

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

## XVI Congresso della Sezione Lombardia

Milano, 19-21 ottobre 2017

*Come di consueto, anche quest'anno il Congresso Regionale ha dato ampio spazio alle comunicazioni, da parte di giovani ricercatori, di lavori di ricerca clinica e di base nell'ambito dell'aterosclerosi.*

*In apertura di Congresso è stato fatto il punto sulle potenzialità e sulle prospettive della ricerca scientifica nel nostro Paese, sia dal punto di vista dell'Università e della Sanità Pubblica, con gli interventi del dott. Angelo Casertano, Direttore Servizi per la Ricerca dell'Università degli Studi di Milano, e del dott. Luca Del Gobbo, Assessore all'Università, Ricerca ed Open Innovation di Regione Lombardia, che da quello degli Enti finanziatori, con la partecipazione del dott. Carlo Mango, Direttore Area Scientifica e Tecnologica di Fondazione Cariplo. In questo contesto sono stati presentati da giovani ricercatori numerosi progetti finanziati da Fondazione CARIPO nel periodo 2014-2016.*

*Durante il Congresso sono state affrontate le più recenti evidenze emerse in tema di prevenzione cardiovascolare. La riduzione del colesterolo LDL resta l'obiettivo primario degli approcci terapeutici; la recente introduzione sul mercato di farmaci in grado di portare a riduzioni molto consistenti della colesterolemia LDL, quali gli anticorpi monoclonali degli inibitori di PCSK9, ha sollevato perplessità circa gli aspetti di sicurezza associati a livelli tanto bassi di LDL. Sebbene non vi siano ancora dati a lungo termine relativi alle terapie farmacologiche, i dati a breve termine e le evidenze emerse dall'osservazione di soggetti con livelli geneticamente ridotti di colesterolo LDL non hanno finora mostrato particolari problematiche di sicurezza.*

*Per quanto riguarda il colesterolo HDL, sebbene sia nota la correlazione tra bassi livelli e aumento del rischio cardiovascolare, alla luce dei dati dello Studio REVEAL, resta da dimostrare l'efficacia dell'innalzamento farmacologico dei livelli di HDL, almeno su una popolazione con concentrazioni basali non particolarmente basse.*

*Il congresso ha anche dato spazio all'approfondimento degli aspetti fisiopatologici, diagnostici e terapeutici di due alterazioni lipidiche geneticamente determinate, quali l'ipercolesterolemia familiare (FH) e il deficit di lipasi acida lisosomiale (LAL-D).*

*Si è anche discusso della lipoproteina (a) come target nella malattia cardiovascolare. Nonostante i limiti legati alla variabilità della metodica di analisi, la misurazione dei livelli di Lp(a) rappresenta un'opzione da considerare nella pratica clinica e nella valutazione dei fattori di rischio cardiovascolari del paziente.*

*Il congresso ha inoltre ospitato un simposio congiunto AMD, SID, SISA, SITeCS, in cui sono state trattate tematiche inerenti la medicina di genere. Da un lato, è stato affrontato il tema delle dislipidemie, delle comorbidità ad esse associate e del loro trattamento da un'ottica di differenze di genere. Dall'altro, sono state descritte potenzialità e criticità della pianificazione della gravidanza in una donna affetta da diabete, oltre alle problematiche inerenti il diabete gestazionale.*

*Sono state discusse anche le potenzialità dei database amministrativi nella valutazione del valore del farmaco e del ruolo della medicina di base nell'ottimizzazione della gestione del paziente.*

*Infine, una sessione è stata dedicata alla misurazione dell'Intima-Media Thickness (IMT) carotideo e al suo valore predittivo in termini di rischio cardiovascolare; le attuali linee guida europee sostengono che la valutazione dell'IMT vada integrata con l'indagine e definizione della placca aterosclerotica. Questo potrebbe aiutare ad individuare, tra soggetti valutati dagli algoritmi tradizionali come a rischio cardiovascolare medio-basso, delle priorità di intervento.*

## COMUNICAZIONI ORALI

### LE ALTERAZIONI DEL SISTEMA IMMUNITARIO LEGATE ALL'INVECCHIAMENTO PEGGIORANO L'ESITO DELL'ICTUS ISCHEMICO NELL'ANZIANO

G.S. Gullotta<sup>1</sup>, D. De Feo<sup>1</sup>, T. Vigo, N. Maugeri<sup>2</sup>, P. Ronchi<sup>3</sup>, N.K. De Rosbo, M. Gallizioli<sup>1</sup>, G. Comi<sup>1</sup>, A. Uccelli, G. Martino<sup>1</sup>, M. Bacigaluppi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neuroimmunology Unit, Division Of Neuroscience-Inspe-Institute Of Experimental Neurology, <sup>2</sup>Division Of Regenerative Medicine, Stem Cells, And Gene Therapy, Immunohematology And Transfusion Medicine Unit, <sup>3</sup>Transplantation And Infectious Diseases, Autoimmunity & Vascular Inflammation Unit, Division Of Immunology, at Università Vita-Salute and San Raffaele Scientific Institute, Milan

Durante l'invecchiamento il sistema nervoso e immunitario vanno incontro a una serie di modificazioni strutturali e funzionali che alterano la risposta agli insulti infiammatori. Una delle conseguenze di tale declino funzionale è che l'ictus ischemico colpisce principalmente la popolazione più anziana. In questo studio, abbiamo studiato come il profilo infiammatorio di topi anziani contribuisca al peggior esito clinico dopo ictus ischemico.

Topi giovani e anziani sono stati sottoposti a 45 minuti di occlusione transiente dell'arteria cerebrale media (MCAo). Una sonda doppler ha permesso di valutare la perfusione del tessuto cerebrale a livello della corteccia. Mediante analisi citofluorimetriche è stato studiato il profilo infiammatorio su sangue, midollo osseo e cervello prima dell'ischemia cerebrale e due giorni dopo. È stato eseguito il ringiovanimento del comparto ematopoietico mediante trapianto di midollo osseo totale su topi anziani da donatori giovani. Sono state eseguite analisi comportamentali, studio del profilo infiammatorio ed è stata valutata la sopravvivenza.

Il topo anziano presenta dopo ischemia maggiore disabilità e mortalità rispetto al giovane. È stato osservato un deficit rilevante della ripercussione del tessuto cerebrale ("fenomeno da non-reflusso") nei topi anziani, rispetto ai giovani. Tale deficit è stato inoltre confermato in istologia, attraverso la valutazione del numero di costrizioni presentate dai vasi del microcircolo e dal numero dei segmenti contenenti eritrociti. Durante l'invecchiamento si verifica un graduale spostamento del differenziamento delle staminali ematopoietiche verso la linea mieloide, con relativo incremento di cellule mieloidi circolanti. È interessante notare come il ringiovanimento del comparto ematopoietico dei topi anziani è in grado di ripristinare in parte lo spostamento verso la linea mieloide, di migliorare significativamente la ripercussione, la disabilità e la sopravvivenza dopo ictus.

In conclusione, i nostri dati evidenziano come le alterazioni del profilo infiammatorio, legate all'invecchiamento, contribuiscano al peggioramento della ripercussione del tessuto cerebrale dopo ictus ischemico, il quale correla con l'incremento del danno cerebrale, della disabilità e della mortalità osservata negli individui anziani.

### CATENE LEGGERE IMMUNOGLOBULINICHE ED AMILOIDOSI CARDIACA: IDENTIFICAZIONE DI CARATTERISTICHE STRUTTURALI E BIOFISICHE LEGATE ALL'AMILOIDOGENICITÀ

M. Maritan<sup>1</sup>, L. Oberti<sup>1</sup>, P. Rognoni<sup>2</sup>, S. Ricagno<sup>1</sup>, F. Lavatelli<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università di Pavia

**Introduzione.** L'amiloidosi da catene leggere (AL) è una malattia sistemica, causata dall'aggregazione e deposizione di catene leggere (CL) immunoglobuliniche monoclonali sotto forma di fibrille amiloidi. Il cuore è frequentemente affetto ed è il principale determinante prognostico. I meccanismi molecolari e cellulari alla base della formazione di depositi di amiloide e della disfunzione cellulare sono in gran parte oscuri, impedendo lo sviluppo di trattamenti per contrastare il danno tissutale. Questo progetto ha l'obiettivo di identificare i determinanti molecolari che conferiscono a specifiche CL l'abilità di aggregare e causare cardiotoxicità in cellule cardiache umane. L'identificazione di tali caratteristiche è il prerequisito per lo studio di composti in grado di stabilizzare le CL e bloccarne il danno nell'organo bersaglio.

**Metodi.** Nelle fasi iniziali di questo studio sono state utilizzate catene leggere monoclonali isolate da pazienti con amiloidosi AL cardiaca (CL-H) e da controlli (pazienti con mieloma multiplo senza amiloidosi) (CL-M), per compararne le caratteristiche biofisiche/biochimiche (mediante studi di fluorescenza, dicroismo circolare, proteolisi limitata), strutturali (attraverso la cristallografia a raggi-X) ed il profilo di tossicità cellulare (utilizzando colture primarie di cellule cardiache umane) delle singole varianti.

**Risultati.** Dall'analisi biochimica è emersa la tendenza delle CL-H ad avere una minore stabilità in termini di folding proteico e termostabilità rispetto alle CL-M; suggerendo maggiore flessibilità. Dal punto di vista strutturale, il confronto tra le coordinate atomiche delle proteine tossiche e quelle non tossiche non ha ad ora evidenziato differenze significative riconducibili al fenotipo tossico. Le discrepanze tra risultati strutturali e biochimici suggeriscono che la patogenicità delle CL-H sia legata a una combinazione di caratteristiche, e da qui la necessità di applicare un approccio multidisciplinare per tracciare un quadro definitivo dei fattori determinanti la tossicità. A livello cellulare, la tossicità causata dalle CL-H nei pazienti risulta riprodotta anche in fibroblasti cardiaci in coltura.

**Conclusioni.** In questo studio è stata messa a punto una piattaforma multidisciplinare per la caratterizzazione delle CL e per lo studio della relazione struttura-tossicità cellulare. Le informazioni ricavate hanno permesso di elucidare caratteristiche distintive delle specie tossiche e forniscono un punto di partenza per il design di molecole che possano inibire la aggregazione e la tossicità nell'amiloidosi AL.

## HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1): UNA NUOVA PROTEINA PROTAGONISTA DELLA CALCIFICAZIONE VASCOLARE?

L. Mancinelli<sup>1,2</sup>, I. Badi<sup>2</sup>, F. Zeni<sup>2</sup>, F. Taccia<sup>2</sup>, C. Saccu<sup>3</sup>,  
R. Spirito<sup>3</sup>, M.E. Bianchi<sup>4</sup>, A. Raucci<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fondazione IEO-CCM, Milano; <sup>2</sup>Unità di Cardio-Oncologia  
Sperimentale e Invecchiamento Cardiovascolare, CCM, Milano;  
<sup>3</sup>Unità di Chirurgia vascolare e Endovascolare, CCM, Milano,  
Italia; <sup>4</sup>Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

La Calcificazione Vascolare (CV) è una complicazione, normalmente associata all'età, di malattie come la Malattia Renale Cronica, l'Aterosclerosi, il Diabete Mellito di Tipo 2, ed è un principale fattore di rischio per malattie cardiovascolari. Nonostante i soggetti affetti da CV siano pazienti ad alto rischio, non è stata ancora sviluppata una terapia efficace contro tale complicazione. HMGB1 (High Mobility Group Box 1) è un fattore nucleare coinvolto nella trascrizione, riparazione del DNA e mantenimento del numero di nucleosomi. Dopo uno stimolo infiammatorio, HMGB1 trasloca dal nucleo al citoplasma e nell'ambiente extracellulare dove agisce da "allarmina" e/o fattore rigenerativo. Ciò avviene anche in cellule senescenti dove la diminuzione di HMGB1 provoca una riduzione del contenuto di istoni e una maggiore suscettibilità al danno al DNA. La senescenza e il transdifferenziamento osteocondrogenico delle Cellule Muscolari Lisce Vascolari (VSMCs) sono responsabili della CV.

L'obiettivo di questo progetto è quello di determinare il ruolo di HMGB1 nella CV, in particolare nei meccanismi coinvolti nel rimodellamento della cromatina influenzati da HMGB1 e responsabili della senescenza e del transdifferenziamento in senso osteocondrogenico delle VSMCs.

Abbiamo osservato che i livelli proteici di HMGB1 e degli istoni diminuiscono drasticamente in aorte di topo invecchiati e in cellule muscolari lisce aortiche umane (HASMC) che vanno incontro a senescenza e calcificazione. Inoltre, in aorte calcificate di ratti uremici e in campioni umani di aneurisma dell'aorta addominale, l'espressione di HMGB1 si abbassa significativamente e correla negativamente con il contenuto di calcio nel tessuto. Infine, esperimenti preliminari evidenziano che tessuti molli di topi Hmgb1 +/- hanno una maggiore tendenza a calcificare rispetto a topi Hmgb1 +/+.

Questi risultati suggeriscono che HMGB1 possa avere un ruolo nel determinare i meccanismi coinvolti nell'insorgenza della CV e rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico.

## STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI CHE DETERMINANO LA DISFUNZIONE DELLA CELLULA STAMINALE EMATOPOIETICA NELL'ANZIANO

D. Montariello<sup>1</sup>, G. De Michele<sup>1</sup>, M. Giorgio<sup>1</sup>, E. Derenzini<sup>1</sup>,  
E. Migliaccio<sup>1</sup>, V.E. Avvedimento<sup>2</sup>, P.G. Pelicci<sup>1,3</sup>, C. Tarella<sup>1,4</sup>  
<sup>1</sup>Fondazione Istituto Europeo di Oncologia e Centro Cardiologico  
Monzino (FIEO-CCM), Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina  
Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi  
di Napoli "Federico II"; <sup>3</sup>Dipartimento di Oncologia  
ed Emato-Oncologia, Università di Milano; <sup>4</sup>Dipartimento  
di Scienze della Salute, Università di Milano.

