

SOCIETA ITALIANA PER LO STUDIO DELL'ARTERIOSCLEROSI (SISA)

XVII Congresso della Sezione Emilia Romagna

Ferrara 30 settembre 2017

Il Congresso della sezione regionale Emilia Romagna della SISA, si è svolto a Ferrara il 30/09/2017. Ha avuto una ampia partecipazione di Medici sia specialisti che di Medicina Generale.

I Temi affrontati hanno riguardato l'inquadramento diagnostico e terapeutico del rischio cardiovascolare lipidico, affrontando il problema delle diagnosi forme familiari di dislipidemia e della terapia con una disamina dello stato dell'arte attuale e delle nuove prospettive terapeutiche. Fino ad arrivare ad affrontare la tematica della terapia personalizzata.

Inoltre si è affrontato il tema dei fattori di rischio non lipidici, con particolare riguardo al diabete, ipertensione e iperuricemia. Accanto a tematiche riguardanti l'ossidazione e le malattie cardio e cerebro vascolari.

Si è dato ampio spazio ai giovani con presentazioni su vari temi: Compromissione del trasporto di colesterolo nella malattia di Alzheimer; Effetto del trattamento combinato Lipoaferesi e Alirocumab nella iperlipoproteinemia(a); Valutazione della funzionalità delle HDL sieriche; Ruolo della Sfingosina 1-fosfato e del suo recettore nel trasporto inverso del colesterolo; Studio funzionale di due varianti introniche del gene ApoB; Differenza nell'espressione genetica del tessuto adiposo sottocutaneo in corso di riposo forzato. Le relazioni dei giovani sono state precedute da due letture introduttive una sulla Sitosterolemia e una su Colesterolo e demenza.

Il Congresso si è concluso con una sessione dedicata alla HDL sia come target terapeutico che come inquadramento di nuove evidenze antiaterogene.

COMUNICAZIONI ORALI

RUOLO DELLA SFINGOSINA 1-FOSFATO E DEL SUO RECETTORE S1P3 NEL TRASPORTO INVERSO DEL COLESTEROLO

S. Battista¹, I. Zanotti¹, D. Greco¹, L.B. Giva², M.P. Adorni¹, G.D. Norata³, M. Simoni², F. Bernini¹, J. Roch Nofer⁴, F. Poti^{5,6}
¹Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco Università degli Studi di Parma; ²Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; ³Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia; ⁴Centro per la Medicina di Laboratorio, Ospedale Universitario di Münster, Münster, Germania; ⁵Dipartimento di Neuroscienze, Unità di Farmacologia, Università degli Studi di Parma; ⁶Azienda USL di Modena

La sfingosina-1-fosfato (S1P) svolge un ruolo cruciale nella malattia aterosclerotica, nonostante siano ancora parzialmente sconosciuti i meccanismi molecolari sottostanti la sua potenziale funzione anti-aterosclerotica. Scopo dello studio è stato quello di dimostrare se l'azione anti-aterosclerotica di S1P fosse dovuta, almeno in parte, alla modulazione del metabolismo lipidico nel macrofago. A tal fine, abbiamo valutato il ruolo del recettore S1P3 nel processo ateroprotettivo di trasporto inverso di colesterolo (RCT), utilizzando topi caratterizzati dalla sovraespressione di tale recettore esclusivamente nei macrofagi (topi S1P3-Lyz).

L'RCT *in vivo* è stato quantificato iniettando intraperitonealmente in due gruppi di topi C57BL/6 (WT), macrofagi peritoneali murini (MPM) arricchiti di colesterolo radiomarcato, provenienti rispettivamente da topi S1P3-Lyz (gruppo S1P3, n=7) e C57BL/6 (gruppo controllo, n=7). Successivamente, è stato valutato l'efflusso di colesterolo negli MPM sovraespressanti S1P3 (S1P3-MPM) e C57BL/6 (WT-MPM), esponendo le cellule ad HDL o plasma.

