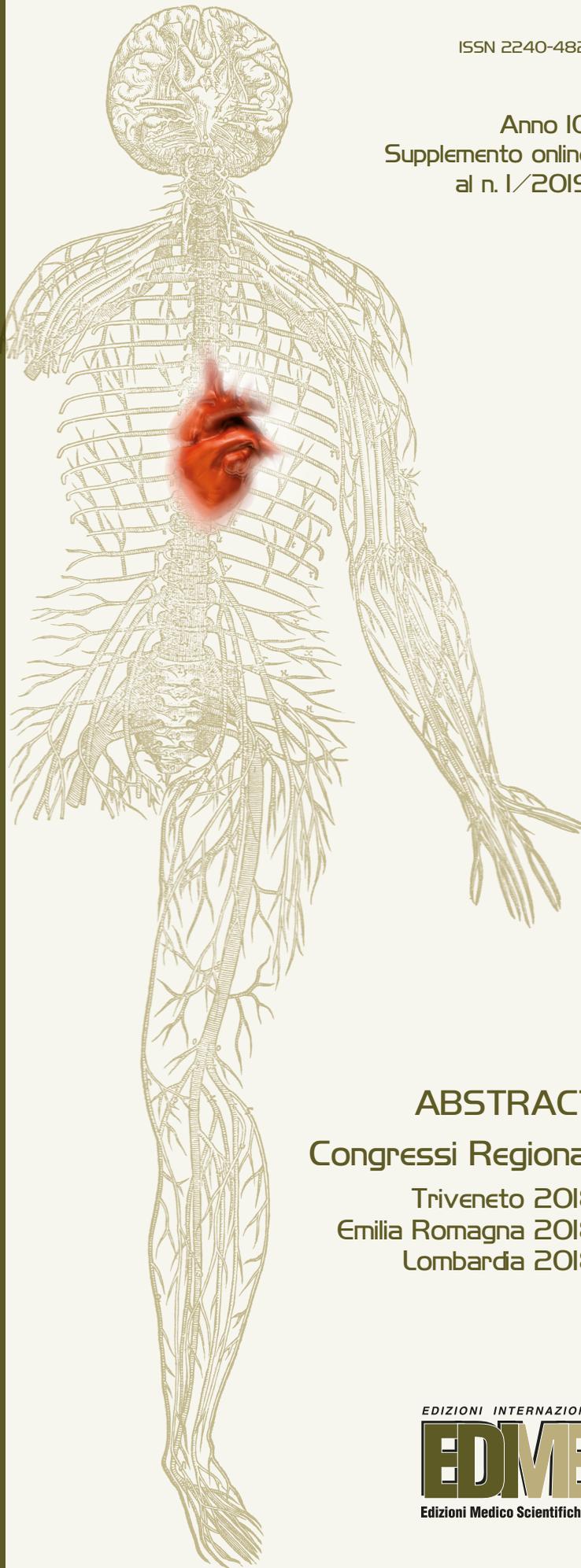


ISSN 2240-4821

Anno 10
Supplemento online
al n. 1/2019



ABSTRACT

Congressi Regionali

Triveneto 2018

Emilia Romagna 2018

Lombardia 2018

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI

SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELLA ATEROSCLEROSI (SISA)