La conoscenza dei meccanismi cellulari coinvolti nell'invecchiamento è alla base dello sviluppo di strategie per ridurre la fragilità dell'anziano. Questo progetto di ricerca mira a determinare i meccanismi epigenetici alla base del rimodellamento della cellula staminale ematopoietica durante l'invecchiamento e nell'evoluzione di sindromi mieloproliferative che causano fragilità dell'anziano. L'adattamento cellulare allo stress ossidativo causa un rimodellamento della cellula staminale che degenera con l'età. Tale mal funzionamento riduce le funzioni del tessuto o può favorire una proliferazione incontrollata, che potrebbe evolvere nel cancro. Lo scopo centrale di questo studio è l'identificazione di meccanismi molecolari che associano una deregolata proliferazione della cellula staminale alla sua involuzione e sviluppo di malattia. Un ulteriore obiettivo del progetto riguarda la comprensione del ruolo convergente dello stress cronico replicativo, rappresentato dalla erosione dei telomeri, e dello stress ossidativo nel riprogrammare la cellula staminale in maniera patologica. Per raggiungere tali obiettivi, è previsto il reclutamento e lo studio clinico e biomolecolare di cellule emopoietiche di soggetti sani, giovani e vecchi, affetti da diverse tipologie e stadi di malattie mieloproliferative. Per lo sviluppo e lo studio del potenziale replicativo delle cellule staminali emopoietiche, si utilizzeranno modelli murini caratterizzati da ridotto (p66Shc<sup>-/-</sup> C57/BL6) o accelerato (Terc<sup>-/-</sup> C57/BL6) invecchiamento. Nel nostro laboratorio, abbiamo prodotto dei dati preliminari che suggeriscono un ruolo per il gene p66Shc nella regolazione della divisione asimmetrica e nel mantenimento del pool di cellule staminali adulte, che come è noto, perdono di funzionalità durante l'invecchiamento. Recenti evidenze suggeriscono che la perdita di polarità sia un emergente meccanismo di invecchiamento delle staminali ematopoietiche. In esperimenti preliminari, abbiamo utilizzato dei marcatori di polarità, quali Cdc42 e tubulina, ed osservato che le staminali ematopoietiche isolate da topi anziani p66Shc<sup>-/-</sup> C57/BL6 mantengono la polarità al pari di topi giovani, confermando un ruolo del gene p66Shc nell'invecchiamento delle staminali.

## INTERAZIONE TRA ASSUNZIONE DI SODIO, IPERTENSIONE E RISCHIO CARDIOVASCOLARE. DISSEZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE DI UN NUOVO MECCANISMO CAUSALE

M. Trudu<sup>1</sup>, C. Schaeffer<sup>1</sup>, M. Barcella<sup>2</sup>, E. Pasqualetto<sup>1</sup>, C. Lanzani<sup>3</sup>, D. Braga<sup>2</sup>, M. Ikehata<sup>4</sup>, L. Zagato<sup>3</sup>, M.P. Rastaldi<sup>4</sup>, D. Cusi<sup>2</sup>, C. Barlassina<sup>2</sup>, P. Manunta<sup>3</sup>, L. Rampoldi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Istituto scientifico San Raffaele, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Divisione di Nefrologia e Dialisi, Istituto scientifico San Raffaele, Milano; <sup>4</sup>Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali, Milano

L'ipertensione è una patologia complessa che colpisce principalmente i soggetti anziani ed è riconosciuta come principale fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, la principale causa di decessi nei paesi industrializzati. La regolazione della pressione sanguigna (BP) è in parte regolata dall'omeostasi renale del sale, processo chiamato "sale-sensibilità". La sale-sensibilità è eterogenea tra gli individui e caratterizza circa metà degli ipertesi. Anche se i meccanismi alla base dell'ipertensione sale-sensibile non sono ancora stati completamente chiariti, essa è almeno in parte sotto controllo genetico. Tra i fattori di rischio genetico sono state individuate alcune varianti comuni del gene UMOD, che codifica per uromodulina, una proteina espressa unicamente nel rene e secreta nelle urine. Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che le varianti di rischio determinano una maggiore espressione del gene e che l'aumentata espressione di uromodulina determina un incremento sale-sensibile della pressione ematica.

Il nostro studio è volto ad individuare come le modificazioni epigenetiche e la modulazione dell'assunzione di sale influenzano la BP in pazienti ipertesi e in modelli murini esprimenti diversi livelli di uromodulina. Per raggiungere questo scopo, abbiamo utilizzato protocolli clinici (acuti e cronici) in pazienti ipertesi esprimenti diverse varianti di UMOD, che conferiscono "protezione" o "aumentato rischio" di incrementare la pressione ematica. Inoltre, nel nostro laboratorio abbiamo generato modelli murini in cui il gene UMOD è stato deletato (knock-out) o che esprimono livelli maggiori di uromodulina rispetto ad animali controllo (transgenici). Abbiamo utilizzato il tessuto renale espantato da questi modelli murini per effettuare tecniche di co-immunoprecipitazione ed individuare proteine che interagiscono con l'uromodulina, e tecniche di RNA-Sequencing su campioni di rene totale o di segmenti di nefrone microdissezionati per individuare i meccanismi molecolari attivati/repressi in condizioni di diverso contenuto sodico nella dieta. Attualmente stiamo analizzando e validando i risultati ottenuti durante la prima fase del progetto. Ci aspettiamo che tali risultati potranno ampliare le nostre conoscenze sul ruolo dell'uromodulina (e dei suoi regolatori o effettori) nell'assorbimento del sodio nel rene, nella regolazione della pressione ematica e nell'insorgenza dell'ipertensione. I risultati ottenuti tramite questa ricerca clinica e preclinica avranno una forte rilevanza dal punto diagnostico e prognostico e potranno indicare nuovi bersagli terapeutici.

## IPS-DERIVED HUMAN CARDIOMYOCYTES: A POWERFUL TOOL TO INVESTIGATE THE CELLULAR MECHANISMS OF GENETICALLY DETERMINED LONE ATRIAL FIBRILLATION (CLARIFY)

P. Benzoni, G. Camprostrini, A. Barbuti, P. Dell'Era  
Università degli Studi di Milano, Dip. Di Bioscienze

Atrial Fibrillation (AF) is the most common type of cardiac arrhythmias whose incidence grows significantly with age; AF occurs when the regular pacing activity generated by the sinoatrial node is overdriven by disorganized electrical activity originating in the left atrium. Since in aged population AF is frequently observed as a complication of other cardiovascular disorders, recent genetic studies revealed the presence of several mutations and variants linked to AF, findings which justify the definition of AF as a multifactorial disease. Due to this complex background and the paucity of models, the molecular mechanisms underlying the initiation of AF are still poorly understood.

In addition, electrical disturbances typical of AF cause the remodeling of the atria that may sustain the arrhythmic phenotype. This remodeling, in turn, makes impossible to discriminate between causes and effects of AF when analyzing patient's cardiomyocytes (CMs). We decided to use patient-derived iPSC to obtain a human cardiac cell model that possesses the entire patient's genetic background. We generated iPSC from two out of three siblings affected by a drug-resistant form of AF that they developed at relatively young age (<55 years). Using this model, we compared molecular and electrophysiological properties of iPSC-CMs from AF patients and controls, revealing alterations in ionic currents that may contribute to AF initiation.

We moved on using our experience about iPSC-model to analyze the role of specific gene mutation associated with AF only by whole exome genome such as PITX2C, for which heterologous systems cannot be used to understand the possible pathogenesis, look for electrophysiological abnormalities.

## METABOLIC PATTERN E eIF6 DEPLETION: ESISTE UN'INTERCONNESSIONE? UNO STUDIO MULTIDISCIPLINARE

S. Martinotti<sup>1</sup>, M. Manfredi<sup>2</sup>, E. Conte<sup>2</sup>, A. Scagliola<sup>3</sup>, P. Calamita<sup>3</sup>, A. Miluzio<sup>3</sup>, E. Robotti<sup>1</sup>, E. Marengo<sup>1</sup>, S. Biffo<sup>3,4</sup>, E. Ranzato<sup>5</sup>  
<sup>1</sup>University of Piemonte Orientale, DISIT, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Alessandria; <sup>2</sup>Isalit srl, Novara, Politecnico di Torino, Alessandria; <sup>3</sup>Istituto Nazionale Genetica Molecolare "Romeo ed Enrica Invernizzi", Milano; <sup>4</sup>University of Milan, Department of Biosciences, Milano; <sup>5</sup>University of Piemonte Orientale, DISIT, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Vercelli

I disturbi metabolici, tra cui l'obesità, un'alterata tolleranza al glucosio e quindi l'insorgenza di diabete di tipo 2, hanno una maggiore frequenza durante l'invecchiamento, diventando causa di grave morbilità e mortalità.

Il controllo della sintesi proteica (traduzione) ha un ruolo importante sia nell'invecchiamento che nell'insorgenza di disturbi metabolici.

Come noto, la regolazione dei fattori coinvolti nella sintesi proteica, favorisce il controllo dell'invecchiamento e un miglioramento della durata della vita.

Eukaryotic Initiation Factor 6 (eIF6) è un fattore di inizio che lega la subunità ribosomiale 60S impedendone una prematura unione con la 40S.

In passato abbiamo dimostrato che, *in vivo*, l'inibizione di eIF6 blocca la progressione tumorale e protegge dallo sviluppo di steatosi epatica. La condizione cronica di eterozigosi di eIF6 riduce obesità e lipogenesi, e migliora il controllo glicemico di una high fat diet. L'analisi dell'espressione genica dimostra che l'inibizione eIF6 provoca una "delayed aging" signature.

I mitocondri sono il principale compartimento cellulare di produzione dell'energia, ed è stato dimostrato come alterazioni mitocondriali contribuiscano allo sviluppo di disturbi metabolici.

Fino ad ora l'azione regolatoria di eIF6 sull'attività mitocondriale non è ancora stata esplorata.

A questo scopo, utilizzando diverse metodologie, dalla microscopia elettronica ai saggi biochimici, arrivando agli approcci omici, abbiamo analizzato la signature metabolica di una linea cellulare di epatociti murini, in cui eIF6 risulta down-regolato.

I risultati mostrano che la deplezione di eIF6 modifica profondamente le proprietà intrinseche e le funzioni mitocondriali, aumentando la produzione di ROS, riducendo la produzione di energia con un'inibizione della fosforilazione ossidativa.

## EPIGENETICA E METABOLISMO CARDIACO: IMPLICAZIONI NELLO SCOMPENSO CARDIACO DELL'ANZIANO

R. Papait, S. Serio, C. Pagiatakis, G. Condorelli  
 Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB)-CNR; Humanitas IRCCS-Dipartimento Cardiovascolare

Lo scompenso cardiaco è una malattia dell'anziano con un'alta frequenza di mortalità e morbosità ed è il risultato del graduale declino della funzionalità cardiaca che avviene con il progredire dell'età. In questo processo hanno un ruolo determinante le alterazioni metaboliche che avvengono nel corso dell'invecchiamento e che rendono il cuore dell'anziano meno propenso a ricavare l'energia dall'ossidazione degli acidi grassi, una situazione che predispone allo scompenso cardiaco. I meccanismi molecolari responsabili di questi cambiamenti metabolici sono poco conosciuti.

Durante gli ultimi anni un numero sempre più alto di lavori suggerisce l'esistenza di una stretta connessione tra metabolismo ed epigenetica. Per alcune specifiche vie metaboliche è stato infatti dimostrato un controllo epigenetico. Inoltre, è stato mostrato come una specifica dieta possa influenzare il profilo epigenetico del genoma. Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato come l'istone-metiltransferasi G9a nel cuore adulto sia richiesta per la corretta funzionalità cardiaca reprimendo non solo geni che codificano per importanti regolatori della contrazione dei cardiomiociti ma anche enzimi coinvolti nel metabolismo del glucosio attraverso la di-metilazione della lisina 9 dell'istone H3 e l'interazione con il complesso repressivo Polycomb 2. Al contrario, abbiamo trovato che nel cuore stressato G9a promuove i cambiamenti trascrizionali responsabili dell'ipertrofia cardiaca silenziando l'espressione dei geni ipertrofici. Questi dati, insieme al fatto che l'espressione di G9a aumenta nel corso dell'invecchiamento cardiaco suggeriscono come questa metiltransferasi abbia un ruolo importante nel promuovere i cambiamenti trascrizionali responsabili del declino della funzionalità cardiaca nel cuore anziano.

## MECCANISMI EPIGENETICI NELLA PATOGENESI E FISIOPATOLOGIA DELL'OSTEOPOROSI: NUOVE INTUZIONI DAGLI STUDI *IN VITRO* ED *IN VIVO*

L. Casati<sup>1</sup>, F. Pagani<sup>1</sup>, F. Celotti<sup>2</sup>, V. Sibilia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari

Negli ultimi anni è emerso come il differenziamento e la proliferazione di osteoblasti ed osteoclasti siano sottoposti ad un complesso meccanismo di regolazione che prevede non solo l'azione combinata di ormoni circolanti, fattori locali e meccanici ma anche un controllo da parte di meccanismi epigenetici attraverso il controllo dei cambiamenti fenotipici delle cellule ossee. Rimane ancora ampiamente da chiarire se la carenza di steroidi sessuali e/o l'attivazione di un ambiente cellulare sfavorevole (come lo stress ossidativo e l'infiammazione) possano influenzare i meccanismi epigenetici coinvolti nello squilibrio tra neoformazione e riassorbimento osseo che si manifesta in corso di osteoporosi.

Lo scopo primario dello studio finanziato da Fondazione Cariplo è quello di analizzare se i cambiamenti ambientali (relativi all'ambiente ormonale, al livello di specie reattive dell'ossigeno, a stimoli infiammatori) possono alterare il profilo trascrittomico "*in vitro*" in linee cellulari osteoblastiche e osteoclastiche mediante meccanismi epigenetici e se gli stessi meccanismi epigenetici identificati negli studi *in vitro* siano coinvolti nella perdita ossea indotta *in vivo* in un modello sperimentale di osteoporosi.

Negli studi *in vitro* verranno utilizzate 3 linee cellulari: MC3T3-E1 (osteoblasti murini), RAW264.7 (precursori di osteoclasti murini), MLOY4 (osteociti murini). Queste cellule saranno esposte o meno a trattamenti con steroidi sessuali o stimoli infiammatori. Su questi campioni verranno condotti studi trascrittomici, proteomici ed epigenetici. Negli studi *in vivo* si utilizzeranno conigli adulti maschi e femmine. Su questi animali verrà indotta una condizione simile all'OP senile o post-menopausale mediante gonadectomia associata ad una dieta ipocalcica. Su tibia e femore prelevati dagli animali verranno condotti studi morfometrici e (in funzione dai risultati ottenuti dagli studi *in vitro*) analisi trascrittomiche ed epigenetiche.

Risultati preliminari ottenuti utilizzando le cellule MC3T3-E1 e MLOY 4 indicano che gli ormoni sessuali steroidei sembrano esercitare un effetto protettivo sulla vitalità cellulare in condizioni di stress ossidativo. Gli ormoni sessuali inoltre sembrano prevenire in modo sesso specifico alcune delle alterazioni del profilo trascrittomico dei geni maggiormente coinvolti nello sviluppo dell'osteoporosi indotte dallo stress acuto negli osteoblasti.

Questi studi potrebbero contribuire all'identificazione di nuovi bersagli coinvolti nella patogenesi dell'osteoporosi e di individuare approcci terapeutici innovativi per tale patologia.

## INFLAMM-AGING E RISCHIO CARDIOVASCOLARE NELLO STADIO TERMINALE DELLA MALATTIA RENALE CRONICA: RUOLO PATOGENETICO DELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI E IDENTIFICAZIONE DI NUOVI TARGET TERAPEUTICI

G. Merlotti<sup>1</sup>, M. Quaglia<sup>1</sup>, M. Giordano<sup>2</sup>, M. Marengo<sup>3</sup>, V. Cantaluppi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SCDU Nefrologia e trapianto renale, AOU Maggiore della Carità, Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università del Piemonte Orientale, Novara; <sup>2</sup>Laboratorio di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche e IRCAD, Università del Piemonte Orientale, Novara; <sup>3</sup>SC Nefrologia e Dialisi, ASL CN1 Cuneo

**Introduzione.** La malattia renale cronica (CKD) è considerata un modello di invecchiamento precoce e la malattia cardiovascolare (CVD) rappresenta la principale causa di morte nella CKD. Le vescicole extracellulari plasmatiche (EV) rappresentano un nuovo modo di interpretare la comunicazione intercellulare e sono in grado di trasferire materiale genetico (microRNA) dalla cellula di origine alle cellule target. Diversi studi hanno segnalato che l'infiammazione svolge un ruolo fondamentale nella CVD: la principale ipotesi di lavoro è che nel corso della CKD le tossine uremiche possono indurre il rilascio di EV in grado di favorire la CVD.