L'RCT *in vivo* è incrementato nel gruppo S1P3, come dimostrato dalla maggior quantità di colesterolo radioattivo rilevato nel plasma (0.99 ± 0.32 vs. 0.60 ± 0.12 ; $p<0.05$), nel fegato (2.66 ± 0.41 vs. 1.99 ± 0.35 ; $p<0.01$) e nelle feci (0.99 ± 0.19 vs. 0.66 ± 0.10 ; $p<0.01$) rispetto al gruppo controllo. Coerentemente con questi risultati, gli S1P3-MPM hanno mostrato un aumentato efflusso di colesterolo rispetto ai WT-MPM, quando esposti a plasma (3.18 ± 0.32 vs. 2.05 ± 0.53 ; $p<0.05$). Allo stesso modo, dopo incubazione degli MPM con LDL acetilate, l'efflusso di colesterolo è maggiore negli S1P3-MPM rispetto ai WT-MPM sia ad HDL (8.47 ± 0.63 vs. 5.93 ± 0.46 ; $p<0.001$) sia a plasma (8.04 ± 0.43 vs. 10.49 ± 1.2 and 22.99 ± 1.2 vs. 37.09 ± 5.43 , a 0.1% and 2% rispettivamente). Inoltre, gli S1P3-MPM presentano una maggiore espressione proteica del trasportatore ABCG1 rispetto ai WT-MPM.

Complessivamente, questi risultati mostrano per la prima volta, come l'attività anti-aterosclerotica di S1P sia dovuta, almeno in parte, alla modulazione del metabolismo lipidico attraverso l'interazione con il recettore macrofagico S1P3.

STUDIO FUNZIONALE *IN VITRO* DI DUE VARIANTI INTRONICHE DEL GENE APOB IN DUE CASI DI IPOBETALIPO-PROTEINEMIA FAMILIARE

E. Di Leo, M.L. Simone, S. D'Addato*, P. Tarugi
 Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia; *Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

Introduzione. Lipobetalipoproteinemia familiare (FHBL) è un disordine monogenico dominante caratterizzato da ridotti livelli plasmatici di colesterolo totale (CT), colesterolo LDL (C-LDL) e apolipoproteina B (apoB). Il principale gene candidato nell'FHBL è il gene *APOB*. Le mutazioni del gene *APOB* che causano FHBL sono per lo più localizzate nelle regioni codificanti del gene e comprendono mutazioni non-senso e frameshift che determinano la formazione di codoni di stop prematuri e quindi la sintesi di apoB troncate di dimensioni variabili. Varianti del gene *APOB* localizzate nelle regioni introniche sono rare (circa 5-10%) e possono interessare i siti donatore ed accettore di splicing oppure regioni introniche più profonde.

Scopo. Studiare *in vitro* l'effetto funzionale di due varianti introniche del gene *APOB*.

Materiali e Metodi. Mediante sequenziamento NGS di 15 geni potenzialmente candidati di FHBL, abbiamo caratterizzato due probandi (HBL-209 e HBL-251) con diagnosi clinica di FHBL identificando una delezione in trama e due varianti introniche del gene *APOB*. Per definire l'effetto biologico delle due varianti introniche sullo splicing del pre-mRNA dell'*APOB* è stata utilizzata una strategia *in vitro* basata sull'espressione in cellule COS-1 di due minigeni, rappresentati ognuno dalle corrispondenti regioni del gene *APOB* contenenti la mutazione.

Risultati. Il probando HBL-209 è risultato eterozigote-composto per due varianti note del gene *APOB*: una nell'esone 26 (c.6767_6769 delTGA, delAsp2186) e l'altra nell'introne 8 (c.1033-15C>G). La probanda HBL-251 è risultata eterozigote per una nuova variante intronica (c.3970+1G>A) che interessa il sito donatore di splicing dell'introne 24 del gene *APOB*. Nelle cellule COS1, l'espressione del minigene contenente la variante c.1033-15C>G determinava la formazione di un mRNA normale, indicando che questa variante non aveva alcun effetto sul processo di splicing. Lo screening della variante c.1033-15C>G nei genitori del probando ha dimostrato che la madre, riferita avere un profilo lipidico normale, è portatrice eterozigote della stessa. È dunque verosimile ritenere che tale variante non abbia alcun effetto sul profilo lipidico come suggerito dallo studio *in vitro*. Il padre, con fenotipo lipidico compatibile con FHBL, è risultato eterozigote per la variante c.6767_6769 delTGA che dunque co-segrega con il fenotipo e può ritenersi patogenetica.