XIX Congresso della Sezione Triveneto

L'ATEROSCLEROSI: UN MONDO IN CONTINUA EVOLUZIONE RAZIONALE

Padova, Sabato 26 maggio 2018, Sala Auditorium Orto Botanico

Il XIX Congresso della Sezione Triveneto della Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (S.I.S.A.), che è svolto il giorno Sabato 26 maggio 2018 a Padova, ha dedicato i suoi lavori all'Aterosclerosi come un mondo in continua evoluzione. Nella prima sessione ci si è focalizzati sull'approccio globale all'aterosclerosi, si è discusso il ruolo della nutrizione nella prevenzione cardiovascolare, dei nutraceutici nel paziente metabolico, dell'impiego della lomitapide nelle gravi ipercolesterolemie e non solo, dei nuovi dati dell'ezetimibe nel diabete e del ruolo dei nuovi farmaci ipoglicemizzanti nella prevenzione cardiovascolare. Un Simposio congiunto SISA - ANMCO - ARCA, preceduto da una lettura su colesterolo e linee guida, è stato dedicato agli inibitori di PCSK9, evolocumab vs alirocumab, dagli studi clinici alla pratica clinica. In particolare sono stati presentati i risultati dei recentissimi studi clinici Fourier e Odissey Outcomes sulla prevenzione cardiovascolare, è stato affrontato lo spinoso problema dell'intolleranza alle statine e condivisi dei risultati dell'esperienza clinica con gli Ac anti PCSK9. In un Simposio congiunto SISA - SIAPAV, preceduto da una lettura sulla storia dell'aterosclerosi, sono state illustrate luci e ombre nel trattamento dell'aterosclerosi: come affrontare la stenosi carotidea asintomatica, le novità riguardanti la terapia dell'ipertensione arteriosa, la gestione della terapia anticoagulante nel paziente fragile e gli effetti pleiotropici del trattamento con aferesi lipoproteica. Infine una tavola rotonda, preceduta da una lettura sull'approccio terapeutico avanzato e personalizzato nella prevenzione degli eventi cardiovascolari, ha offerto un ampio aggiornamento sul trattamento della cardiopatia ischemica dalla prevenzione alla riabilitazione, con discussione finale con un medico di medicina generale. In particolare è stato illustrato il percorso diagnostico nel paziente con dolore toracico, sono state affrontate le scelte terapeutiche nel paziente con sindrome coronarica acuta e post sindrome coronarica acuta e trattata la riabilitazione cardiologica nella cardiopatia ischemica. Particolare rilevanza è stata data alle comunicazioni orali dei giovani della società.

COMUNICAZIONI ORALI

L'ARTERIOSCLEROSI NELLA BELLE ÉPOQUE: UNA PROSPETTIVA ITALIANA

A. Cozza

Medicina Umanistica, Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Università degli Studi di Padova

Il periodo storico noto come *Belle Époque*, convenzionalmente posto tra la fine della guerra franco-prussiana e lo scoppio della prima guerra mondiale, si caratterizzò per una marcata fiducia e un rinnovato slancio nei progressi della scienza e della tecnica che tra Ottocento e Novecento si andavano sempre più attestando in Europa e negli Stati Uniti. Le scienze mediche ricevettero, in tal senso, un impulso particolarmente fecondo che si realizzò, solo a titolo d'esempio, nell'introduzione dei raggi X per la radiodiagnostica, negli sviluppi della batteriologia e della sieroterapia, nella scoperta dei gruppi sanguigni, nella diffusa commercializzazione dell'acido salicilico acetilato, nelle tecniche di confezionamento delle suture vascolari, nella maggior comprensione fisiopatologica di molte malattie, in una semeiotica sempre più accurata e precisa. Molte specialità mediche vennero ad assumere una connotazione che fu preambolo del loro attuale paradigma scientifico. In questo contesto si possono intravedere i semi fecondi della contemporanea *Medicina cardiovascolare*, di cui intendiamo qui esporre, sinteticamente, alcune considerazioni dell'epoca sul ruolo dell'*arteriosclerosi* nella patologia cardiovascolare, così come riportate dalla manualistica medica italiana del primo Novecento, rivolta ai medici pratici.

L'arteriosclerosi, patologia di interesse sistemico, era definita come "una degenerazione dell'endotelio e trasformazione calcarea delle arterie" (Mariani). La rigidità che ne sarebbe derivata avrebbe indotto un minor afflusso di sangue agli organi alterando il funzionamento di quest'ultimi (Fornaseri). Nelle arterie di grosso calibro, a seguito dell'oblitterazione dei *vasa vasorum*, si sarebbe instaurato un processo di "trasformazione connettiva", che a poco a poco avrebbe determinato una *placca* aggettante nel lume dell'arteria. Le placche sarebbero poi incorse in un processo di "disfacimento", di "degenerazione grassa", ovvero si sarebbe formato un "ateroma" che avrebbe a sua volta determinato un "ascesso ateromatoso", che rompendosi avrebbe lasciato una "ulcera ateromatosa". Questa ulcera sarebbe stata il centro di deposizioni di sali di calcio che avrebbero formato "piastre dure, pietrose". Tali lesioni, considerate di grave danno all'organismo, avrebbero potuto ostruire, frammentandosi, segmenti arteriosi a valle o costituire un punto di formazione di un coagulo sanguigno, che sarebbe potuto anch'esso embolizzare (Fornaseri). Il processo arteriosclerotico, che avrebbe potuto colpire il cuore, era considerato nient'altro che "un episodio [particolare ndr.] dell'arteriosclerosi generale" (Fornaseri).