**Obiettivo.** Valutare il ruolo dell'RNA trasportato dalle EV nella senescenza endoteliale e nella calcificazione vascolare in pazienti con CKD avanzata

**Disegno dello studio.** Studio clinico osservazionale, multicentrico, prospettico, durata 24 mesi, diviso in 2 lavori principali (WP):

1. WP1: Identificazione e caratterizzazione dell'RNA contenuto nelle EV in pazienti con CKD e valutazione del loro ruolo nella CVD. Il WP1 sarà suddiviso in: 1A) arruolamento di 100 pazienti con CKD stadio IV/V in 4 centri italiani, quantificazione e caratterizzazione delle EV e analisi dell'RNA; 1B) correlazione quantitativa e qualitativa dell'RNA con marcatori clinici di CVD (arterial stiffness, ispessimento della parete carotidea e disfunzione diastolica); 1C) valutazione *in vitro* degli effetti delle EV su cellule umane endoteliali e muscolari lisce; 1D) valutazione ex vivo degli effetti di vasocostrizione/vasodilatazione delle EV su arterie umane isolate.
2. WP2: Sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate su molecole antiossidanti presenti nella dieta mediterranea e su nuove membrane adsorbenti di dialisi per rimuovere le EV o inibire l'attività dell'RNA. Il WP2 sarà suddiviso in: 2A) valutazione dell'effetto di composti antiossidanti (idrossitiroso, tirosolo, acido caffeico, malvidina e resveratrolo) nella modulazione dell'RNA delle EV e quindi sulla progressione della CKD e della CVD; 2B) confronto di differenti tecniche dialitiche sulla clearance delle EV e sull'inibizione della loro attività cardiovascolare.

**Risultati attesi.** L'identificazione di nuovi target terapeutici e del ruolo patogeno dell'RNA trasportato dalle EV potrebbe portare all'identificazione di nuove vie terapeutiche, permettendo così di bloccare la progressione della CKD e della CVD. L'identificazione del ruolo patogeno delle EV nell'ambiente infiammatorio potrebbe trovare applicazione anche in altri contesti come sepsi e neoplasie.

## LA TROMBO-INTIAMMAZIONE NELL'ISCHEMIA CEREBRALE: FOCUS SU MANNOSE-BINDING LECTIN E $\beta$ 2 GLICOPROTEINA I

S. Fumagalli<sup>1</sup>, C. Artusi<sup>2</sup>, M. Oggioni<sup>1</sup>, C. Perego<sup>1</sup>, M.O. Borghi<sup>c</sup>, C. Grossi<sup>3</sup>, F. Tedesco<sup>3</sup>, P.L. Meroni<sup>2,3</sup>, M.G. De Simoni<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>IRCCS Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri;  
<sup>2</sup>Università di Milano; <sup>3</sup>IRCCS Istituto Auxologico Italiano

La via lectinica di attivazione del complemento è un potente meccanismo infiammatorio coinvolto nella patogenesi dell'ictus. La presenza degli iniziatori della via lectinica in placche aterosclerotiche vulnerabili, associate al rischio di ictus (Fumagalli et al., *Front Immunol* 2017), ne suggerisce un ruolo nei processi trombotici. In questo studio abbiamo esplorato, in un modello murino di ischemia cerebrale, l'interazione di mannose-binding lectin (MBL), proteina inziatrice della via lectinica, con  $\beta$ 2GPI, una glicoproteina circolante coinvolta nei processi pro-coagulanti mediati da anticorpi antifosfolipidi, il più importante fattore di rischio per l'ictus giovanile.

Topi C57bl6/J maschi di 11 settimane sono stati sottoposti ad ischemia tramite occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media. L'espressione genica epatica di MBL e  $\beta$ 2GPI, i loro livelli plasmatici e localizzazione cerebrale sono stati analizzati dopo 90 minuti, 6, 24, 48, 96 ore o 7 giorni dall'induzione dell'ischemia.

L'espressione genica di MBL e  $\beta$ 2GPI viene up-regolata a partire da 48 ore dopo lo stimolo ischemico. A questo tempo l'interazione tra le proteine circolanti MBL e  $\beta$ 2GPI aumenta significativamente rispetto ai controlli (animali falsi-operati). MBL inizia a depositarsi sull'endotelio ischemico da 24 ore e fino a 4 giorni rimane selettivamente sulle pareti vascolari, dove co-localizza con la fibrina. La forma attiva di  $\beta$ 2GPI è presente precocemente (90 minuti) e almeno fino a 7 giorni dopo ischemia sia sull'endotelio ischemico che nel parenchima cerebrale. Negli animali controllo nessuna delle due proteine si deposita a livello cerebrale. L'osservazione che  $\beta$ 2GPI è presente anche nel parenchima cerebrale è del tutto originale ed è stata indagata mediante microscopia ad immunofluorescenza. Nell'area ischemica  $\beta$ 2GPI si lega ai neuroni che mostrano segni di sofferenza come l'espressione precoce (90 minuti) di annessina V e uno stato apoptotico irreversibile (48 ore). I neuroni positivi per  $\beta$ 2GPI sono riconosciuti dalla proteina C3, un'opsonina attivata dal sistema del complemento, che ne media l'eliminazione tramite fagocitosi.

Questo studio dimostra, per la prima volta nel contesto dell'ischemia cerebrale, l'interazione tra il sistema del complemento e  $\beta$ 2GPI a livello vascolare, implicandone il coinvolgimento nei processi pro-coagulanti, e a livello parenchimale, suggerendone la partecipazione ai meccanismi di morte neuronale indotti dal danno.

## TESSUTO ADIPOSO E PCSK9: POSSIBILE RUOLO DI LEPTINA E RESISTINA

C. Macchi<sup>1</sup>, M. Botta<sup>1</sup>, S. Marchianò<sup>1</sup>, D. Dall'Orto<sup>1</sup>, P. Dongiovanni<sup>2</sup>, S. Fargion<sup>2</sup>, L. Valenti<sup>2</sup>, P. Magni<sup>1</sup>, A. Corsini<sup>1,3</sup>, N. Ferri<sup>4</sup>, M. Ruscica<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Medico Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, UO Medicina Interna 1B, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano; <sup>3</sup>Multimedica IRCCS, Milano; <sup>4</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova

**Introduzione.** Il tessuto adiposo è un organo endocrino che secreta molecole attive, le adipochine. Quest'ultime, in una condizione di accumulo di grasso viscerale, potrebbero risultare dannose per il sistema cardiovascolare. Scopo del presente lavoro è stato valutare alcuni dei meccanismi molecolari alla base delle vie di segnalazione delle adipochine (leptina e resistina) e dell'espressione della proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9), principale regolatore del recettore delle lipoproteine a bassa densità.

**Materiali.** Cellule di epatocarcinoma umano HepG2; silenziamento genico (siRNA); qPCR; Western Blot; saggio della luciferasi per lo studio del promotore di PCSK9; ELISA.

**Risultati.** Nelle cellule HepG2, il trattamento di 48 ore con leptina e resistina ha determinato un aumento (i) dell'espressione genica di PCSK9 rispettivamente del 195% e del 250%, e (ii) dell'attività del promotore di PCSK9 (leptina: +26%; resistina: +20%); quest'ultimo effetto è mediato principalmente dal coinvolgimento dell'elemento responsivo agli steroli (SRE). Al contrario, una mutazione della sequenza di HNF-1 non ha modificato l'effetto delle adipochine sull'attività luciferasica. Per questi esperimenti il trattamento con simvastatina (20  $\mu$ M) è stato utilizzato come controllo positivo. La leptina ha aumentato il rilascio di PCSK9 nel medium cellulare (+15%). Dal punto di vista clinico, è stata dimostrata un'associazione positiva tra i livelli circolanti di leptina e quelli di PCSK9 ( $p=0,03$ ). La relazione tra adipochine, espressione di PCSK9 e coinvolgimento di STAT3, un importante modulatore della risposta infiammatoria, è stata confermata dal silenziamento di STAT3, che ha ridotto l'espressione genica di PCSK9 mediata da leptina e resistina. Tali adipochine aumentano anche l'espressione genica dell'apolipoproteina (apo)B e della proteina microsomiale di trasporto dei trigliceridi (MTP): leptina (in entrambi i casi circa 60%) e resistina (in entrambi i casi +50%). Queste attivazioni sono dipendenti da PCSK9, come dimostrato silenziando PCSK9. Infatti, un incremento e una riduzione significativa di apoB e MTP sono stati trovati, rispettivamente, in risposta alla sovra-espressione e al silenziamento di PCSK9.

**Conclusioni.** Esiste una relazione tra l'espressione di PCSK9 e le adipochine leptina e resistina. Le basi molecolari di tale rapporto richiedono il coinvolgimento della via di segnalazione di STAT3 e l'attivazione della sequenza SRE a livello del promotore di PCSK9.

## IL SILENZIAMENTO DELLE ISTONE DEACETILASI 3 AMPLIFICA IL PROGRAMMA DI DIFFERENZIAMENTO ADIPOCITARIO

D. Cricri, R. Longo, A. Ferrari, N. Mitro, D. Caruso; E. De Fabiani, M. Crestani  
*Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari - Laboratorio "G. Gallì" di Biochimica e Biologia Molecolare del Metabolismo-Spettrometria di Massa. Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano*

**Introduzione.** L'obesità è una condizione caratterizzata da eccessivo accumulo di massa adiposa che determina aumento ponderale patologico. Tale condizione si associa all'insorgenza di complicazioni quali insulino resistenza e diabete di tipo 2, arteriosclerosi, ipertensione e disturbi cardiovascolari. Le istone deacetilasi (HDAC) esercitano un ruolo determinante nella regolazione epigenetica del differenziamento e del metabolismo lipidico nel tessuto adiposo. L'utilizzo di MS275, inibitore selettivo delle HDAC di classe I, aumenta il metabolismo ossidativo nel tessuto adiposo potenziandone la funzionalità e promuove il browning, sia in cellule mesenchimali C3H/10T1/2 indotte al differenziamento in adipociti che in modelli murini db/db o di obesità indotta dalla dieta (DIO).

**Scopo.** Ad oggi, il meccanismo molecolare attraverso il quale le HDAC di classe I esplicano la loro azione nel tessuto adiposo non è ancora stato approfondito. Questo aspetto, tuttavia, costituisce un primo passo determinante per elucidare le basi del miglioramento fenotipico obeso/insulino resistente osservato in seguito al trattamento con MS275. Pertanto, lo scopo di questa ricerca è stato quello di studiare il ruolo delle HDAC di classe I, valutando gli effetti del silenziamento specifico di HDAC3, una delle HDAC appartenente a questa classe. **PROCEDURE SPERIMENTALI:** HDAC3 è stata silenziata in cellule C3H/10T1/2, successivamente differenziate in adipociti. Per generare il modello knock-down è stato utilizzato un vettore adenovirale contenente shRNA in grado di bersagliare HDAC3.

**Risultati.** Il knock-down di HDAC3 presenta gli effetti dell'inibizione biochimica con MS275. L'espressione genica di Pparg e Ppara, regolatori principali del differenziamento adipocitario, risulta considerevolmente amplificata (Pparg: scramble 0.861±0.02 vs shHDAC3 1.359±0.07; Ppara: scramble 0.724±0.1 vs shHDAC3 2.131±0.2). Aumenta, inoltre, l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico quali Atgl (scramble 0.711±0.07 vs shHDAC3 1.254±0.3), Fabp4 (scramble 0.553±0.07 vs shHDAC3 1.696±0.3), Acly (scramble 0.908±0.1 vs shHDAC3 1.608±0.1) e Pdk4 (scramble 0.565±0.06 vs shHDAC3 1.371±0.1). Infine, anche l'espressione di Ucp1, gene chiave nel processo di browning, risulta amplificata (scramble: 0.498±0.1 vs shHDAC3 2.940±0.01).

**Conclusioni.** Il silenziamento di HDAC3 promuove il differenziamento adipocitario aumentando in maniera significativa l'espressione di geni coinvolti nel differenziamento e nel metabolismo delle cellule adipose. Di conseguenza, gli effetti dell'MS275 potrebbero essere riconducibili all'azione esercitata su HDAC3.

## HIGH FAT DIET SUPPRESSES THE EFFECT OF HDAC3 ABLATION IN HDAC3 KO MICE

R. Silva<sup>1</sup>, A. Ferrari<sup>1</sup>, R. Longo<sup>1</sup>, E. Fiorino<sup>1</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>; G. Cermenati<sup>1</sup>, D. Caruso<sup>1</sup>, E. De Fabiani<sup>1</sup>, S. Hiebert<sup>2</sup>; M. Crestani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*DiSFeB, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;* <sup>2</sup>*Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA*

**Background.** Easily accessible high-calorie food and sedentary way of life drive to the pandemic of obesity and overweight. Among others, atherosclerosis and cardiovascular diseases are consequences of pathological accumulation of dysfunctional adipose tissue characteristic of obesity. In the last few years, white adipose tissue (WAT) browning (i.e. the development of brown-like adipocytes in WAT) has been investigated as one of the promising therapeutic strategy against obesity. Previously, we showed that HDACs regulate patterns of the expression of genes involved in metabolism in diet-induced obese mice. Recently, we demonstrated that adipose-specific Hdac3 KO mice (H3atKO) displayed a strong metabolic rewiring of lipid metabolism, when feeding low fat diet.

**Aim of this study.** Investigate whether adipose tissue specific ablation of Hdac3 is effective in preventing or attenuating diet-induced obesity.

**Methods.** We generated a H3atKO by Cre-lox technology, which were fed for 24 weeks with an obesogenic high fat diet (HFD), along with the floxed mice. Analysis of the regulatory pathways by gene expression, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and metabolomics was performed.

**Results.** No differences neither in body weight gain (45.38±1.54 vs 47.40±1.38) nor in glucose tolerance (60827±2773 vs 55857±2825) were found. Gene expression analysis showed no significant changes in the expression of genes involved in glucose and lipid metabolism such as Pdk4 (1±0.42 vs 1.05±0.31) and Atgl (1±0.55 vs 2.39±0.41), respectively. Moreover, in contrast to mice fed normal diet, no significant remodeling of chromatin (H3K27 acetylation) in specific regions regulating Pparg (19.06±3.17 vs 26.39±8.68), Ucp1 (1.99±0.58 vs 1.60±0.15) and Ppara (1.42±0.27 vs 2.95±0.75) was observed in mice fed HFD. Accordingly, no differences in terms of metabolome were found. Moreover, the expression of adipocyte markers such as Pparg (3.76±0.19 vs 1.55±0.2) and other key genes upregulated by HDAC3 silencing, such as Ucp1 (33.79±10.5 vs 3.59±1.62) and Pdk4 (6.78±0.49 vs 2.33±0.2), were reduced in presence of a PPARα antagonist, suggesting that the effects of HFD are mediated, at least in part, by PPARα.

