parallelo un gruppo di geni ritenuti coinvolti nel metabolismo dei trigliceridi e quindi rivelare, in tempi brevi, le basi molecolari delle ipertrigliceridemie, che possono coinvolgere più geni, alcuni dei quali in precedenza trascurati perché considerati “minori”. Nel contempo, questa tecnologia porta all’identificazione di varianti genomiche rare in geni multipli il cui impatto funzionale e ruolo patogenetico nell’indurre ipertrigliceridemia rimane al momento indefinito.

DIFFERENZE NEL PROFILO LIPIDICO IN DIVERSI GRUPPI ETNICI: LO STUDIO HELIUS

K. Gazzola^{1,2}, B.-J.H. van den Born², G. K. Hovingh², G.B. Vigna¹, G. Zuliani¹, E.S.G. Stroes², M.B. Snijder³, R.J.G. Peters⁴

¹Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara, Ferrara;

²Dipartimento di Medicina Vascolare, Centro Medico Accademico, Amsterdam, Paesi Bassi;

³Dipartimento di Sanità Pubblica, Centro Medico Accademico, Amsterdam, Paesi Bassi;

⁴Dipartimento di Cardiologia, Centro Medico Accademico, Amsterdam, Paesi Bassi

Obiettivo. Alcuni studi hanno ipotizzato che il profilo lipidico possa differire in base al gruppo etnico di appartenenza. Tuttavia, molti dati presenti in letteratura derivano dal paragone tra studi differenti ed esistono solo limitate informazioni disponibili circa le principali etnie presenti in Europa. Oltretutto, non appare del tutto chiarito il contributo che rivestono fattori come obesità, diabete e abitudine tabagica, i quali potrebbero agire in parte da elementi confondenti. In questo nostro lavoro abbiamo analizzato le differenze nel profilo lipidico presenti in una numerosa popolazione multi-etnica di Amsterdam, Paesi Bassi.

Pazienti e Metodi. 21.617 soggetti appartenenti a sei differenti etnie (3.043 Sud-asiatici del Suriname, 4.151 Africani del Suriname, 2.339 Ghanesi, 3.906 Marocchini, 3.614 Turchi e 4.564 Caucasici olandesi) sono stati arruolati nello studio HELIUS. I dati clinici sono stati raccolti tramite questionario ed esame obiettivo. I valori sierici di colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo HDL, glicemia e HbA1c sono stati misurati dopo almeno 8 ore di digiuno. I valori di colesterolo LDL sono stati calcolati usando la formula di Friedewald. Le differenze nei parametri lipidici sono state valutate prima e dopo aggiustamento per multipli fattori confondenti.

Risultati. I valori di trigliceridi, colesterolo totale, HDL ed LDL sono risultati significativamente differenti nei vari gruppi etnici. In particolare, rispetto al gruppo di riferimento rappresentato dai soggetti Caucasici olandesi, quelli Sud-asiatici del Suriname e i Turchi hanno mostrato un profilo lipidico caratterizzato da valori di colesterolo HDL inferiori (-9,7±0,4 mg/dl, -10,8±0,4 mg/dl, p<0,001) e valori di trigliceridi più elevati (+30,1±7,1 mg/dl, +15,1±7,1 mg/dl, p<0,001), mentre i Ghanesi e gli Africani del Suriname hanno mostrato rispettivamente valori di trigliceridi inferiori (-17,7±8,1 mg/dl, -8,9±7,1 mg/dl, p<0,001) e variazioni di colesterolo HDL significative ma di modesta entità (+1,2±0,4 mg/dl, -2,3±0,4 mg/dl, p<0,001). Tali differenze sono rimaste statisticamente significative dopo

correzione per i fattori confondenti, in particolare per quanto riguarda trigliceridi e colesterolo HDL.

Conclusioni. Il profilo lipidico differisce significativamente nei vari gruppi etnici analizzati. I soggetti Ghanesi e Africani del Suriname hanno mostrato un profilo lipidico più favorevole rispetto agli individui appartenenti ad altri gruppi etnici come Sud-asiatici del Suriname e Turchi. Dopo correzione per diversi fattori confondenti le differenze, in particolare per quanto riguarda trigliceridi e colesterolo HDL, sono rimaste statisticamente significative. L'impatto di queste differenze in termini di rischio cardiovascolare potrà essere valutato solo attraverso studi prospettici.