Il cuore sarebbe potuto quindi andare in contro a "due forme morbose", non mutualmente escludibili: la "sclerosi del cuore" e "l'angina di petto" (Fornaseri). Le principali cause di arteriosclerosi erano individuate nell'ipertensione, nell'artrite, nella sifilide, nell'assunzione di alcune sostanze come il tabacco, l'alcol, il piombo, le *ptomaine alimentari* e gli *eccessi di tavola*, ma anche nell'azione delle tossine batteriche, nei *veleni della fatica*, nei *dispiaceri*, nel *sovrachio lavoro*, nei disturbi di stomaco e nell'età avanzata (Mariani; Fornaseri). Esisteva, inoltre, anche "certamente un elemento personale, forse di natura ereditaria, che predispone alle lesioni arteriose" (Fornaseri). La terapia contro l'arteriosclerosi prevedeva una *cura profilattica* che mirava a combattere le cause di arteriosclerosi attraverso "cure igieniche e dietetiche atte a favorire il ricambio, idroterapia, massaggio ginnastica, sport". Se il paziente avesse pre-

sentato sclerosi conclamata delle arterie, il medico avrebbe dovuto adoperarsi al fine "di non aumentare l'autointossicazione dovuta all'alterazione del rene, e di diminuire la pressione arteriosa". A tal proposito si consigliava quindi una *dieta lattea* e alcuni trattamenti antiipertensivi (tra cui il *cardiotonico Testa*) e di decalcificazione (*siero inorganico di Trunecek*). Infine si poteva ricorrere ad un *trattamento fisico*, molto in voga all'epoca, consistente nell'applicazione di *correnti alternate ad alta frequenza* (Mariani).

Bibliografia

- Fornaseri G. Il cuore: suoi mali e sue cure, Hoepli, Milano. 1914; 228, 229, 231, 232.
 Mariani F. Compendio di Medicina Interna e Terapia razionale, F. Vallardi, Milano. 1908; 249-251
 Marson P, Zanchin G., Stefanutti C. Una breve riflessione storica sulla teoria infiammatoria dell'aterosclerosi. *Reumatismo*. 2004; 56: 215-219.

L'ESTRATTO DI FOGLIE DI MORUS ALBA, COMPONENTE DI LOPIGLIK, RIDUCE L'ESPRESSIONE DI PCSK9 IN CELLULE HEPG2

M.G. Lupo¹, R. Marin², D. Vianello², A. Zamboni², N. Ferri¹

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco; ²Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova, Padova

La Proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) svolge un ruolo chiave nella regolazione dei livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C). Il trattamento di pazienti dislipidemici con LopiGLIK® (Akademy Pharma) - una combinazione nutracutiva innovativa a base di riso rosso fermentato (RYR), estratto secco di radice di *Berberis aristata* (BRE) ed estratto secco di foglie di *Morus alba* (MLE) -, sebbene abbia ridotto i livelli di LDL-C, non ha alterato i livelli plasmatici di PCSK9.

Nel presente studio si sono valutati gli effetti di questi tre componenti, singolarmente o in combinazione, sull'espressione di PCSK9 in cellule HepG2.

Come atteso, RYR (50µg/ml) e BRE (40µg/ml) esercitano un effetto opposto su PCSK9, rispettivamente un aumento (RYR) ed una diminuzione (BRE) dei suoi livelli di RNAm e proteina, valutati mediante PCR quantitativa, western blot e saggio ELISA. MLE ha invece promosso una riduzione, concentrazione dipendente, dei livelli di RNAm di PCSK9, esercitando un effetto massimo alla concentrazione di 1mg/ml (-54.8%±0.07%). A tale concentrazione si è osservata anche una diminuzione dell'espressione proteica di PCSK9 e della sua secrezione nel terreno di coltura (-43.8%±23.6%). Sebbene si sia osservata una riduzione dei livelli di RNAm, MLE non ha variato l'attività del promotore di PCSK9, suggerendo un'azione a livello posttrascrizionale.

La combinazione dei tre componenti di LopiGLIK (RYR, BRE e MLE) ha ridotto i livelli di RNAm (-77.3%±7.8%), di espressione e secrezione proteica (rispettivamente -34% e -74.4%±15.0%) e dell'attività del promotore di PCSK9 (-67.4%±7.5%).

L'analisi degli effetti di RYR, BRE e MLE è stata estesa anche alla valutazione della captazione di LDL. Come previsto, RYR e BRE hanno aumentato questo parametro, rispettivamente di 1.65 e 1.42 volte. Per contro, MLE lo ha diminuito del 53.3%±20.2% e la combinazione RYR, BRE e MLE ha portato ad un aumento di 1.9 volte.