**Conclusions.** The reprogramming of lipid metabolism characteristic of H3atKO mice fed normal diet is disrupted upon high fat feeding, showing an important role of the diet in the acquisition of the H3atKO mice phenotype. Furthermore, data obtained with a PPARα antagonist indicate a central role of this nuclear receptor in the metabolic rewiring consequent to HDAC3 KO or silencing.

## LE LIPOPROTEINE AD ALTA DENSITÀ INIBISCONO LO STRESS OSSIDATIVO INDOTTO DALLA PROLIFERAZIONE CELLULARE NEL TUMORE PROSTATICO

E. Giorgio<sup>1</sup>, M. Ruscica<sup>2</sup>, M. Botta<sup>2</sup>, N. Ferri<sup>3</sup>, C. Macchi<sup>2</sup>, G. Franceschini<sup>4</sup>, P. Magni<sup>2</sup>, L. Calabresi<sup>1</sup>, M. Gomaschi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Centro Enrica Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;  
<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova; <sup>4</sup>Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Università degli Studi di Milano

Recenti evidenze suggeriscono che lo stress ossidativo può giocare un ruolo importante nella patogenesi e nella progressione del tumore alla prostata. I livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono elevati nelle cellule tumorali prostatiche in modo proporzionale all'aggressività del fenotipo. Poiché le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono note anche per la loro attività antiossidante, è stata testata la loro capacità di ridurre i livelli di ROS in linee cellulari di epitelio prostatico tumorale e il conseguente impatto sulla proliferazione cellulare.

Le HDL riducono in modo significativo sia lo stress ossidativo basale sia quello indotto da uno stimolo pro-ossidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in linee di epitelio prostatico normale, o tumorale androgeno-dipendente e androgeno-indipendente. Tale effetto non è dovuto all'attivazione del recettore degli androgeni, del recettore scavenger BI e del trasportatore ATP binding cassette G1. Inoltre, le HDL sono in grado di annullare l'aumento della proliferazione cellulare indotto dall'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poiché prevengono la transizione del ciclo cellulare dalla fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> alla fase G<sub>2</sub>/M. HDL sintetiche contenenti apoA-I e fosfatidilcolina, ad oggi in fase di sviluppo clinico come agenti anti-aterosclerotici, mantengono la capacità delle HDL di inibire la produzione di ROS nelle cellule di tumore prostatico.

Quindi l'attività antiossidante delle HDL limita la proliferazione cellulare indotta dai ROS in entrambe le linee di tumore prostatico, supportando il possibile ruolo delle HDL contro la progressione del tumore prostatico.

## IMPATTO DEL RECETTORE DELLE LDL NELLA DIFFERENZIAZIONE E FUNZIONALITÀ DEI LINFOCITI T

A. Moregola<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, D. Coe<sup>2</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>, F. Marelli-Berg<sup>2</sup>, G.D. Norata<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi di Milano;  
<sup>2</sup>William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University, Londra, UK;  
<sup>3</sup>IRCCS Multimedica, Milano

**Scopo.** L'espansione dei linfociti T effector memory (Tem) è correlata alla comparsa e progressione della patologia aterosclerotica. Scopo di questo lavoro è stato investigare il ruolo del recettore delle LDL nelle risposte immunometaboliche associate al differenziamento e funzionalità dei linfociti T.

**Metodi.** Fenotipizzazione e analisi dell'espressione genica delle sottopopolazioni linfocitarie e loro caratterizzazione funzionale *in vitro* e *in vivo*.

**Risultati.** La mancanza del recettore delle LDL non impatta la distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie quali Tem, Tcm, Tn in condizioni basali. *In vitro*, dopo attivazione tramite antiCD3/antiCD28, la mancanza di recettore delle LDL limita la proliferazione dei subsets delle cellule T CD8+. La stimolazione di cellule T con splenociti allogeneici mostra una ridotta proliferazione delle CD8+ prive di recettore delle LDL, associata ad una riduzione della produzione di IFN $\gamma$  ( $p < 0.01$ ).

La risposta antigene-specifica dopo vaccinazione con ovalbumina, mostra che le cellule T CD8+ prive di recettore delle LDL presentano una ridotta proliferazione rispetto a quelle del WT ( $p < 0.01$ ), oltre ad una ridotta produzione di IFN $\gamma$ , IL13 e perforina ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ).

Per valutare se la diminuita proliferazione fosse una conseguenza di un ridotto apporto di colesterolo, fondamentale per supportare l'espansione delle cellule T, abbiamo fatto un'analisi dell'espressione di geni legati alla sintesi di colesterolo e un'analisi di lipidomica. Nelle cellule T CD3+ prive di recettore delle LDL risulta aumentato HMGCoA-R e diminuita l'espressione di ABCA1 e ABCG1, un profilo associato ad un aumento degli intermedi del colesterolo quale il desmosterolo. Questi dati suggeriscono che le cellule T cercano di compensare il ridotto uptake di colesterolo favorendone la biosintesi. Parallelamente un'alterazione nel metabolismo del colesterolo può portare ad un signaling difettivo del TCR, infatti nelle cellule T CD3+ prive di recettore delle LDL la fosforilazione di Akt è risultata ridotta dopo stimolazione con antiCD3/antiCD28.

**Conclusioni.** Il recettore delle LDL svolge un ruolo importante nelle risposte immunometaboliche linfocitarie.

## PROPRIETÀ VASOPROTETTIVE DELLE HDL DI SOGGETTI CON DEFICIT GENETICO DI LCAT

O. Alice<sup>1</sup>, G. Monica<sup>1</sup>, S. Castelnuovo<sup>2</sup>, S. Simonelli<sup>1</sup>, C. Pavanello<sup>1</sup>; G. Balzarotti<sup>1</sup>, M. Arca<sup>3</sup>, A. Di Costanzo<sup>3</sup>, T. Sampietro<sup>4</sup>, G. Vaudo<sup>5</sup>; D. Baldassarre<sup>6</sup>, F. Veglia<sup>6</sup>, G. Franceschini<sup>1</sup>, L. Calabresi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Centro Dislipidemie, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Interna e Specialità mediche, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"; <sup>4</sup>Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Pisa; <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Perugia; <sup>6</sup>Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano

Il deficit genetico di LCAT è caratterizzato da livelli plasmatici di colesterolo HDL decisamente ridotti, ma nonostante il profilo lipidico potenzialmente pro-aterogeno, i portatori non vanno incontro ad eventi cardiovascolari prematuri.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare le proprietà vasoprotettive delle HDL isolate dai portatori con deficit genetico di LCAT, costituite principalmente da particelle contenenti solo apoA-I (LpA-I), piccole e discoidali mentre le particelle di grandi dimensioni, sferiche e contenenti anche apoA-II (LpA-I:A-II) sono sensibilmente ridotte. Le HDL di portatori e controlli sono state isolate e testate *in vitro* per valutarne le proprietà vasoprotettive.

Le HDL dei portatori sono più efficienti delle HDL dei controlli nel promuovere l'attivazione dell'enzima eNOS con un effetto genodipendente (PTrend = 0.048). Di conseguenza, la produzione di NO indotta dalle HDL dei portatori risulta essere maggiore rispetto a quella promossa dalle HDL dei controlli (1.63±0.24 vs 1.34±0.07, P=0.031). La maggior efficienza delle HDL dei portatori è dovuta alla riduzione di particelle LpA-I:LpA-II, infatti il rilascio di NO risente della composizione apolipoproteica: HDL sintetiche contenenti solo apoA-I promuovono maggiormente la produzione di NO rispetto a particelle contenenti sia apoA-I che apoA-II.

Le HDL dei portatori sono inoltre più efficienti rispetto alle HDL dei controlli nell'inibire l'espressione della molecola di adesione cellulare VCAM-1 (omozigoti, 65.0±8.6%; eterozigoti, 53.1±7.2%; controlli, 44.4±4.1%; PTrend=0.0003).

L'aumentata capacità vasoprotettiva delle HDL evidenziata *in vitro*, si riflette in valori plasmatici di molecole di adesione cellulare e di flow-mediated vasodilation del tutto paragonabili tra controlli e portatori, nonostante in questi ultimi i valori di HDL-C siano estremamente più bassi. I risultati ottenuti suggeriscono che modificare la composizione apolipoproteica delle HDL potrebbe rappresentare un target terapeutico per aumentare la funzionalità di queste lipoproteine.

## CONTRIBUTO DELLE LDL OSSIDATE SUL FENOTIPO DELLA CARDIOMIOPATIA ARITMOGENA

I. Stadiotti<sup>1</sup>, L. Arnaboldi<sup>2</sup>, S. De Metro<sup>2</sup>, A. Granata<sup>2</sup>, A. Scopece<sup>1</sup>, G. Milano<sup>1</sup>, A. Corsini<sup>2</sup>, C. Tondo<sup>2</sup>, G. Pompilio<sup>2</sup>, E. Sommariva<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Unità di Biologia Vascolare e Medicina Rigenerativa, Centro Cardiologico Monzino IRCCS; <sup>2</sup>DISFeB, Università degli Studi di Milano.

La Cardiomiopatia Aritmogena (ACM) è una patologia genetica caratterizzata da aritmie e sostituzione fibro-adiposa ventricolare. Le mutazioni causative (es. nel gene *PKP2*) provocano difetti desmosomali che determinano l'attivazione di PPAR $\gamma$ , il principale regolatore del processo adipogenico che si innesca nelle cellule mesenchimali stromali cardiache (C-MSC). Penetranza ed espressività variabili suggeriscono, però, il coinvolgimento di altri cofattori.

In una casistica di 34 pazienti ACM, abbiamo osservato un aumento dei livelli plasmatici di lipoproteine a bassa densità ossidate (oxLDL), rispetto a controlli sani comparati per sesso, età e fattori di rischio cardiovascolari (290.90±76.31 vs. 122.40±28.73 ng/ml; p=0.04). Confrontando i livelli di oxLDL di pazienti ACM e di loro familiari mutati ma asintomatici, abbiamo ottenuto valori significativamente maggiori nei pazienti ACM (456.50±187.80 vs. 93.81±33.39 ng/ml; p=0.03). Si ipotizza quindi che dislipidemie e stress ossidativo siano cofattori dell'ACM.

Abbiamo osservato maggiore stress ossidativo su tessuto cardiaco di pazienti ACM rispetto a controlli (colorazione malondialdeide 20.26±6.54 volte più intensa; p=0.004). Inoltre, abbiamo dimostrato maggiori livelli di stress ossidativo (n=5; emissione di diclorofluoresceina 5.64±0.80 vs. 3.60±0.36; p=0.03) e una maggiore espressione di PPAR $\gamma$  (2.79±1.32 volte; p=0.04) e di CD36 (3.81±2.40 volte), recettore delle oxLDL, nelle C-MSC ACM rispetto a C-MSC controllo.

Il trattamento con 13HODE, componente delle oxLDL e attivatore di PPAR $\gamma$ , favorisce l'accumulo lipidico in C-MSC ACM (n=10; colorazione Oil Red O 49.20±9.31 vs. 62.42±11.94; p=0.03), mentre l'antiossidante N-acetilcisteina lo inibisce (n=10; colorazione Oil Red O 49.20±9.31 vs. 31.55±6.95; p=0.02). Inoltre, l'accumulo lipidico nelle cellule ACM procede in parallelo all'espressione di CD36 in membrana (n=5; R<sup>2</sup>= 0.93; p=0.03).

I topi *PKP2*<sup>+/-</sup>, modello di ACM, non accumulano adipociti nel cuore, ma le loro C-MSC sono predisposte *in vitro* ad un maggiore accumulo lipidico rispetto ai controlli (n=5; colorazione Oil Red O 102.4±1.26 vs. 2.96±27.33; p=0.007). Poiché i topi presentano bassi livelli di colesterolo, ne abbiamo indotto l'aumento utilizzando una dieta ad alto contenuto di grassi e osservato sostituzione fibro-adiposa *in vivo* (n=7; colorazione Oil Red O 0.47±0.15% in *PKP2*<sup>+/-</sup> vs. 0.11±0.01% in topi wild type; p=0.009).

I dati indicano che le oxLDL siano cofattori di patogenesi. Questo apre nuove prospettive per la prevenzione farmacologica dell'adipogenesi nell'ACM.

## CARATTERIZZAZIONE DEI PAZIENTI PEDIATRICI CON IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE NELLO STUDIO LIPIGEN

M. Casula<sup>1</sup>, A. Plastina<sup>1</sup>, F. Galimberti<sup>1</sup>, M. Arca<sup>2</sup>, M. Averna<sup>3</sup>; S. Bertolini<sup>4</sup>, S. Calandra<sup>5</sup>, A.L. Catapano<sup>1,6</sup>, P. Tarugi<sup>7</sup>; on behalf of the LIPIGEN Group

<sup>1</sup>Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFEB) Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Università di Roma "La Sapienza". Azienda Policlinico Umberto I; <sup>3</sup>Università degli Studi di Palermo A.O.U. Policlinico "P. Giaccone", Palermo; <sup>4</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova; <sup>5</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Metaboliche e Neuroscienze. Università di Modena e Reggio Emilia; <sup>6</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI); <sup>7</sup>Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è un disturbo genetico comune, che implica l'esposizione ad alti livelli di colesterolo LDL (c-LDL) dalla nascita, con aterosclerosi accelerata ed eventi coronarici precoci. La presente analisi descrive le caratteristiche cliniche e genetiche della popolazione pediatrica FH afferente allo studio LIPIGEN (Lipid TransPort Disorders Italian GENetic Network). Lo studio di LIPIGEN raccoglie dati clinici, biochimici e genetici di una popolazione di soggetti FH seguiti dai centri appartenenti al network LIPIGEN, che include centri specializzati nella gestione delle dislipidemie su tutto il territorio nazionale. Tra le informazioni raccolte, rientrano i risultati del sequenziamento di geni candidati.

La coorte LIPIGEN comprende 1145 pazienti pediatrici (<18 anni), di cui il 48,3% maschi. L'età media alla diagnosi era di 9,0 (DS 4,0) anni e il 21,4% dei pazienti era in età prescolare. Il livello medio di c-LDL registrato alla diagnosi era 219,7 (DS 104,0) mg/dL; il 57,8% dei pazienti aveva c-LDL>190 mg/dL, il 26,6% aveva c-LDL>250 mg/dL e il 5,9% aveva c-LDL>325 mg/dL. La presenza di xantomi è stata rilevata solo nel 3,6% dei casi. La storia familiare di malattia coronarica prematura era positiva nel 12,6% dei casi, mentre la prevalenza di ipercolesterolemia tra i membri della famiglia era del 91,5%. La maggior parte dei pazienti è stata sottoposta ad analisi genetica; nell'85,9% di essi è stata individuata una singola variante patogena in eterozigosi a carico del gene del recettore LDL (LDLR). In questi soggetti, il c-LDL medio era 240,1 (DS 87,9) mg/dL e la mediana 231,0 (IQR 192,0-272,0) mg/dL. Sono stati individuati 25 soggetti portatori di due varianti patologiche in eterozigosi al LDLR, con c-LDL che variava tra 155,0 e 1100,2 mg/dL. In 16 soggetti è stata trovata una variante patogena al LDLR in omozigosi: il loro c-LDL variava da 460,6 a 1029,0 mg/dL.