L'espressione del minigene contenente la variante c.3970+1G>A determinava uno splicing alternativo per l'attivazione di un sito donatore di splicing criptico localizzato nell'introne 24. Il processo di splicing alternativo determinava la formazione di un mRNA anomalo che includeva l'estremità 5' dell'introne 24. La giunzione dell'esone 24 con i primi 40 nucleotidi dell'estremità 5' dell'introne 24 causava uno slittamento della cornice di lettura con la formazione di un codone di stop prematuro a livello della giunzione esone-introne. Il prodotto di traduzione di questo mRNA anomalo è una proteina apoB tronca di 1254 amminoacidi, denominata apoB-27.64 in quanto di dimensioni corrispondenti al 27.64% di quelle dell'apoB-100 matura. Questa forma tronca ha una ridotta capacità di legare i lipidi per cui non è secreta come componente delle VLDL e dei chilomicroni. Lo screening della mutazione c.3970+1G>A nei figli della probanda ha dimostrato che entrambi, con un fenotipo FHBL, sono portatori eterozigoti della mutazione, che dunque co-segrega con il fenotipo ipobeta ed è causa di FHBL.

Conclusioni. Questi risultati hanno dimostrato che solo una delle due mutazioni di splicing del gene *APOB* identificate in soggetti con FHBL eterozigote è da ritenersi patogenetica.

COMPROMISSIONE DEL TRASPORTO DI COLESTEROLO NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER

C. Marchi¹, P. Caffarra², M.P. Adorni¹, N. Ronda¹, F. Bernini¹, F. Barocco², M. Spallazzi², D. Galimberti³, F. Zimetti¹
¹Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università degli Studi di Parma; ²Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Unità di Neuroscienze, Università degli Studi di Parma; ³Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Unità di Neurologia, Università degli Studi di Milano, Fondazione Ca' Granda, IRCCS Ospedale Policlinico, Milano

Obiettivo. La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da un progressivo deficit cognitivo. Numerose evidenze indicano che tale malattia è associata ad alterazioni dell'omeostasi di colesterolo nel Sistema nervoso centrale (SNC). Infatti, numerosi studi genetici hanno identificato diversi loci coinvolti nel metabolismo del colesterolo tra i geni sensibili all'AD, come esemplificato dal gene $\epsilon 4$. Il trasporto di colesterolo nel SNC viene mediato da particelle presenti nel fluido cerebrospinale (CSF), contenenti principalmente l'apolipoproteina E (apoE) e per dimensioni e composizione molto simili alle HDL plasmatiche. Queste particelle simil-HDL interagiscono con i trasportatori di colesterolo presenti sulle membrane, come ABCA1 e ABCG1, per promuovere l'efflusso del colesterolo dagli astrociti e trasportarlo ai neuroni. I neuroni adulti perdono infatti la loro capacità di sintetizzare il colesterolo e dipendono pertanto dal quello derivante dagli astrociti per mantenere la plasticità neuronale, la sinaptogenesi e la rigenerazione dopo una lesione.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare se la capacità delle particelle simil-HDL presenti nel CSF di promuovere l'efflusso del colesterolo fosse compromessa nella malattia di AD o in altre forme di demenza (DEM non-AD).

Materiali e Metodi. Il CSF dei pazienti AD (n=38), DEM non-AD (n=16) e dei soggetti controllo (CTRL; n=38), di sesso ed età paragonabili, sono stati ottenuti mediante rachicentesi. I livelli di apoE e dell'isoforma apoE4 nel CSF sono stati misurati tramite kit ELISA. La capacità delle particelle simil-HDL di promuovere l'efflusso del colesterolo (CEC) è stata valutata tramite una tecnica radioisotopica standardizzata.