In conclusione, i risultati di questo studio dimostrano un effetto inatteso dell'estratto di foglie di *Morus alba* di inibizione di PCSK9 mediante un meccanismo posttrascrizionale. Questo effetto potrebbe contribuire agli effetti ipocolesterolemizzanti di LopiGLIK® esercitati da RYR e BRE.

IL PIROFOSFATO È UN POTENTE INIBITORE DELLA CALCIFICAZIONE VASCOLARE E PUÒ ESSERE UTILIZZATO PER LO SVILUPPO DI MATRICI RESISTENTI ALLA MINERALIZZAZIONE ECTOPICA

E. Bertacco¹, E. Faggin¹, L. Iop², M. Dettin³, P. Pauletto¹, M. Rattazzi¹

¹Dipartimento di Medicina - DIMED, Università degli Studi di Padova;

²Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Università degli Studi di Padova;

³Dipartimento di Ingegneria Industriale, Università degli Studi di Padova

Background. Studi precedenti hanno mostrato che la differenziazione pro-calcifica delle cellule interstiziali valvolari aortiche si accompagna a ridotta produzione di pirofosfato (PPi), un potente inibitore della calcificazione.

Scopo dello Studio. Definire le proprietà anti-calcifiche di diversi composti polifosfati e sviluppare matrici vascolari/valvolari resistenti alla calcificazione.

Metodi. È stato sviluppato un modello *in vitro* di calcificazione indotta da alte concentrazioni di siero (FSB50%). Matrici di collagene di tipo I sono state trattate per 12 giorni con FBS50% addizionato con diverse concentrazioni di PPi, nucleotidi (ATP, ADP, AMP), alendronato, acido mevalonico5-PPi e farnesil-PPi. La calcificazione è stata quantificata mediante dosaggio colorimetrico e colorazioni istologiche (VonKossa). Lo stesso approccio è stato utilizzato per valutare le proprietà anti-calcifiche dei diversi composti su valvole aortiche porcine decellularizzate, pericardio bovino decellularizzato e bioprotesi valvolari aortiche commerciali. È stata inoltre sviluppata una tecnica di ingegneria tissutale per legare covalentemente l'alendronato e l'acido mevalonico5-PPi alla matrice collagene.

Risultati. Il PPi è in grado di inibire, in maniera dose-dipendente, la calcificazione indotta da siero in matrici di collagene di tipo I ($p < 0,001$). La stessa capacità di inibizione è stata osservata per l'ATP, l'ADP, l'acido mevalonico 5-PPi, il farnesil-PPi e l'alendronato ($p < 0,001$ per tutti i composti). Nessun effetto è stato osservato per l'AMP (composto privo di PPi). Gli stessi effetti di inibizione sono stati ottenuti testando i precedenti composti su lembi valvolari porcini decellularizzati, pericardio bovino decellularizzato e bioprotesi commerciali.

Successivamente Alendronato e l'acido-mevalonico5-PPi sono stati ancorati covalentemente ad una matrice collagene di tipo I. Entrambi i trattamenti delle matrici si sono dimostrati efficaci nell'inibire la deposizione di calcio ($p < 0,05$).

Conclusioni. Il PPi isolato o contenuto all'interno di diversi composti polifosfati è in grado di inibire la mineralizzazione della matrice extracellulare. Tale proprietà può essere sfruttata per lo sviluppo di matrici biologiche, sia valvolari che vascolari in grado di resistere ai processi di calcificazione.

ASSOCIATION BETWEEN PLASMA CERAMIDE CONCENTRATIONS AND INDUCIBLE MYOCARDIAL ISCHEMIA IN PATIENTS WITH ESTABLISHED OR SUSPECTED CORONARY ARTERY DISEASE REFERRED FOR CLINICALLY INDICATED STRESS MYOCARDIAL PERFUSION SCINTIGRAPHY

A. Mantovani¹, S. Bonapace², G. Lunardi³, M. Salgarello⁴, C. Dugo², G. Canali², S. Gori³, E. Barbieri², G. Targher¹

¹Section of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Department of Medicine, University and Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata of Verona;

²Division of Cardiology, "Sacro Cuore-Don Calabria" Hospital, Negrar (VR);

³Division of Medical Oncology, "Sacro Cuore-Don Calabria" Hospital, Negrar (VR);

⁴Division of Nuclear Medicine, "Sacro Cuore-Don Calabria" Hospital, Negrar (VR)

Background. Recent studies suggested that distinct plasma ceramides independently predict major adverse cardiovascular events in patients with established or suspected coronary artery disease (CAD). No information is currently available about the association between plasma ceramides and stress-induced ischemia on myocardial perfusion scintigraphy (MPS) in patients with established or suspected CAD.