Questa analisi su una popolazione pediatrica con FH mostra una grande variabilità dei livelli di c-LDL e una prevalenza estremamente bassa dei segni clinici classicamente associati alla malattia nei portatori di mutazione. Nella maggior parte dei casi, la diagnosi di FH in età pediatrica presuppone una diagnosi di FH in un parente adulto.

## MODELLI MULTILIVELLO PER LA STIMA DI CURVE IMT STANDARD CHE DEFINISCONO IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE INDIVIDUALE

E. Olmastroni<sup>1</sup>, A. Baragetti<sup>2</sup>, E. Tragni<sup>1</sup>, M. Casula<sup>1</sup>, AL. Catapano<sup>1,3</sup>, per conto del gruppo PLIC

<sup>1</sup>Centro di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; <sup>2</sup>Società Italiana per lo studio della Arteriosclerosi (SISA), Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; <sup>3</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni Milano

**Obiettivo.** Il presente studio ha come obiettivo quello di stimare delle curve standard per lo spessore medio-intimale (IMT) della parete carotidea aggiustando lo sviluppo nel tempo dell'IMT per i principali fattori di rischio cardiovascolare (CV), con lo scopo di fornire uno strumento che possa migliorare la pratica clinica e rendere più efficace la comunicazione del rischio CV dal medico al paziente.

**Metodo e campione.** Tra i soggetti inclusi nello "Studio sulla Progressione delle lesioni intimali carotidee" (studio PLIC), il cambiamento dell'IMT durante il periodo di studio (12 anni) è stato valutato mediante la definizione di curve di crescita individuali utilizzando un modello multilivello lineare a 2 livelli con le misurazioni ripetute (livello 1) nidificate nei soggetti (livello 2). Solo i pazienti che hanno svolto tutte e quattro le visite pianificate sono stati ritenuti idonei per lo studio. Tutti i soggetti con una diagnosi farmacologica di diabete o con un valore mancante delle misurazioni di IMT sono stati esclusi dal campione. Per l'analisi sono stati inclusi complessivamente 1277 individui.

**Risultati.** Sono state stimate le equazioni per l'IMT massimo e medio, modellate sui valori ottenuti dalla media delle misurazioni effettuate sul lato sinistro e destro della carotide e basate sulle caratteristiche della coorte PLIC. Sia l'IMT massimo che medio mostrano un forte aumento lineare dell'IMT medio con l'età. I livelli di colesterolo LDL, il glucosio e la presenza di placca, valutata su tutti i distretti della carotide, sono risultati associati con l'IMT medio in entrambe le curve. Inoltre, è stata osservata un'interazione tra età e sesso sulla crescita dell'IMT medio che indica che i maschi e le femmine mostrano un diverso pattern di crescita.

**Conclusioni.** Le curve stimate, aggiustate per alcuni fattori di rischio CV, offrono uno strumento utile per la valutazione di soggetti asintomatici a rischio intermedio, ma sottolineano anche la necessità di studi per valutare l'effetto della crescita dell'IMT sull'endpoint clinico e quindi il ruolo dell'IMT come marker surrogato di "danno d'organo".

## STUDIO DELLE BASI EPIGENETICHE DELLE MALATTIE METABOLICHE LEGATE ALL'INVECCHIAMENTO IN MODELLI MURINI CON FEGATO UMANIZZATO

C. Peri, M. Zocchi, N. Mitro, D. Caruso, E. De Fabiani, M. Crestani

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

**Introduzione.** Il progetto HUMAN nasce con lo scopo di studiare le principali varianti alleliche associate al rischio di malattie cardiometaboliche attraverso la generazione di modelli murini con fegato umanizzato. La rilevanza funzionale delle varianti alleliche dagli studi GWAS, infatti, non è stata ancora chiarita a causa della mancanza di modelli animali sufficientemente predittivi dell'impatto di questi polimorfismi sul metabolismo umano. I topi umanizzati, con varianti alleliche di protezione o rischio per la patologia, ed esposti a diete a basso o alto contenuto lipidico, vengono caratterizzati fenotipicamente e molecolarmente con approcci omici (epigenoma, trascrittoma, metaboloma, proteoma). I risultati vengono integrati per rilevare differenze dei circuiti di regolazione conseguenti alle diverse varianti alleliche analizzate e per valutare la loro rilevanza nel rischio di sviluppare malattie cardiometaboliche.

**Scopo.** Il nostro lavoro è incentrato sullo studio dell'epigenoma dell'animale valutando la presenza di marcatori istonici tramite immunoprecipitazione della cromatina seguita dal sequenziamento dei frammenti di genoma immunoprecipitato (ChIP-seq).

**Risultati.** In questa fase, lo studio si è concentrato sull'implementazione del protocollo di immunoprecipitazione per ottenere DNA di qualità e quantità sufficienti per il sequenziamento, a partire da tessuto di fegato umanizzato. I marcatori istonici considerati sono: la lisina 4 trimetilata dell'istone H3 (H3K4me3), normalmente presente nelle regioni prossime al punto di inizio di trascrizione di geni attivi, la lisina 27 acetilata dell'istone H3, marcatore di enhancer e promotori attivi. Il protocollo, validato tramite qPCR, ha dimostrato che l'immunoprecipitazione risulta specifica. Gli arricchimenti, valutati su diverse regioni del genoma umano, hanno rivelato valori, per H3K4me3, in un intervallo dal 10 al 20% sul genoma totale mentre, per H3K27ac, i valori di arricchimento sono tra 8 e 14% del genoma totale. I risultati del sequenziamento hanno poi dimostrato che il profilo e la localizzazione dei picchi per H3K27ac si trovano in corrispondenza di enhancer e promotori attivi.

**Conclusioni.** Il protocollo di immunoprecipitazione della cromatina seguito da sequenziamento del DNA genomico si è rivelato idoneo allo studio di marcatori istonici da modelli murini con fegato umanizzato. La metodologia verrà utilizzata per valutare i cambiamenti nei marcatori epigenetici globali in topi con fegato umanizzato recanti varianti alleliche di rischio cardiometabolico e sottoposti a diete a basso o alto contenuto lipidico.

Lo studio integrato permetterà di identificare il meccanismo regolatorio globale che si verifica in individui con predisposizione o protezione per patologie metaboliche.

(Finanziamento Fp7 602757 Human).

## IL RUOLO DELLE RISPOSTE IMMUNITARIE ADATTATIVE NELLA CARDIOMIOPATIA DILATATIVA: MECCANISMO PATOGENETICO E POTENZIALE TERAPEUTICO

M. Kallikourdis<sup>1</sup>, D. Catalucci<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano;

<sup>2</sup>Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rozzano

Lo scompenso cardiaco è una delle principali cause di ospedalizzazione, morbilità e mortalità nel mondo occidentale. Recenti evidenze hanno dimostrato che il sistema immunitario è coinvolto nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca dovuta a sovraccarico di pressione. I dettagli meccanicistici del legame tra l'immunità e scompenso cardiaco, però, non sono ancora sufficientemente descritti. Questo si riflette nel fallimento delle prime sperimentazioni cliniche che hanno tentato di bersagliare citochine infiammatorie come strategia terapeutica per lo scompenso cardiaco. Il nostro progetto ha l'obiettivo di comprendere se il sistema immunitario adattativo (ed in particolare i linfociti T) abbia invece un ruolo determinante nella progressione della patologia. Questa ipotesi nasce da dati ottenuti nel nostro laboratorio che suggeriscono come le funzioni del sistema immunitario adattativo non siano completamente ottimizzate nella protezione dei tessuti, soprattutto in malattie che insorgono in età avanzata.

Gli obiettivi del progetto prevedono quindi una completa ed approfondita caratterizzazione immunologica della patologia cardiaca, considerando il coinvolgimento di mediatori cellulari e solubili, che possono essere nuovi bersagli terapeutici per il trattamento dello scompenso cardiaco. Sfruttando i risultati di quest'analisi, il progetto ha l'ulteriore obiettivo di dimostrare che il sistema immunitario adattativo ha un ruolo determinante nella progressione della malattia. Questo potrebbe essere il primo passo per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. Il progetto, che è tuttora in corso, ha già prodotto dei risultati descritti in un recente lavoro pubblicato sulla rivista ad alto impatto Nature Communications (Kallikourdis et al., 2017).

## INTERAZIONE TRA LA LUNGA PENTRAXINA PTX3 E IL SISTEMA DEL COMPLEMENTO NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AD ASPERGILLUS FUMIGATUS

R. Parente<sup>1</sup>, F. Petroni<sup>1</sup>, M. Stravalaci<sup>2</sup>, R. Porte<sup>2</sup>, M. Sironi<sup>1</sup>, S. Valentino<sup>1</sup>, R. Leone<sup>1</sup>, B. Bottazzi<sup>1</sup>, A. Mantovani<sup>1,2</sup>, A. Inforzato<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano; <sup>2</sup>Humanitas University, Rozzano; <sup>3</sup>Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan, Rozzano

Il fungo opportunistico *Aspergillus fumigatus* (AF) è l'agente eziologico di aspergillosi invasiva, un'infezione pericolosa per individui immunocompromessi. La risposta dell'ospite ad AF è sostenuta principalmente da componenti sia cellulari che umorali dell'immunità innata, inclusi i neutrofilii polimorfonucleati (PMN) e il sistema del complemento. La lunga pentraxina PTX3 è una molecola di riconoscimento del pattern solubile che collabora con il sistema del Complemento e con i neutrofilii e migliora l'opsonofagocitosi e l'uccisione di AF (1).

Una parte del nostro progetto riguarda lo studio del meccanismo molecolare che coinvolge PTX3 e il complemento nella risposta immunitaria ad AF. A questo scopo ci siamo avvalsi di tecniche che prevedono l'uso del citofluorimetro, abbiamo sviluppato particolari sistemi di ELISA, ed elettroforesi.

Abbiamo scoperto che PTX3 inibisce l'interazione di AF con il fattore H (FH, il principale inibitore solubile del Complemento), si ipotizza che questa interazione sia una strategia di evasione immunitaria adottata da AF. Ciò è dovuto alla competizione per i siti comuni di legame sulla parete di AF e viene ricapitolata dal dominio N-terminale di PTX3. Coerentemente con questo, l'attività cofattoriale di FH su AF (taglio proteolitico di C3b in iC3b mediato da fattore I) è inibita da PTX3 e dal suo N-terminale. Inoltre, abbiamo osservato che PTX3 forma un complesso stabile con C3b in modo dipendente da FH, e recluta C3b su AF conidia.

Dato che C3b è un'opsonina prototipica del complemento (riconosciuta dal recettore fagocitico CR1), proponiamo che PTX3 aumenti la deposizione di C3b su AF mediante un nuovo meccanismo dipendente da FH, contrastando così le strategie di fuga del complemento di questo fungo e migliorando la sua fagocitosi da parte dei neutrofilii.

### Riferimenti bibliografici

1. Cunha et al. N Engl J Med. 2014; 370: 421-32.

## PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 (PCSK9) NEL METABOLISMO CARDIACO

L. Da Dalt<sup>1</sup>, G. Balzarotti<sup>1</sup>, M. Audano<sup>1</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>, G.D. Norata<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano, Italia; <sup>2</sup>Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

**Introduzione.** La Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) è una glicoproteina rilasciata in circolo principalmente dal fegato che interagisce e regola l'omeostasi dei recettori della famiglia LDL e CD36.

La mancanza di PCSK9 porta quindi a una ridotta degradazione dei recettori della famiglia dalle LDL, che presenti in numero maggiore nella membrana cellulare, mediano un accumulo di metaboliti tossici (acidi grassi a lunga catena, diacilgliceroli, triacilgliceroli e ceramidi) nei cardiomiociti, portando a lipotossicità cardiaca.

**Scopo:** Lo scopo di questo lavoro è quello di studiare il ruolo di PCSK9 nella fisiologia cardiaca con particolare attenzione al metabolismo mitocondriale ed alla funzionalità cardiaca.

**Metodi.** Analisi di metabolomica e analisi della respirazione mitocondriale su cuori di topi WT, PCSK9 KO e Albuminre-PCSK9 KO condizionale (un modello privo di espressione epatica di PCSK9) a dieta SFD (Standard Fat Diet - 10% grassi) per 20 settimane. Su questi campioni è stata effettuata anche la quantificazione di proteine mitocondriali tramite Western Blot.

**Risultati.** La mancanza di PCSK9 porta ad un accumulo di acidi grassi legati agli shuttle della carnitina (C8; 0,066±0,047 vs 0,195±0,035 e C12; 0,021±0,018 vs 0,11±0,069 pg/ug di proteina, p<0,05), indicando una possibile riduzione della beta-ossidazione. Topi PCSK9 KO e Albcre-PCSK9 KO mostrano ridotti livelli di glucosio 6-P, ribosio-5P e erythrose-4P, associati ad aumentato flusso glicolitico. Un'analisi degli intermedi del ciclo di Krebs ha mostrato riduzione di intermedi negli animali PCSK9 KO (Citrate; 6,111±2,429 vs 3,593±1,103, &#945;-chetoglutarato; 105,205±42,056 vs 59,657±23,939, p<0,05). L'analisi WB dei lisati cellulari dei cuori dei PCSK9 KO ha mostrato una ridotta espressione di proteine chiave della catena di trasporto degli elettroni (complessi 1, 2 e 3), che è risultata associata ad alterato consumo di ossigeno legato alla respirazione cellulare.

**Conclusioni.** I nostri dati suggeriscono che la mancanza di PCSK9 si associa ad uno switch metabolico cardiaco da beta ossidazione a glicolisi e pongono le basi per approfondire il quadro di funzionalità cardiaca nei deficit di PCSK9.

## AGED-RELATED OBESITY AND CHRONIC INFLAMMATION: UNDERSTANDING THE RELEVANCE AND PATHOPHYSIOLOGY OF LACTATE

M. Ruscica<sup>1</sup>, A. Baragetti<sup>1,2</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, C. Macchi<sup>1</sup>, M. Botta<sup>1</sup>, P. Magni<sup>1</sup>, V. Pucino<sup>3</sup>, M. Bombardieri<sup>3</sup>, C. Pitzalis<sup>3</sup>, K. Garlaschelli<sup>2</sup>, A.L. Catapano<sup>1,4</sup>, C. Mauro<sup>3</sup>, G.D. Norata<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo; <sup>3</sup>Barts and The London School of Medicine and Dentistry, William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, London, United Kingdom; <sup>4</sup>IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milan

**Introduzione.** L'obesità e le condizioni metaboliche a esse associate (es; diabete mellito tipo 2) sono caratterizzate da una risposta infiammatoria cronica di basso grado. Le cellule immunitarie, comprendenti macrofagi e linfociti che infiltrano il tessuto adiposo favoriscono l'espansione e l'attivazione del tessuto adiposo. Infatti, i soggetti obesi presentano aumentati livelli circolanti di linfociti T di memoria effettrice, se paragonati ai soggetti sovrappeso e normopeso.