LIVELLI DI VITAMINA D E FUNZIONALITÀ DELLE HDL IN DONNE IN PRE-MENOPAUSA

C. Marchi¹, D. Greco¹, D. Kocyigit², M.P. Adorni¹, N. Ronda¹, K.M. Gurses³, S.H. Oguz⁴, A. Gurlek⁴, L. Tokgözoğlu¹², F. Zimetti¹

¹Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma;

²Department of Cardiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ³Department of Cardiology, Konya Training and Research Hospital, Konya, Turkey; ⁴Department of Internal Medicine, Section of Endocrinology and Metabolism, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

Obiettivo. Bassi livelli di vitamina D (vitD) sono stati associati ad un aumentato rischio cardiovascolare (CV). La capacità di efflusso del colesterolo (CEC) delle HDL sieriche è una misura della loro funzionalità ed è stata inversamente correlata alla prevalenza ed incidenza di eventi cardiovascolari. In questo lavoro si è valutato l'impatto di una carenza di vitD e di una sua integrazione sulla funzionalità delle HDL.

Materiali e Metodi. Per lo studio sono state reclutate donne sane in pre-menopausa (n=43) con diversi livelli plasmatici di vitD. Le HDL sono state isolate dal siero mediante precipitazione con polietilenglicole. La CEC delle HDL è stata valutata mediante una tecnica radioisotopica utilizzando modelli cellulari

specifici che permettono di distinguere i diversi meccanismi di efflusso (la diffusione acquosa e i processi mediati dai trasportatori SR-BI, ABCA1 e ABCG1). La vasodilatazione flusso-mediata (FMD) e la velocità dell'onda di polso (pulse wave velocity, PWV), marcatori di aterosclerosi subclinica, sono stati misurati con tecniche standard.

Risultati. Le donne incluse nello studio sono state suddivise in due gruppi in base ai livelli di vitD: ≤ 10 ng/mL (gruppo very low, VL), condizione definita come severa ipovitaminosi e >10 ng/mL (gruppo low-normal, LN). Non sono state riscontrate differenze tra i due gruppi per quanto riguarda i livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL e trigliceridi. L'FMD è risultata significativamente più bassa nel gruppo VL rispetto al gruppo LN ($9,90\pm 0,26$ rispetto a $10,81\pm 0,31$; $p=0,03$); la PWV è risultata più alta nel gruppo VL ($6,094$ m/s $\pm 0,26$ rispetto a $5,25$ m/s $\pm 0,09$; $p=0,01$). La CEC delle HDL tramite la diffusione acquosa e SR-BI è risultata simile tra i due gruppi. La CEC ABCA1-mediata è aumentata nel gruppo VL rispetto al gruppo LN (rispettivamente $3,079\pm 0,31$ e $2,042\pm 0,19$; $p=0,005$). La CEC ABCG1-mediata è risultata significativamente più bassa nel gruppo VL rispetto al gruppo LN (rispettivamente $2,48\pm 0,18$ e $3,30\pm 0,22$; $p=0,01$). Dopo integrazione con vitD, la CEC ABCG1 mediata nei pazienti VL torna a valori simili a quelli del gruppo LN prima dell'integrazione ($4,09\pm 0,12$ rispetto a $4,08\pm 0,25$; $p=0,97$), mentre nel gruppo LN non varia significativamente rispetto al baseline ($4,31\pm 0,35$ rispetto a $3,62\pm 0,12$; $p=0,06$).

Conclusioni. I livelli di vitD influenzano la funzione anti-aterogena delle HDL di promuovere la CEC; in particolare, nella popolazione analizzata, abbiamo osservato una riduzione della CEC ABCG1-mediata e al contrario, un aumento della CEC ABCA1-mediata. Tale andamento potrebbe essere spiegato con difetto nella maturazione delle HDL associato alla carenza di vitD, con conseguente riduzione delle particelle mature, accettori specifici per ABCG1, ed accumulo di HDL nascenti, che interagiscono preferenzialmente con ABCA1. L'integrazione con vitD sembrerebbe correggere tale alterazione. Le descritte variazioni della funzionalità delle HDL potrebbero spiegare, almeno in parte, l'associazione tra deficit di vitD e l'aumentato rischio cardiovascolare osservato in questa popolazione.