Methods. We measured six previously identified high-risk plasma ceramide molecules [Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0), Cer(d18:1/24:0), and Cer(d18:1/24:1)] in 167 patients with established or suspected CAD, who consecutively underwent either exercise or dipyridamole MPS for various clinical reasons. Plasma ceramide concentrations were measured by a targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay both at baseline and after stress MPS.

Results. Overall, 78 (46.7%) patients had any inducible myocardial perfusion defect on stress MPS. Of the six measured ceramides, basal Cer(d18:1/24:1) showed the strongest association with the presence of myocardial perfusion defects in univariate analysis (unadjusted odds ratio 1.48 per 1-SD increment, 95% confidence interval 1.08-2.04, $p=0.016$). Notably, after adjustment for age, sex, smoking, hypertension, dyslipidemia, diabetes, past history of CAD, and type of stress MPS testing, all measured ceramides, except for Cer(d18:1/24:0), were positively and independently associated with the presence of inducible myocardial ischemia.

Conclusions. Distinct plasma ceramides are significant and independent predictors of stress-induced myocardial perfusion defects in high-risk patients with established or suspected CAD referred for clinically indicated MPS. Further studies are needed to examine whether distinct plasma ceramides could be a useful therapeutic target for treatment and management of CAD.

DIAGNOSI CLINICA E MOLECOLARE DELLE DISLIPIDEMIE PRIMITIVE: ESPERIENZA VERONESE DELLO STUDIO LIPIGEN

M. Fraccaro, V. Sanga, A. Altomari, C. Maneschi, E. Bonora, M.G. Zenti
UOC Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona

Introduzione. Le dislipidemie primitive sono malattie ereditarie, causate da mutazioni nei geni coinvolti nel trasporto o nel metabolismo dei lipidi. Una delle forme più frequenti è l'ipercolesterolemia familiare (FH), un disordine genetico in cui gli elevati valori di colesterolo LDL (LDL-C) sono responsabili di malattia cardiovascolare prematura. La diagnosi molecolare dei difetti genetici, alla base delle forme di FH clinicamente diagnosticate, permette di realizzare interventi più incisivi per la prevenzione e la cura delle malattie cardiovascolari ad essa correlate.

Lo studio LIPIGEN è uno studio osservazionale multicentrico, progettato per creare un *database* nazionale di pazienti con FH o altre forme di dislipidemie familiari, per approfondirne le caratteristiche fenotipiche e genetiche e per contribuire a sensibilizzare i professionisti della sanità e la popolazione.

Obiettivo. Scopo del nostro studio è stato valutare l'attuale gestione dei pazienti con diagnosi clinica di ipercolesterolemia familiare, focalizzando l'età in cui viene fatta la diagnosi e la prescrizione di farmaci ipolipemizzanti. Abbiamo inoltre verificato la predittività del DLCN (*Dutch Lipid Clinic Network*) score nella valutazione ambulatoriale rispetto alla conferma con l'analisi genetica.

Metodi. Sono stati raccolti dati anamnestici, biochimici e genetici di una coorte di soggetti ambulatoriali con dislipidemia primitiva secondo un protocollo di studio approvato dal Comitato Etico delle province di Verona e Rovigo (225CESC).

Risultati. Sono stati valutati 112 soggetti (44 maschi e 68 femmine), con età media di 47 ± 16 anni (media \pm DS). Solo il 18,7% dei pazienti aveva ricevuto la diagnosi di dislipidemia prima dei 18 anni. Alla prima valutazione ambulatoriale il 42% dei pazienti non era in terapia ipolipemizzante e presentava valori di LDL-C di 231 ± 59 mg/dL, mentre il 58% dei pazienti assumeva farmaci ipolipemizzanti e presentava valori di LDL-C di 134 ± 54 mg/dL. Il DLCN score risultava ≥ 6 (indicativo di diagnosi probabile/certa) nell'85,7% dei pazienti.