**Scopo.** Il presente progetto si pone l'obiettivo di capire, in un contesto di infiammazione cronica di basso grado, (i) come un pattern metabolico alterato possa influenzare la risposta immunitaria innata e adattata, e (ii) quale sia l'importanza del trasportatore del lattato e dei suoi canali (Slc5a12 and Slc16a1) nell'infiammazione mediata dalle cellule T.

**Risultati.** I canali del lattato Slc5a12 and Slc16a1 sono rispettivamente espressi nei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. La popolazione dello studio PLIC comprendente 2.606 soggetti (42% maschi e 58% donne) è stata genotipizzata rispettivamente per i polimorfismi dei canali del lattato rs995343 (Slc16a1) e rs138192976 (Slc5a12; variante missenso); la frequenza allelica della prima isoforma genica è risultata essere concorde con l'equilibrio di Hardy-Weinberg ( $\chi^2=0.082$ ), mentre non è stato riscontrato nessun individuo portatore dell'allele raro per la seconda variante. Per quanto riguarda il polimorfismo rs995343 (variante intronica), il 41,6% della popolazione presentava una mutazione in eterozigosi per l'allele ancestrale (TC) e il 23,1% in omozigosi (CC). Sussistendo quindi un solido presupposto scientifico, utilizzando un'analisi *in silico* (Genotype-Tissue Expression - GTEx), si è trovato come il canale del lattato Slc16a1 fosse espresso in modo ubiquitario (fibroblasti, ventricolo sinistro, muscolo scheletrico); nel tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo il valore di RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) è  $> \log 5$ . Sempre dall'analisi *in silico* si evince come la presenza dell'allele mutato corrisponda a una maggiore espressione del canale nel tessuto adiposo. In merito allo studio del canale Slc5a12, studi condotti dal partner straniero, hanno evidenziato come l'utilizzo di un anticorpo specifico contro Slc5a12 bloccava la migrazione dei linfociti T mediata dalla stimolazione sia del lattato che della citochina CXCL10.

## L'ISTONE DEACETILASI 3 È UN FRENO MOLECOLARE DEL METABOLISMO CHE SOSTIENE LA TERMOGENESI NEL TESSUTO ADIPOSO BIANCO

R. Longo<sup>1</sup>, A. Ferrari<sup>1,5</sup>, E. Fiorino<sup>1</sup>, R. Silva<sup>1</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>, G. Cermenati<sup>1</sup>, F. Gilardi<sup>2</sup>, B. Desvergne<sup>3</sup>, A. Andolfo<sup>4</sup>, C. Magagnotti<sup>4</sup>, D. Caruso<sup>1</sup>, E. De Fabiani<sup>1</sup>, S.W. Hiebert<sup>2</sup>, M. Crestani<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA; <sup>3</sup>Centre Intégratif de Génomique, Université de Lausanne, Switzerland; <sup>4</sup>ProMiFa, Protein Microsequencing Facility, San Raffaele Scientific Institute, Milano; <sup>5</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, USA

**Introduzione e risultati preliminari.** L'obesità e le complicanze cardiovascolari associate costituiscono un'emergenza socio-sanitaria. Per questa ragione, numerosi studi sono volti a comprendere la fisiologia del tessuto adiposo. Il tessuto adiposo bruno suscita notevole interesse per la sua capacità di bruciare grassi e produrre calore, un processo definito termogenesi. Anche il tessuto adiposo bianco può acquisire questa funzione, in un fenomeno definito "browning", in risposta a specifici stimoli ambientali (es. freddo). In modelli preclinici l'induzione del browning può contrastare l'obesità e le sue complicanze, quindi molte ricerche hanno lo scopo di approfondire lo studio di questi meccanismi per identificare una possibile strategia terapeutica. Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che l'inibizione di istone deacetilasi (HDAC) di classe I, una famiglia di modificatori dell'epigenoma, riduce il peso e migliora la tolleranza al glucosio in topi obesi. Studi *in vitro* hanno dimostrato che HDAC3 è il principale attore di questi effetti.

**Scopo.** Alla luce di queste osservazioni, abbiamo voluto verificare il ruolo della HDAC3 nella fisiologia del tessuto adiposo in un modello murino.

**METODI.** Per studiare il ruolo di HDAC3 nel tessuto adiposo, abbiamo generato una linea murina con delezione di Hdac3 nel tessuto adiposo (H3atKO). Il fenotipo del modello murino è stato determinato mediante analisi di espressione genica con qPCR e RNA-seq, epigenomica (immunoprecipitazione della cromatina) e metabolomica.

**Risultati.** La delezione di Hdac3 causa browning del tessuto adiposo sottocutaneo, che si traduce in una maggiore capacità dei topi H3atKO di mantenere la temperatura corporea in seguito ad esposizione al freddo (temperatura corporea dopo 24 h di esposizione al freddo nei topi WT 34,7±0,30 vs topi H3atKO 35,8±0,21). Analisi del trascrittoma e del metaboloma rivelano l'instaurarsi di un ciclo futile di lipolisi,  $\beta$ -ossidazione e lipogenesi con aumentata espressione di geni importanti per la lipolisi,  $\beta$ -ossidazione (livelli proteici di ACADL 1,0±0,23 in topi WT vs 13,1±1,46 in topi H3atKO) e lipogenesi (livelli di mRNA di Chrebp $\beta$  1,0±0,40 in topi WT vs 6,0±1,98 in topi H3atKO) e, parallelamente, ridotti livelli di acidi grassi ( $\mu$ g palmitato/mg proteine: 109,0±14,3 in topi WT vs 70,3±8,23 in topi H3atKO). Il ciclo futile del metabolismo degli acidi grassi sostiene la termogenesi. Infine, l'ablazione di Hdac3 rimodella selettivamente regioni della cromatina che regolano Pparg, Ppara e Ucp1 (livelli di acetilazione H3K27 di Pparg enhancer 10,4±0,94 in topi WT vs 20,8±2,68 in topi H3atKO).

**Conclusioni.** I nostri risultati rivelano che l'ablazione adiposo-specifica di Hdac3 riprogramma l'espressione genica e il metabolismo a supporto del browning del tessuto adiposo bianco e suggeriscono che HDAC3 svolga un ruolo critico nella fisiologia del tessuto adiposo. Finanziato da FP7 NR-NET PITN-GA-2013-606806 e da CARIPO Foundation 2015-0641.

## RUOLO IMMUNOMETABOLICO DELL'APOLIPOPROTEINA E: FOCUS SUL METABOLISMO DEL COLESTEROLO NELLE CELLULE IMMUNITARIE

F. Bonacina<sup>1</sup>, D. Coe<sup>2</sup>, G. Wang<sup>2</sup>, A. Baragetti<sup>1,3</sup>, K. Garlaschelli<sup>2</sup>, F. Pellegatta<sup>2</sup>, L. Grigore<sup>2</sup>, F. Marelli-Berg<sup>2</sup>, G.D. Norata<sup>1,2,3</sup>, A.L. Catapano<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>William Harvey Research Institute, Queen Mary University, London, UK; <sup>3</sup>Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo; <sup>4</sup>IRCSS Multimedica, Milano

Le malattie cardio-metaboliche sono caratterizzate da una latente attivazione del sistema immunitario che concorre alla progressione e complicazione della patologia. Non è ancora chiaro se questa correlazione sia la conseguenza di un aumento dei lipidi circolanti o di un'alterazione del metabolismo lipidico intracellulare.

Scopo del nostro lavoro è quello di studiare il ruolo di proteine chiave del metabolismo lipidico, come l'apolipoproteina E (apoE), nell'influenzare la risposta immunitaria.

Analisi di citofluorimetria hanno mostrato come topi apoE KO presentino un aumento dei livelli di linfociti ad attività effettrice TEM (CD4+CD44+CD62L-,  $p < 0,05$ ) a livello di milza e linfonodi rispetto a WT. Il confronto della risposta immunitaria *in vivo* tramite un approccio di allotrapianto ha mostrato come gli apoE KO presentino un rigetto più veloce, associato ad un aumento di TEM e alla capacità migratoria dei linfociti verso CXCL10, una chemochina pro-infiammatoria. L'analisi del rigetto in seguito ad allotrapianto, eseguito in topi WT e apoE KO sottoposti a trapianto di midollo osseo da donatori WT o apoE KO, ha rivelato che il fenotipo osservato deriva dalla mancanza di apoE a livello mieloide ( $p < 0,05$ ) e sia indipendente dall'ipercolesterolemia. Tra le cellule di origine mieloide apoE viene espressa da macrofagi e cellule dendritiche (DCs) ma non dai linfociti T e la sua mancanza si associa con un'umentata abilità delle DCs di indurre la proliferazione di linfociti T alloigenici ( $p < 0,01$ ), ma nessuna differenza si osserva nella proliferazione di linfociti T isolati da WT e apoE KO indotta da DCs alloigeniche ( $p = n.s.$ ).

Nell'uomo abbiamo caratterizzato i linfociti CD4+ circolanti tramite citofluorimetria in funzione delle isoforme dell'apolipoproteina E umana in soggetti derivanti dalla popolazione generale (studio PLIC): i portatori dell'isoforma ApoE4, che presentano più alti livelli di colesterolo, hanno livelli significativamente aumentati di TEM rispetto ai portatori dell'isoforma ApoE2 ed E3. Infine, esperimenti di co-cultura tra linfociti CD4+ e DCs derivate da monociti isolati da sangue intero, mostrano un aumento della polarizzazione dei linfociti verso TEM nei carrier dell'isoforma ApoE4.

Complessivamente questi dati suggeriscono che l'apoE derivata dalle DCs svolga un ruolo importante nell'attivazione della risposta immunitaria tramite il suo ruolo di modulatore del metabolismo colesterolo sia a livello sistemico che cellulare.

## MECCANISMI EPIGENETICI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO DURANTE L'INVECCHIAMENTO

V. Petrocelli<sup>1</sup>, F. Greco<sup>1</sup>, F. La Mastra<sup>1</sup>, F. Alberghini<sup>1</sup>, M. Maruyama<sup>2</sup>, S. Casola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IFOM-Istituto FIR di Oncologia Molecolare, Milano;

<sup>2</sup>Dipartimento dei meccanismi di Invecchiamento, Istituto NCGG 7-430, Morioka-cho, Obu, Aichi, Giappone

Il sistema immunitario è deputato alla protezione del nostro organismo da parte di agenti microbici e ambientali a cui siamo quotidianamente esposti. In particolare, i linfociti B svolgono un ruolo essenziale nella neutralizzazione di virus e batteri grazie al loro riconoscimento e alla produzione di anticorpi capaci di prevenire la loro disseminazione nel nostro organismo. Obiettivo primario del nostro studio è comprendere le basi molecolari che determinano la disfunzione sofferta dai linfociti B durante l'invecchiamento. Tali disturbi rappresentano una delle cause principali delle difficoltà dell'anziano di proteggersi da infezioni virali e batteriche, altrimenti innocue, che diventano spesso letali. A tal riguardo, il nostro interesse si è focalizzato su una famiglia di proteine, dette Polycomb deputate alla regolazione dell'espressione genica attraverso la modulazione dello stato di compattazione della cromatina. Studi precedenti hanno ipotizzato un ruolo attivo delle proteine Polycomb nella protezione dell'organismo dall'invecchiamento funzionale di tessuti e organi. Questi studi dimostrano che le proteine Polycomb ritardano l'invecchiamento reprimendo l'espressione di geni associati alla senescenza cellulare. L'espressione delle proteine Polycomb si riduce con l'età, aumentando, di conseguenza, la percentuale di cellule senescenti non-funzionali che si accumulano in organi e tessuti vitali. Le proteine Polycomb sono anche espresse in linfociti B reclutati in risposte immuni dirette contro virus e batteri per la produzione di anticorpi diretti a neutralizzare il patogeno.

Tali risposte si indeboliscono nell'anziano, possibilmente in seguito ad una ridotta funzionalità delle proteine Polycomb. Il presente progetto si pone come obiettivo lo studio, in modelli murini, degli effetti sulla risposta immunitaria mediata da linfociti B, dell'inattivazione funzionale di componenti della famiglia delle proteine Polycomb. Le ricerche mireranno a definire le basi molecolari legate al depotenziamento dei linfociti B in seguito ad inattivazione delle proteine Polycomb e al monitoraggio di una possibile senescenza anticipata della risposta immunitaria mediata da anticorpi legata alla perdita funzionale delle proteine Polycomb. Lo studio verrà completato da esperimenti nel modello murino mirati a verificare l'efficacia di un potenziamento dell'attività delle proteine Polycomb in linfociti B nel ritardare/bloccare l'invecchiamento funzionale del sistema immunitario tipico dell'anziano.

## IL MIDOLLO OSSEO COME ORGANO CHIAVE NELLA SINDROME DELL'ANZIANO FRAGILE

G. Spinetti<sup>1</sup>, R. Vono<sup>2</sup>, E. Sangalli<sup>1</sup>, C. Specchia<sup>1,3</sup>, F. Carnelli<sup>1</sup>, P. Madeddu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gruppo MultiMedica; <sup>2</sup>Fondazione MultiMedica Onlus;

<sup>3</sup>Università di Brescia

Questo studio nasce dall'esigenza di comprendere i determinanti cellulari e molecolari specifici che possano guidare un'applicazione mirata di strategie preventive e curative dell'anziano fragile. La fragilità dell'anziano è una condizione invalidante ancora poco studiata caratterizzata da diminuzione della massa muscolare ed osteo con conseguente riduzione della mobilità e rischio di fratture. La depressione del sistema immuno-neuro-endocrino predispone ad infezioni e declino cognitivo. Il nostro gruppo ha dimostrato che in pazienti diabetici con aterosclerosi periferica la diminuzione e l'alterazione funzionale di cellule staminali CD34+ midollari è associata a vulnerabilità cardiovascolare e mortalità. Dati di letteratura dimostrano che l'attività fisica ripristina la disponibilità/funzionalità di tali cellule. La nostra ipotesi originale è che un deterioramento funzionale del microambiente del midollo osseo, fonte principale di cellule staminali, rappresenti il meccanismo causale della fragilità. Proponiamo quindi di migliorare la fragilità attraverso interventi di riabilitazione. Stiamo quindi conducendo uno studio osservazionale su pazienti con più di 65 anni che si rivolgono alla Ortopedia per arto protesi coxo-femorale articolato in due fasi. Nella prima fase retrospettiva 60 pazienti che erano stati arruolati in uno studio pregresso condotto dal nostro gruppo saranno invitati a partecipare al nuovo studio che analizza la fragilità e la sua associazione tra le conte di progenitori midollari e periferici. Nella seconda fase prospettica sarà arruolata una nuova coorte di pazienti divisa in due gruppi: 1) 36 soggetti che si sottopongono ad intervento di protesi d'anca e 2) 36 soggetti che seguono la terapia di controllo del dolore. La fragilità ed i livelli di cellule rigenerative circolanti saranno misurati al basale e ad 1 anno di follow-up. Solo nel gruppo che si sottopone ad intervento sarà prelevato un campione di midollo osseo per misurare le cellule rigenerative midollari. Questi pazienti andranno incontro a riabilitazione motoria post-intervento il che permetterà di valutare l'effetto dell'attività fisica sulla numerosità di cellule rigenerative e sulla fragilità. Prevediamo di correlare le alterazioni quantitative e funzionali di cellule progenitrici CD34+ nel midollo osseo alla fragilità e di individuare percorsi di intervento riabilitativo al fine di ripristinare la fitness del midollo osseo e dell'intero corpo.