Risultati. I livelli di apoE totale nel CSF non mostrano differenze significative tra i tre gruppi; invece, i livelli dell'isoforma apoE4 risultano più elevati nel CSF dei pazienti AD rispetto ai CTRL e alle DEM non-AD (ANOVA, $p=0.0068$). La CEC del CSF tramite diffusione acquosa (AD) non differisce tra i tre gruppi eccetto per una modesta ma significativa diminuzione nelle DEM non-AD rispetto ai CTRL (-45%; $p=0,002$). La CEC attraverso ABCA1 e ABCG1 risulta ridotta nei pazienti AD rispetto ai CTRL (-56,8%, $p=0,0131$ e -36,22%; $p=0,009$ per ABCA1 e ABCG1 rispettivamente) mentre non si sono riscontrate differenze significative tra i CTRL e le DEM non-AD.

Conclusioni. Questi risultati indicano una compromissione nella capacità delle particelle simil-HDL di promuovere il trasporto di colesterolo, che avviene in modo specifico nell'AD mentre non si verifica nelle altre forme di demenza. Tale alterazione sembra essere indipendente dalle concentrazioni di tali particelle, come indicato dal fatto che non si riscontrano differenze nelle concentrazioni di apoE. Tale andamento suggerisce un difetto specifico di funzionalità e supporta i dati a favore di un'alterazione del metabolismo del colesterolo nel SNC, che può svolgere un ruolo importante nella patogenesi dell'AD.

RISCHIO CARDIOVASCOLARE NEL PAZIENTE ANZIANO E GRANDE ANZIANO E DETERMINANTI DELL'USO DI STATINE

M. Bertolotti, A. Giusto, G. Lancellotti, C. Mussi
 UO di Geriatria, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia e Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena

Obiettivo. L'invecchiamento della popolazione si associa a importanti ricadute sociali e sanitarie. Ciò richiede una particolare attenzione nel definire il rischio di malattia cardiovascolare (CV), principale causa di morte e disabilità nell'anziano, e nella gestione appropriata dei fattori di rischio, fra cui l'ipercolesterolemia; in effetti l'indicazione a seguire terapia ipolipemizzante è estremamente controversa, soprattutto nel grande anziano (1, 2).

Scopo di questo studio è analizzare le determinanti del rischio CV e dell'uso di statine in una popolazione ambulatoriale.

Pazienti e Metodi. Sono stati studiati pazienti afferenti all'ambulatorio di Cardiogeriatrics della nostra Unità, diversi dei quali grandi anziani (età >80aa). La raccolta di dati clinici e anamnestici ha consentito di calcolare la stima del rischio CV secondo l'algoritmo del Progetto SCORE (3) ed è stata analizzata l'influenza, su questo, dei diversi fattori di rischio nelle due fasce di età. Allo stesso modo sono stati studiati i determinanti dell'uso di statine. È stata utilizzata metodologia statistica standard, ivi incluse analisi di regressione multipla e logistica.

Risultati. Sono stati raccolti dati di 1382 pazienti (età 77.0 ± 6.9 , 598 maschi, 784 femmine). Come atteso, i pazienti più anziani presentavano valori più elevate di punteggio SCORE (18.2 ± 10.3 vs 10.2 ± 6.7 , $p < 0.001$, t test per dati indipendenti) e l'età risultava significativamente correlata con il rischio CV ($r=0.560$, $p < 0.001$). All'analisi di regressione multipla età, colesterolo sierico e pressione sistolica risultavano significativamente correlati con il punteggio SCORE. Nel gruppo dei grandi anziani il grado di correlazione con la colesterolemia si riduceva (OR 0.002-0.083, $p=0.061$) e l'indice di comorbilità CIRS si associava significativamente alla stima dello SCORE (OR 0.072-0.838, $p=0.021$). L'analisi di regressione logistica con lo SCORE ≥ 5 come variabile dipendente mostrava risultati sovrapponibili, mentre il fumo non mostrava un'associazione significativa. La prevalenza di uso di statine tendeva ad essere inferiore nei grandi anziani (18.6% vs 22.7%, $p=0.085$, chi-quadro). All'analisi logistica l'uso di statine era associato alla storia di cardiopatia ischemica ($p < 0.001$) e di stroke ($p=0.017$), ma non al diabete.