L'analisi molecolare per la ricerca di mutazioni nei geni candidati (LDL-R, APOB, PCSK9 e LDL-RAP1) è stata eseguita sull'intero campione. Sono stati individuati 71 portatori di mutazioni in eterozigosi: nel 93% dei casi mutazioni del gene LDL-R; nel 4% mutazioni di APOB. In 1 paziente è stata riscontrata una doppia eterozigosi per mutazioni sia di LDL-R che di APOB; in 3 pazienti una doppia eterozigosi per mutazioni sia di LDL-R che di LDL-RAP1. Un paziente è risultato portatore in eterozigosi di mutazione di LDL-RAP1.

Anche fra i 15 soggetti con *Dutch score* < 6 , sono stati riscontrati portatori di mutazione in eterozigosi (3 pazienti con mutazioni di LDL-R e 1 paziente con mutazione di APOB). 14 soggetti presentavano storia personale di malattia cardiovascolare e, tra questi, 12 sono risultati portatori di mutazione nel gene LDL-R.

Conclusioni. I nostri dati confermano il problema del ritardo diagnostico delle forme genetiche di ipercolesterolemia e il loro frequente sotto-trattamento.

Il *Dutch score* è uno strumento utile per la diagnosi clinica di FH, tuttavia la conferma genetica e il successivo *screening* a cascata, a partire da soggetti portatori di una mutazione causativa, possono favorire interventi precoci nella fase clinicamente silente della malattia al fine di rallentare/procrastinare l'insorgenza delle complicanze cardiovascolari.

CARATTERIZZAZIONE GENETICA, ECOGRAFIA DEI TENDINI ACHILLEI E DUTCH LIPID CLINIC NETWORK SCORE NELL'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

M. Moro, P. Bigolin, P. Scarinzi, M. Biolo, L. Benvegnù, C. Panzavolta, R. Marin, D. Vianello, S. Bertocco, F. Fabris, E. Manzato, L. Previato, A. Zambon, S. Zambon
Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova

Introduzione e Scopi dello Studio. La presenza di xantomi dei tendini di Achille, spesso difficilmente apprezzabili clinicamente, è un reperto suggestivo di Ipercolesterolemia Familiare (FH). L'ecografia viene impiegata per indagare la presenza di xantomi in pazienti affetti da FH. Il nostro studio mira ad individuare le potenziali associazioni intercorrenti tra genotipo, fenotipo clinico e caratteristiche ecografiche dei tendini achillei, valutando il contributo dell'ecografia nell'identificazione degli individui con una mutazione causa di FH.

Soggetti e Metodi. Sono stati analizzati i dati provenienti dallo screening genetico e le caratteristiche cliniche e biochimiche di 116 pazienti (pz) con diagnosi possibile, probabile o certa di FH, in accordo con il Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS); 71 pz sono stati sottoposti ad ecografia bilaterale dei tendini achillei; gli xantomi ecografici sono stati definiti come presenza di uno spessore tendineo $> 6,15$ mm in almeno un tendine e/o presenza di formazioni ipoecogene.

Risultati. 85 pz presentavano mutazione del gene per il recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL), di cui 35 portatori di allele nullo (NA) e 50 di allele difettivo (DEF), mentre in 31 pz non sono state individuate mutazioni per FH (NM). La prevalenza di xantomi e gerontoxon, insieme ai livelli di colesterolo totale e LDL basali sono risultati significativamente maggiori nei soggetti NA rispetto agli altri sottogruppi (LDL: NA vs DEF vs NM $326,5 \pm 97,7$ vs $316,9 \pm 93,9$ vs $211,1 \pm 76,3$ mg/dl; $p < 0,001$ Anova). Lo spessore dei tendini achillei è risultato significativamente diverso tra i tre gruppi ($p < 0,005$) e la prevalenza di xantomi ecografici era del 78,2%, 72,4% e 31,6% nei soggetti portatori di NA, DEF e NM rispettivamente ($p = 0,002$). Nell'ambito dei pz sottoposti ad ecografia dei tendini achillei, tra i 52 pz con mutazioni responsabili di FH 36 pz avevano una diagnosi clinica certa di FH secondo i criteri DLCNS, mentre vi erano 16 pz con diagnosi possibile (5%) o probabile (23%). Di questi 16 pz 1 mostrava xantomi evidenziabili clinicamente mentre 10 presentavano lo xantomia ecografico. Dunque in 9 pz la presenza dello xantomia ecografico veniva misconosciuta all'esame clinico e quindi non considerata ai fini del calcolo del DLCNS.