## BPIFB4 E LE SUE ISOFORME: POSSIBILE FATTORE DI RISCHIO GENETICO E NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO PER IL TRATTAMENTO DELLA SINDROME DI FRAGILITÀ

C.C. Spinelli<sup>1</sup>, A. Ferrario<sup>1</sup>, F. Villa<sup>1</sup>, A. Maciag<sup>1</sup>, A. Carrizzo<sup>2</sup>, C. Vecchione<sup>2</sup>, P. Beltrami<sup>3</sup>, A. Puca<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gruppo Multimedita, Milano; <sup>2</sup>Università di Salerno;

<sup>3</sup>Università di Udine

Gli individui longevi sono in grado di ritardare il processo d'invecchiamento e la fragilità associata all'età. L'isoforma LAV (LongevityAssociatedVariant) della proteina BPIFB4 è in grado di attivare eNOS, migliorare la funzione endoteliale, ridurre la pressione sanguigna e stimolare il reclutamento delle cellule progenitrici endoteliali. L'isoforma RV (Rare Variant) invece ha effetti opposti sulla funzionalità vascolare e sulla pressione. Con questo studio ci proponiamo di stabilire una correlazione tra le varie isoforme di BPIFB4 e la sindrome di fragilità: mentre RV-BPIFB4 potrebbe costituire un fattore di rischio genetico per il suo sviluppo, l'espressione di LAV-BPIFB4 potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico in grado di agire sulla capacità di risposta agli stress, la disponibilità e la funzionalità delle cellule staminali, l'alterazione di questi processi è infatti alla base dello sviluppo della sindrome di fragilità.

Gli obiettivi di questo progetto sono:

1. chiarire i meccanismi molecolare attraverso i quali LAV-BPIFB4 esercita i suoi effetti benefici sul sistema vascolare dei topi anziani;
2. definire il ruolo della proteina endogena BPIFB4 e dell'isoforma LAV-BPIFB4 nei processi di self-renewal e differenziamento delle cellule progenitrici endoteliali (EPCs) e delle cellule staminali cardiache (CSCs);
3. esplorare la correlazione tra l'espressione delle varie isoforme di BPIFB4, la disponibilità in circolo di EPC e la progressione della sindrome di fragilità nei modelli di topo e nella popolazione umana di anziani.

Ci aspettiamo che l'isoforma LAV-BPIFB4: moduli l'indice di fragilità nei topi anziani, riducendo i livelli di stress ossidativo e del reticolo endoplasmatico a livello vascolare e aumentando la disponibilità di EPC in circolo; riduca lo stress ossidativo e del reticolo endoplasmatico in modelli cellulari umani di HUVEC e VSMC; moduli la capacità clonogenica e differenziativa delle cellule staminali cardiache umane; sia associata ad una riduzione dell'indice di fragilità e ad un aumento della disponibilità di EPC in circolo nell'uomo. Ci aspettiamo inoltre che l'isoforma RV-BPIFB4 possa essere invece associata ad un incremento dell'indice di fragilità e ad una riduzione del numero di EPC in circolo nell'uomo.

## EFFETTO DI UNA RIDOTTA SINTESI DI ACIDI GRASSI SUI LIVELLI DI STEROIDI NEURO-ATTIVI NEL NERVO SCIATICO

S. Pedretti, R. Spezzano, M. Maldini, M. Audano, S. Giatti, M. Pesaresi, R.C. Melcangi, D. Caruso and N. Mitro  
*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano*

**Introduzione.** La neuropatia periferica è una complicanza del diabete che colpisce i nervi periferici. Questa patologia è caratterizzata da alterazioni dei lipidi che compongono la mielina, modificando così la conduzione dell'impulso nervoso. Abbiamo dimostrato che il diabete, riducendo i livelli di Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c (SREBP-1c), fattore che controlla la sintesi degli acidi grassi, modifica la composizione lipidica della mielina. In ratti diabetici, il trattamento con steroidi neuroattivi (SN), molecole derivanti dal colesterolo con funzione neuroprotettiva, ripristina i livelli di SREBP-1c e la composizione lipidica della mielina, suggerendo un'interazione fra la via di sintesi degli acidi grassi e gli SN. Inoltre, il topo knock-out per SREBP-1c (SREBP-1cKO), sviluppa neuropatia periferica durante l'invecchiamento.

**Scopo.** Valutazione dei livelli di SN nel plasma e nel nervo sciatico di topi maschi SREBP-1cKO a due e a dieci mesi di età per valutare l'eventuale interazione fra la via di sintesi degli acidi grassi e degli SN.

**Materiali e Metodi.** Abbiamo utilizzato cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per valutare i livelli di SN e real-time PCR quantitativa per l'espressione genica.

**Risultati.** A due mesi, nei nervi sciatici di topi SREBP-1cKO, si riscontra un aumento dei livelli di pregnenolone (Wt:  $2,5 \pm 0,49$ ; SREBP-1cKO:  $7,6 \pm 0,3$  pg/mg di tessuto), associati ad una diminuzione di progesterone (Wt:  $2,7 \pm 0,28$ ; SREBP-1cKO:  $0,26 \pm 0,1$  pg/mg di tessuto) e dei suoi metaboliti diidroprogesterone e isopregnenolone. Inoltre, i livelli di testosterone risultano anch'essi aumentati (Wt:  $0,8 \pm 0,2$ ; SREBP-1cKO:  $4,5 \pm 1,3$  pg/mg di tessuto). Questi risultati sono supportati dall'indotta espressione dell'enzima P450scc, che catalizza la prima reazione della steroidogenesi da colesterolo a pregnenolone. A 10 mesi, invece, i livelli di pregnenolone risultano diminuiti (Wt:  $3,5 \pm 0,5$ ; SREBP-1cKO:  $1,8 \pm 0,2$  pg/mg di tessuto) mentre i metaboliti diidroprogesterone, tetraidroprogesterone e isopregnenolone sono aumentati. L'analisi dell'espressione genica a 10 mesi mostra una diminuita espressione di P450scc e un aumento degli enzimi coinvolti nella produzione dei metaboliti. Nel plasma dei topi SREBP-1cKO non si osservano cambiamenti nei livelli di pregnenolone e progesterone rispetto ai controlli suggerendo un effetto localizzato al nervo sciatico.

**Conclusione.** I nostri dati dimostrano un diretto collegamento tra la sintesi degli acidi grassi e i livelli di SN.

## STUDY OF TARGET-INDUCED MICRORNA DEGRADATION AND COMPETING ENDOGENOUS RNA MECHANISM BY CRISP/CAS9 MEDIATED DELETION OF HIGH AFFINITY TARGET SITES

F. Ghini, I. Simeone, C. Rubolino, M.J. Marzi, F. Nicassio  
*Center for genomic science of IIT@SEMM, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Milano*

I miRNA agiscono a livello post-trascrizionale modulando l'espressione di centinaia di geni simultaneamente e in questo modo definiscono l'identità e le proprietà cellulari. L'azione dei miRNA richiede l'interazione, basata su complementarità di sequenza, con i geni target, in regioni definite "elementi di responsabilità al miRNA" (MRE), causando la degradazione del target e/o l'inibizione della sintesi proteica. Questo progetto si focalizza sui meccanismi molecolari che coinvolgono l'interazione dei miRNA con i geni target e ne possono modulare la funzione in fisiologia e patologia.

Recentemente si è iniziato a comprendere che l'interazione miRNA:target può avere effetti bidirezionali (in altri termini, anche i target possono influenzare l'attività dei miRNA). Questo può avvenire tramite almeno due meccanismi: la degradazione (indotta dall'espressione di particolari target) e la competizione (in cui un target in eccesso, detto ceRNA, sequestra il miRNA riducendone l'attività verso gli altri target).

In uno studio precedente abbiamo osservato che i target endogeni ad alta affinità e concentrazione sono fortemente correlati ai miRNA più instabili. Per verificare sperimentalmente questa ipotesi abbiamo adattato una recente tecnologia di manipolazione genomica (CRISPR/Cas9) allo studio del legame miRNA:target. Nel dettaglio, la nostra strategia è finalizzata a rimuovere dal genoma la regione di responsabilità al miRNA in uno specifico target ("MRE-KO"), in modo da valutarne inequivocabilmente il ruolo nella regolazione della stabilità (degradazione) o attività (competizione) del miRNA corrispondente.

Combinando un approccio computazionale e l'analisi di dati di sequenziamento di miRNA e targets in un sistema cellulare modello, abbiamo selezionato una coppia miRNA:target di interesse e generato, tramite CRISPR/Cas9 dei cloni cellulari che portano una delezione bi-allelica del sito di legame al miRNA (cloni "MRE\_KO"). Tramite tecniche ad alta risoluzione (trascrittoma e mirnoma), abbiamo verificato che il miRNA si accumula maggiormente nei cloni MRE\_KO rispetto alle cellule parentali, poiché soggetto a minore degradazione. Inoltre anche l'attività del miRNA risulta incrementata nei cloni MRE\_KO, con una maggiore repressione degli altri target del miRNA.

## ALTERAZIONI DEL PROFILO CARDIO-METABOLICO IN SOGGETTI PORTATORI DELLA MUTAZIONE R46L DEL GENE PCSK9

A. Baragetti<sup>1,2</sup>, V. Zampolieri<sup>1,2</sup>, D. Grejtakova<sup>3</sup>, P. Uboldi<sup>1</sup>, K. Garlaschelli<sup>2</sup>, G. Balzarotti<sup>1</sup>, L. Grigore<sup>2,3</sup>, F. Pellegatta<sup>2,3</sup>, U. Guerrini<sup>1</sup>, G. Pisano<sup>4</sup>, A.L. Fracanzani<sup>4</sup>, S. Fargion<sup>4</sup>, G.D. Norata<sup>1,5</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, Italy; <sup>2</sup>SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan;

<sup>3</sup>IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milan;

<sup>4</sup>Department of Pathophysiology and Transplantation, Ca' Granda Foundation IRCCS Maggiore Policlinico Hospital, Università degli Studi di Milano, Milan; <sup>5</sup>School of Biomedical Sciences, Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, Perth, Western Australia

**Scopo.** PCSK9 interagisce con LDL-R epatico controllando i livelli di colesterolo LDL. Oltre a questo, ulteriori recettori sono suoi targets, tra cui VLDL-R, CD36 e ApoE2R, tutti rilevanti nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TGs) ed espressi in tessuti periferici di interesse metabolico (adiposo e pancreas). Rimane da valutare, *in vivo*, se la riduzione di PCSK9, modificando queste interazioni, possa associarsi ad un aumentato accumulo lipidico ectopico e ad un alterato controllo glicemico.

**Metodi.** Modelli murini PCSK9 KO e la variante umana con perdita di funzione (Loss-of-Function, LoF) PCSK9 R46L sono stati considerati per studiare la riduzione genica di PCSK9.

Abbiamo determinato il profilo lipidico (a digiuno e in fase postprandiale (PP)), la glicemia, l'insulina e sono stati derivati i suoi indici di resistenza (HOMA-IR) e secrezione pancreatica (HOMA-BC). Sono stati quantificati il tessuto adiposo addominale (DEXA), lo spessore del grasso epicardico (EFT) ed è stata valutata la presenza di steatosi epatica.

**Risultati.** i portatori LoF mostravano mediamente -11%, -16%, -19% e -35% nei livelli di LDL-C, ApoB, ApoCIII e PCSK9, ma non differenti livelli di trigliceridi plasmatici a digiuno e in PP, rispetto ai non portatori. Inoltre essi, non erano soltanto più obesi, ma mostravano anche un'aumentata percentuale di adiposità addominale. In aggiunta, la prevalenza di steatosi epatica era due volte maggiore e EFT 2.7 mm più spesso ( $p=0.022$ ) in presenza della mutazione. PCSK9 LoF si associava anche a iperglicemia e ad un ridotto HOMA-BC (8.4 (6.9-10.4) *vs* 10.05 (8.1-11.6) nei non portatori), anche controllando per BMI e adiposo addominale.

Questi dati estendono le evidenze nei topi PCSK9 KO in dieta iperlipidica, i quali accumulavano più tessuto adiposo viscerale rispetto ai PCSK9 WT. Dopo un carico orale di glucosio, i topi PCSK9 KO mostravano maggiori picco glicemico e contenuto di insulina pancreatica, benché la risposta all'insulina fosse simile ai topi PCSK9 WT.

**Conclusioni.** Malgrado il non chiaro effetto sui TGs circolanti, la deficienza genica di PCSK9 si associa ad aumentata adiposità ectopica e ad un alterato controllo glucidico e sintesi di insulina. Ci chiediamo se questo fenotipo si estenda anche al prolungato trattamento farmacologico con anticorpi monoclonali.

## STUDI DI LIPIDOMICA PER L'IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DEL TESSUTO ADIPOSO MIDOLLARE NELL'INVECCHIAMENTO E NEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2. ANALISI DI CAMPIONI FEMORALI UMANI

L. Arnaboldi<sup>1</sup>, S. De Metrio<sup>1</sup>, M.F. Accattatis<sup>1</sup>, A. Granata<sup>1</sup>, D. Maselli<sup>2</sup>, D. Ferland-McCollough<sup>3</sup>, G. Mangialardi<sup>3</sup>, A. Corsini<sup>1</sup>, P. Madeddu<sup>3</sup>, G. Spinetti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Milano, DiSFeB, Milano;

<sup>2</sup>IRCCS Multimedica; <sup>3</sup>University of Bristol, School of Clinical Sciences, Bristol, UK

Entro il 2030 il 20% della popolazione industrializzata avrà almeno 65 anni e svilupperà patologie cardiovascolari, soprattutto a causa del diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e delle sue conseguenze. Recentemente, il tessuto adiposo del midollo spinale (BMAT) è stato oggetto di studi approfonditi, dal momento che la sua massa aumenta con l'età (dal 15 al 70% del tessuto osseo) e siccome le citochine (IL-6; IL-8) e le adipochine (leptina, adiponectina) da esso secrete possono esercitare effetti sistemici, attivando così fenomeni infiammatori ed adipogenici.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro è la comprensione del ruolo di BMAT nell'invecchiamento e nel T2DM, mediante esperimenti di lipidomica su campioni ottenuti da 27 pazienti (9 con T2DM) di età 70±12, sottoposti a sostituzione del femore.