Conclusioni. I dati presentati sono coerenti con le evidenze in soggetti più giovani, nonostante l'equazione del progetto SCORE in origine non sia stata sviluppata per popolazioni anziane. Il fumo non sembra rappresentare una determinante di rilievo per la stima del rischio mentre, nei grandi anziani, la comorbilità si associa a una stima più elevata, in accordo con dati della letteratura nel paziente fragile (4). L'uso di statine si associa prevalentemente con al precedente storia CV, ma non alla presenza di diabete, mentre l'età avanzata sembra associarsi ad una minore prescrizione, probabilmente in rapporto ad un atteggiamento di cautela nei confronti dei possibili effetti collaterali del trattamento, in linea con quanto osservato in pazienti ospedalizzati (2).

Riferimenti bibliografici

1. Strandberg TE et al. JAMA. 2014; 312: 1136-1144.
2. Bertolotti M et al. Drugs Aging. 2017; 34: 311-319.
3. Conroy RM et al. Eur Heart J. 2003; 24: 987-1003.
4. Verma G et al. Cardiol Rev. 2017; 25: 236-240.

IPERLIPOPROTEINEMIA(A): EFFETTI DI UN TRATTAMENTO COMBINATO CON LIPOAFERESI E ALIROCUMAB IN UN PAZIENTE CORONAROPATICO

O. Ghirardello¹, N. Romano², A. Bonini², T. Fasano³, C. Trenti⁴, E.A. Negri⁴, M. Bove¹, A. Colangiulo¹, M. Dall'Agata¹, G.B. Vigna¹
¹Dip. Scienze Mediche, Università di Ferrara; ²U.O. Medicina Trasfusionale, AUSL Reggio Emilia; ³Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e di Endocrinologia, AUSL Reggio Emilia; ⁴Dip. Internistico, AUSL Reggio Emilia

Obiettivi. Lp(a) è una lipoproteina simile alle LDL, costituita da un core lipidico ricco in colesterolo e da una caratteristica proteina, apo(a), legata ad apoB tramite ponte disolfuro. I suoi livelli plasmatici sono geneticamente determinati e rappresenta un fattore di rischio cardiovascolare indipendente che non risente dei comuni trattamenti ipolipemizzanti. Statine ed ezetimibe sembrano addirittura determinare un lieve aumento dei livelli circolanti di Lp(a), mentre l'effetto favorevole osservato con niacina viene inficiato da effetti collaterali rilevanti. La lipoferesi sembra al momento rappresentare la terapia di scelta per ridurre la concentrazione, mentre gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 hanno mostrato una variabile efficacia

Pazienti e Metodi. Un paziente maschio di 63 aa, iperteso in buon controllo farmacologico, con ipercolesterolemia di grado lieve trattata con rosuvastatina 20 mg, non fumatore né diabetico, affetto da cardiopatia ischemica post-infartuale recidiva (sottoposta a multiple rivascolarizzazioni coronariche) e operato di aneurisma dell'aorta addominale, giungeva alla nostra osservazione con livelli

particolarmente elevati di Lp(a) (150-250 mg/dl) non responsivi al trattamento, e valori di LDL 72 mg/dl. Veniva indicata terapia di associazione con Ezetimibe 10 mg e proposta lipoferesi. Effettuava inizialmente procedura con sistema HELP (precipitazione lipoproteica indotta da eparina), passando poi a LIPOSORBER (adsorbimento lipoproteico su colonne di destran-solfato) trattando volumi crescenti di plasma (4.6 e 6.0 litri) per massimizzare l'efficacia. In seguito, previo parere positivo dell'organo regolatorio (Commissione Farmaci AVEC), iniziava terapia con Alirocumab 75 mg alternando settimanalmente una seduta aferetica al trattamento con l'inibitore di PCSK9. I valori medi dei parametri lipidici in corso di lipoferesi sono stati calcolati attraverso l'equazione di Kroon: $C_{media} = C_{max} - 0.73x(C_{max} - C_{min})$, dove C_{max} e C_{min} rappresentano le concentrazioni immediatamente pre- e post-aferesi degli analiti considerati.