Conclusioni. La caratterizzazione genotipica funzionale è associata a fenotipi clinici, spessori tendinei e prevalenza di xantomi ecografici diversi. I risultati preliminari di questo studio suggeriscono che l'ecografia dei tendini di Achille potrebbe essere utile nel riclassificare i pazienti con un DLCN score compatibile con diagnosi possibile o probabile.

UN CASO DI ATEROSCLEROSI PRECOCE E IPERCOLESTEROLEMIA POCO RESPONSIVA ALLA TERAPIA: QUANDO SOSPETTARE LA SITOSTEROLEMIA

C. Panzavolta, M. Biolo, P. Bigolin, I. Di Pasquale, P. Scarinzi, L. Benvegnù, A. Bertomoro, E. Duner, S. Ferrari, R. Marin, D. Vianello, S. Bertocco, L. Previato, E. Manzato, A.B. Cefalù¹, M. Averna¹, C. Cortese², A. Zambon, F. Fabris, S. Zambon, M. Fonda³

Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova;

¹Medicina Interna e Dislipidemie Genetiche, Università degli Studi di Palermo; ²Università di Roma "Tor Vergata",

³Università degli Studi di Trieste

Introduzione. La sitosterolemia è un raro disordine del metabolismo lipidico ereditato secondo modalità autosomica recessiva, contraddistinto da elevati livelli plasmatici di steroli vegetali. Le caratteristiche cliniche della sitosterolemia sono lo sviluppo di xantomati, aterosclerosi precoce, artrite, occasionalmente alterazione della funzione epatica e alterazioni ematologiche (stomatocitosi mediterranea/macrotrombocitopenia).

Scopo dello Studio. Analisi di un caso di sitosterolemia manifestatosi con severa ipercolesterolemia, xantomatosi tendinea, aterosclerosi precoce e lieve piastrinopenia.

Risultati. Nel 2017 giungeva alla nostra osservazione un uomo di 57 anni affetto da ipercolesterolemia e macrotrombocitopenia. Anamnesticamente, in relazione alla dislipidemia evidenza di un profilo suggestivo per ipercolesterolemia familiare (FH) per presenza di malattia cardiovascolare precoce (CHD) (a 51 anni triplice by-pass aortocoronarico, sostituzione valvolare aortica e anuloplastica mitralica), presenza di xantelasmi e xantomatosi tendinea, colesterolo totale 320 mg/dl e LDL 260 (DLCNS 12); relativamente ad una diatesi emorragica, segnalati sanguinamenti minori (epistassi in età infantile, ematuria ed ecchimosi post-traumatiche in corso di terapia con cardioaspirina e warfarin per protesi valvolare meccanica), non epatosplenomegalia e agli esami bioumorali Hb 127 g/L, PTS 116 x10.9/L (anisocitosi piastrinica, MPV 14,6 fL) con alterazione degli indici di emolisi compatibili con anemia emolitica meccanica (LAD 332 U/L, aptoglobina ridotta, bilirubina totale e indiretta nella norma e test di Coombs diretto e indiretto negativi), aggregazioni piastriniche ed immunofenotipo nella norma. Lo screening genetico per la ricerca di mutazioni responsabili di FH risultava negativo. Il dosaggio della betasitosterolemia risultata 123,7 ug/ml (v.n. 0,7-7,0), per cui veniva avanzata l'ipotesi diagnostica di sitosterolemia, poi confermata dall'analisi genetica-molecolare per la presenza di una mutazione del gene ABCG8, esone 3,

c.320C/G (p.S107X), in omozigosi. Alla terapia con rosuvastatina veniva associata quella con ezetimibe e restrizioni dietetiche, assistendo alla riduzione della colesterolemia totale (-30,6%) e LDL (-42,4%) con parziale regressione della xantomatosi.

Conclusioni. La sitosterolemia si caratterizza per un fenotipo simile all'FH. Visti il rischio elevato di CHD e la possibile presenza di diatesi emorragica è importante considerare tale patologia nel processo di diagnosi differenziale per poter avviare precocemente il trattamento più appropriato.

LA TERAPIA CON ANTICORPI MONOCLONALI ANTI PCSK9: DATI PRELIMINARI DELL'ESPERIENZA CLINICA VERONESE

V. Sanga, C. Conforti, A. Altomari, D. Travia, E. Bonora, M.G. Zenti UOC Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo, AOUI Verona e Università degli Studi di Verona

Nei pazienti con dislipidemie genetiche e nei pazienti ad alto rischio intolleranti alle statine, l'approccio terapeutico convenzionale con dieta e i comuni farmaci ipolipemizzanti non sempre è in grado di ridurre adeguatamente i livelli di colesterolo LDL. La recente introduzione nella pratica clinica degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 offre l'opportunità di portare questi pazienti a target per una efficace prevenzione cardiovascolare.