Abbiamo dapprima effettuato un'analisi qualitativa del profilo dei loro acidi grassi totali, senza evidenziare differenze significative nei singoli acidi grassi o tra saturi ed insaturi tra diabetici o controlli.

Al contrario, abbiamo riscontrato un aumento, anche se non significativo, nella massa di trigliceridi (150%) ed esteri del colesterolo (CE) (290%), associato ad un aumento significativo nella massa di C16:1 (in CE) e ad una diminuzione del rapporto saturi/insaturi nei BMAT dei soggetti diabetici rispetto ai controlli. È interessante notare come nel BMAT dei pazienti affetti da T2DM l'aumento dei CE sia controbilanciato da una diminuzione della massa del colesterolo libero (CE/FC +470% *vs* controlli).

Nell'insieme, questi risultati, seppure ottenuti su un numero limitato di campioni, suggeriscono l'esistenza di un'associazione tra T2DM e variazioni lipidiche nel BMAT, facendoci programmare la valutazione dell'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico quali ACAT e lipasi (visto l'alterato rapporto CE/FC riscontrato). Sarà anche interessante valutare l'attività della stearyl-CoA desaturasi-1 (SCD-1), enzima che inserisce doppi legami (desaturazioni) in acidi grassi comuni (C16:0; C18:0), a generare C16:1 e C18:1, dal momento che un aumento di questi ultimi è ritenuto provocare fragilità ossea ed osteoporosi in pazienti affetti da T2DM.

Questi dati preliminari andranno corretti per massa corporea, età, genere, trattamento farmacologico/i e durata del T2DM e correlati con il profilo lipidico/glucidico plasmatico, per comprendere i meccanismi alla base della patologia ed identificare nuovi trattamenti farmacologici antidiabetici.

## ANOMALIE LIPIDICHE RESIDUE IN PAZIENTI IN TERAPIA CON STATINE: LO STUDIO TREAT

A. Plastina<sup>1</sup>, E. Olmastroni<sup>1</sup>, M. Casula<sup>1</sup>, M. Arca<sup>2</sup>, P. Cavallo Perin<sup>3</sup>, P. Perrone Filardi<sup>4</sup>, A. Zambon<sup>5</sup>, A.L. Catapano<sup>1,6</sup>, M. Averna<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze farmacologiche e biomolecolari, Università di Milano, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Sapienza Università di Roma, Roma; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Torino; <sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli; <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova, Padova; <sup>6</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto San Giovanni, Milano; <sup>7</sup>Università degli Studi di Palermo A.O.U. Policlinico "P. Giaccone", Palermo

I pazienti in trattamento con statine, nonostante il raggiungimento di bassi livelli plasmatici di colesterolo LDL (c-LDL), rimangono esposti ad un elevato rischio di incorrere in eventi cardiovascolari maggiori. Questo sembrerebbe essere dovuto ad anomalie persistenti dei valori di colesterolo HDL (c-HDL) e trigliceridi (TG). Obiettivo primario di questo studio è quello di valutare la prevalenza e la tipologia di anomalie lipidiche residue in pazienti in terapia con statine da almeno 2 anni.

Lo studio TREAT (observationalretrospectivesTudy on lipidabnoRmalitiEs in pTatients on sTatintherapy) è uno studio osservazionale, multicentrico e retrospettivo. I dati sono stati raccolti dalle cartelle cliniche di pazienti visitati in 9 ambulatori specialistici di diabetologia, lipidologia e cardiologia tra il 2013 e il 2015 e includono dati demografici e sullo stile di vita, dati clinici sul profilo lipidico e sulla condizione medica generale del paziente. I target lipidici sono stati definiti sulla base delle linee guida della European Society of Cardiology in funzione del rischio cardiovascolare individuale.

La coorte comprendeva un totale di 1216 pazienti di cui il 73,7% presentava anomalie di almeno uno dei parametri lipidici considerati; in particolare, questa percentuale era il 71,8% tra i pazienti delle cardiologie, il 85,2% tra quelli delle diabetologie e il 67,4% tra quelli delle lipidologie. Complessivamente, il 58,9%, il 22,6% e il 25,6% dei pazienti non erano a target rispettivamente per i valori di c-LDL, c-HDL e TG; tra i pazienti a target per i valori di c-LDL (39.75), il 22,8 e il 24,0% non raggiungeva i valori target per c-HDL e TG, rispettivamente. L'analisi della frequenza dei soggetti a target per l'intero profilo lipidico e la frequenza dei soggetti non a target per uno, due o tre dei parametri considerati (LDL, HDL, TG) in funzione del rischio CV ha evidenziato che i pazienti a rischio CV più elevato sono quelli più soggetti ad anomalie del profilo lipidico rispetto ai pazienti con rischio CV minore.

Il presente studio evidenzia delle criticità nella gestione globale del profilo lipidico; è necessario sensibilizzare i professionisti sanitari sull'importanza della valutazione del profilo lipidico individuale completo, in quanto, in presenza di anomalie, il rischio di incorrere in eventi cardiovascolari risulta maggiore.

## ANALISI DEL TRASCRITTOMA IN SINGOLE PIASTRINE DI SOGGETTI SANI E PAZIENTI CAD

C. Zara<sup>1</sup>, R. D'alessandro<sup>1</sup>, M. Chiesa<sup>1</sup>, M. Brambilla<sup>1</sup>, E. Tremoli<sup>1</sup>, M. Camera<sup>1,2</sup>

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

**Introduzione.** Le piastrine, pur essendo prive di nucleo, contengono numerosi RNA messaggeri (mRNA) derivanti dai megacariociti. Oltre alla loro funzione primaria nell'emostasi, le piastrine prendono parte anche nell'infiammazione, immunità e angiogenesi. È plausibile che le differenti funzioni siano svolte da specifiche sottopopolazioni piastriniche distinte per caratteristiche morfologiche, proteomiche e trascrittomiche che possono variare in condizioni patologiche. Alcuni studi hanno evidenziato come le piastrine di pazienti con STEMI abbiano un trascrittoma differente rispetto ai controlli sani. Queste analisi, eseguite sull'intera popolazione piastrinica, non consentono tuttavia di caratterizzare le diverse sottopopolazioni. Sulla base di queste evidenze, per verificare se si potessero identificare sottopopolazioni piastriniche analizzando il trascrittoma, è stata utilizzata la tecnologia Smartflare, che permette di rilevare in citofluorimetria la presenza di mRNA nelle singole cellule.

**Metodo.** Dopo aver ottimizzato la tecnologia Smartflare per ottenere un'internalizzazione delle sonde in una percentuale maggiore al 90% di piastrine, è stata valutata l'espressione di 50 mRNA coinvolti nell'emostasi (n = 25) e nell'infiammazione (n = 25) nelle singole piastrine isolate da 20 soggetti sani (HS) (35± 10anni) e 20 pazienti STEMI (62±15anni). La fluorescenza emessa dalle sonde in seguito al riconoscimento dell'mRNA bersaglio è stata analizzata attraverso l'utilizzo dell'ImageStream.

**Risultati.** Nei soggetti sani la maggior parte dei trascritti coinvolti nell'emostasi (n=13) sono espressi in oltre il 70% delle piastrine e sono distribuiti in maniera omogenea tra piastrine piccole e grandi; solo 6 trascritti sono presenti in una percentuale tra il 30-60% di piastrine. Degli mRNA associati all'infiammazione, 14 sono presenti in una ridotta percentuale di piastrine (30-60%) mentre 8 trascritti sono espressi nella maggior parte delle piastrine (>70%).

Nei pazienti STEMI aumenta significativamente la percentuale delle piastrine esprimenti IL-10 e COX-1, i quali si localizzano soprattutto nelle piastrine di dimensioni minori nei pazienti; gli mRNA del preTF e TF sono invece presenti in una percentuale ridotta di piastrine.

Analizzando l'espressione dei singoli mRNA risulta significativamente ridotta quella relativa al CXCR4, preTF e TF negli STEMI rispetto ai controlli sani.

**Conclusioni.** I risultati evidenziano, per la prima volta, una differente distribuzione ed espressione degli mRNA coinvolti nell'emostasi e nell'infiammazione all'interno della popolazione piastrinica. Questo potrebbe essere il risultato di meccanismi che agiscono sia a livello centrale, sui megacariociti nel midollo osseo, sia a livello periferico direttamente sulle piastrine circolanti.

## ZC3H10 CONTROLLA L'ATTIVITÀ MITOCONDRIALE *IN VITRO* ED *IN VIVO*

M. Audano<sup>1</sup>, S. Pedretti<sup>1</sup>, S. de Pretis<sup>2</sup>, M. Pelizzola<sup>2</sup>, L. Grigore<sup>3,4</sup>, K. Garlaschelli<sup>4</sup>, A. Baragetti<sup>1,4</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>, G.D. Norata<sup>1,4,5</sup>, M. Crestani<sup>1</sup>, D. Caruso<sup>1</sup>, E. Saez<sup>6</sup>, E. De Fabiani<sup>1</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (Disfeb), Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>2</sup>Center for Genomic Science of IIT@SEMM, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Milano; <sup>3</sup>IRCCS MultiMedica, Milano; <sup>4</sup>SISA Centre, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo; <sup>5</sup>School of Biomedical Sciences, Curtin Health Innovation Research Institute, Faculty of Health Science, Curtin University, Perth, Western Australia; <sup>6</sup>Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA

**Introduzione.** È largamente noto come disfunzioni mitocondriali siano responsabili di alcune disordini metabolici, come ad esempio insulino resistenza, diabete ed obesità. Analisi precedentemente svolte nel nostro laboratorio hanno individuato un nuovo regolatore mitocondriale denominato Zinc Finger CCCH-type containing 10 (Zc3h10). Zc3h10 è in grado di regolare l'omeostasi del ferro e della cardiolipine, due componenti fondamentali per il corretto funzionamento mitocondriale. Inoltre, è stata osservata la presenza di una mutazione a singolo nucleotide (SNP, rs61732294) nella regione codificante di tale proteina.

**Scopo.** Caratterizzare soggetti umani omozigoti per la mutazione per individuare l'eventuale associazione di Zc3h10 con la disfunzionalità mitocondriale *in vivo*.

**Metodi.** A questo scopo abbiamo condotto analisi biochimiche, metabolomiche e genomiche in cellule circolanti prelevate da vena antecubitale di soggetti partecipanti allo studio PLIC (Progressione della Lesione Intimale Carotidea, Ospedale Bassini, Milano).

**Risultati.** Lo screening genomico ha rilevato la presenza in omozigosi della mutazione rs61732294 in 4 pazienti su 1594 (0.25%). Tale mutazione causala sostituzione amminoacidica tirosina (Y)/cisteina (C) in posizione 105 della proteina matura. I soggetti omozigoti sono caratterizzati dal significativo aumento del BMI (Y105=26.98+4.19 Kg/m<sup>2</sup>, Y105C=27.07+4.28 Kg/m<sup>2</sup>, C105=34.39+3.19 Kg/m<sup>2</sup>; p<0.05 vs Y105, p<0.05 vs Y105C), del rapporto circonferenza vita/fianchi (Y105=0.871+0.078, Y105C=0.879+0.078, C105=0.950+0.087; p<0.05 vs Y105, p<0.05 vs Y105C) e della percentuale di massa grassa corporea (Y105=36.0+7.7%, Y105C=36.7+7.6%, C105=40.7+2.4%; p<0.05 vs Y105, p<0.05 vs Y105C). I portatori omozigoti mostrano iperglicemia a digiuno (Y105=97 (91-105) mg/dL, Y105C=97 (90-106) mg/dL, C105=120+18 mg/dL; p<0.05 vs Y105, p<0.05 vs Y105C) ed ipertrigliceridemia (Y105=90.00 (66.00-121.00) mg/dL, Y105C=95.00 (70.00-130.00) mg/dL, C105=175.33+84.00 mg/dL; p<0.05 vs Y105).

Saggi di validazione *in vitro* dimostrano che l'isoforma mutata di Zc3h10 porta alla perdita della sua attività regolatoria mitocondriale, dato confermato anche in cellule mononucleate del sangue isolate da soggetti controllo e mutati.

## RISCHIO DI EVENTI CARDIOVASCOLARI ASSOCIATO ALL'USO DI INIBITORI DI POMPA PROTONICA NELLA POPOLAZIONE LOMBARDA

F. Galimberti<sup>1</sup>, M. Casula<sup>1</sup>, F. Mozzanica<sup>1</sup>, E. Tragni<sup>1</sup>, G. Corrao<sup>2</sup>, L. Scotti<sup>2</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>

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

Il presente studio aveva lo scopo di valutare il rischio di ospedalizzazione per eventi cardio/cerebrovascolari in una coorte di utilizzatori incidenti di inibitori di pompa protonica (PPI).

È stato condotto uno studio caso-controllo innestato, selezionando nel database amministrativo del Servizio Sanitario della Lombardia gli assistiti dai 18 ai 70 anni aventi almeno una prescrizione di PPI tra il 01/01/2003 e il 31/12/2007. L'osservazione si estendeva dalla data indice (data di prima prescrizione) all'evento, a morte o trasferimento, o a fine follow-up (31/12/2010). Sono stati esclusi i pazienti con terapia antitrombotica od ospedalizzazione per evento cardio/cerebrovascolare nei 3 anni precedenti la data indice, o con follow-up inferiore a 6mesi. Ciascun caso, identificato da un'ospedalizzazione per evento cardio/cerebrovascolare di natura non emorragica, è stato appaiato con al massimo 5 controlli, per sesso, età e data indice. L'esposizione è stata valutata come recency dell'ultima prescrizione prima dell'evento (definendo utilizzatori current, recent e past) e come numero di giorni coperti da terapia (in base alla dose giornaliera definita). Mediante un modello di regressione logistica, è stato determinato il rischio associato all'esposizione.

Nella coorte sono stati identificati 20.036 casi e 100.180 controlli (maschi 64,5%; età media 58,9 anni). I casi presentavano prevalenze più alte di diabete, ipertensione e ipercolesterolemia; in entrambi i gruppi i farmaci più utilizzati erano esomeprazolo, omeprazolo e lansoprazolo. Dall'analisi aggiustata di regressione multivariata, il rischio di eventi risultava significativamente maggiore per gli utilizzatori current (odds ratio [OR] 1,557; IC95% 1,498-1,618) e recent (OR 1,087; 1,031-1,146) rispetto ai past. Tale risultato è stato confermato dall'analisi stratificata per eventi cardiovascolari (current: OR 1,632; 1,556-1,712) e cerebrovascolari (current: OR 1,436; 1,345-1,532). Il rischio aumentava in presenza di comorbilità e rimaneva alto anche per un'esposizione minore di 14 giorni. La valutazione dei singoli PPI non ha evidenziato differenze statisticamente significative.

Questo studio mostra come l'esposizione più recente e ad un numero relativamente basso di dosi di PPI sia associata ad un aumentato rischio d'incorrere in eventi cardio/cerebrovascolari. Questo potrebbe mettere in discussione il vantaggioso rapporto beneficio/rischio tradizionalmente attribuito ai PPI; ulteriori studi sono necessari per verificare tali evidenze e per chiarire un possibile meccanismo d'azione.