Risultati. In tabella sono rappresentati i livelli basali (in corso di terapia con Rosuvastatina ed Ezetimibe) ed i livelli medi durante lipoferesi di colesterolo, LDL e Lp(a). Il metodo LIPOSORBER si è mostrato particolarmente efficace nel ridurre Lp(a), soprattutto in seguito a trattamento di un volume plasmatico di 6 litri. L'associazione con Alirocumab ha permesso di abbassare ulteriormente il C-LDL ma non Lp(a). Livelli prossimi a zero di C-LDL nelle fasi immediatamente post-aferetiche, non hanno fatto ritenere prudente l'up-titration di Alirocumab a 150 mg/2 settimane.

Conclusioni. Nel paziente considerato, la lipoferesi si è dimostrata una procedura in grado di ridurre significativamente la concentrazione di lipoproteine aterogene. L'aggiunta di Alirocumab al trattamento aferetico, sebbene in grado di ridurre significativamente i livelli di C-LDL, non ha comportato benefici aggiuntivi sulla concentrazione di Lp(a).

Trattamento	Aferesi (numero)	Intervallo (giorni)	Colesterolo (mg/dl)	LDL mg/dl	Lp(a) mg/dl
Rosuvastatina + Ezetimibe (basale)	-	-	107 ± 7**	56 ± 6**	160 ± 22*
HELP	21	12	96 ± 7	46 ± 5	139 ± 17
LIPOSORBER 4.6 Lt	17	10	93 ± 7	46 ± 5	124 ± 17*
LIPOSORBER 6.0 Lt	16	11	92 ± 7	44 ± 6	100 ± 7**
LIPOSORBER 6.0 Lt + Alirocumab 75 mg	6	14	70 ± 3**	19 ± 2**	99 ± 11**

* $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$ vs HELP.

DIFFERENZE NELL'ESPRESSIONE GENICA DEL TESSUTO ADIPOSO SOTTOCUTANEO IN CORSO DI RIPOSO FORZATO

M.A. Miselli, R. Colonna, J.M. Sanz, A. Sensoli, G. Zuliani, A. Passaro, E. Dalla Nora.

Sezione di Medicina Interna, Gerontologia e Nutrizione Clinica, Dipartimento di Scienze Mediche; Università di Ferrara

Obiettivo. L'inattività fisica è un fattore di rischio riconosciuto per la malattia cardiovascolare, una delle principali cause di morte nei paesi occidentali. Il tessuto adiposo è un organo complesso che può svolgere un ruolo in differenti condizioni fisiologiche e patologiche. Recenti studi hanno evidenziato un suo possibile ruolo anche nelle modificazioni metaboliche negative associate all'inattività fisica.

Scopo del nostro è stato quello di valutare le modificazioni dell'espressione genica del tessuto adiposo sottocutaneo in un gruppo di soggetti sani prima e dopo un periodo sperimentale di riposo a letto forzato, un modello sperimentale validato di inattività fisica.

Materiali/Pazienti e Metodi. Sette uomini sani di mezza età sono sottoposti ad un prelievo biotipico del tessuto adiposo sottocutaneo gluteo, prima e dopo 14 giorni di totale inattività fisica (riposo assoluto a letto). Dai campioni di tessuto adiposo è stato isolato l'RNA per la valutazione del profilo di espressione mediante Microarray. Risultati. Dopo 14 giorni di riposo forzato, si è registrata una significativa variazione nell'espressione genica di 308 geni. L'analisi *"in silico"* riconosceva tra questi una serie di geni associati alle malattie cardiovascolari e metaboliche. In particolare, dopo riposo forzato si assisteva ad una aumentata espressione di IL18, IL1 β , NLRP3 e SOAT1.

Conclusioni. Dopo un periodo di riposo forzato a letto si assiste ad una modificazione del profilo di espressione del tessuto adiposo sottocutaneo. In particolare si evidenzia una modificazione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nel processo aterosclerotico. Questi dati suggeriscono un possibile ruolo del tessuto adiposo nel mediare gli effetti deleteri dell'inattività fisica, sul rischio cardiovascolare.