Obiettivo. Valutare l'efficacia e la tollerabilità degli inibitori di PCSK9 (PCSK9i) (alirocumab ed evolocumab) nella pratica clinica.

Metodi. Studio osservazionale su 44 pazienti (23M, 21F; età media 64 anni) che da Dicembre 2015 a Marzo 2018 hanno avviato terapia con PCSK9i (in 11 pazienti alicumab 75 mg, in 13 pazienti alicumab 150 mg e in 20 pazienti evolocumab 140 mg) in associazione alla precedente terapia ipolipemizzante. I pazienti sono stati valutati al basale e dopo 3, 6 e 12 mesi dall'avvio del trattamento con PCSK9i. Di questi pazienti, 30 erano provenivano dai nostri ambulatori dedicati alle dislipidemie, 13 erano stati inviati dalla Cardiologia, 1 paziente dalla Medicina Interna.

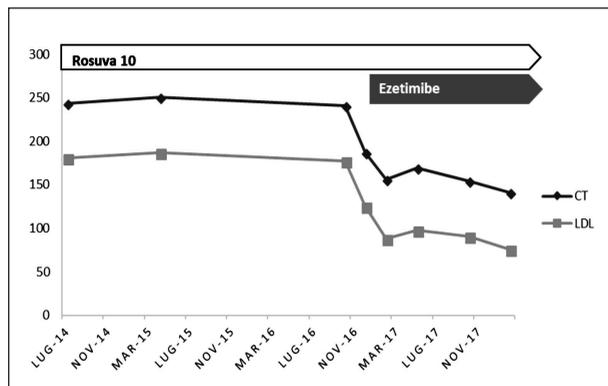
Risultati. Il 43% dei pazienti aveva una forma genetica di ipercolesterolemia confermata dall'analisi molecolare (tutti portatori in eterozigosi di mutazione del gene LDLR). Il 50% era intollerante alle statine. Il 66% era in prevenzione secondaria per cardiopatia ischemica, il 14% dei pazienti era affetto da diabete mellito e il 61% presentava vasculopatia periferica (PAD).

Al basale (N=44) i valori di colesterolo LDL (mediana, range interquartile) erano di 148 [125-182] mg/dl; a 3 mesi (N=33) di 56 [26-83] mg/dl, a 6 mesi (N=24) di 52 [32-71] mg/dl, a 12 mesi (N=14) di 48 [28-106] mg/dl.

Pertanto a 3 mesi il 73% dei pazienti aveva raggiunto il target di LDL-colesterolo, dato che si è mantenuto nei controlli successivi. A 6 mesi la riduzione media del colesterolo LDL era di 85,5 mg/dl rispetto al valore basale, indipendentemente dal PCSK9i utilizzato e dall'intolleranza alle statine.

7 pazienti hanno raggiunto valori di colesterolo LDL fra 15 e 24 mg/dl, e in un solo paziente il colesterolo LDL era inferiore a 15 mg/dl. Un paziente, con valori di colesterolo LDL >300 mg/dl dall'adolescenza, intollerante alle statine, in cui l'analisi genetica non ha documentato mutazioni nei geni candidati (LDLR, ApoB, PCSK9, LDL-RAP1) è risultato non responder ad alicumab. La terapia con PCSK9i è stata ben tollerata in tutti i pazienti.

Conclusioni. La nostra esperienza clinica ha confermato l'efficacia degli inibitori di PCSK9 nel portare i pazienti al target di LDL-colesterolo. Ulteriori studi sono necessari per indagare la ridotta/mancata risposta a questa classe di farmaci in alcuni, rari, pazienti.



DALL'AFERESI LIPOPROTEICA AL TRATTAMENTO CON GLI INIBITORI DI PCSK9: PROFILO LIPIDICO E PROTEINA-C-REATTIVA IN PAZIENTI AD ALTO RISCHIO CARDIOVASCOLARE

A. Altomari¹, M.G. Zenti¹, M.G. Lupo², M. Botta³, M. Ruscica³, E. Bonora¹, N. Ferri²

¹UOC Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona;

²Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova;

³Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

Introduzione. Nei pazienti con malattia cardiovascolare (CV), la formazione della placca aterosclerotica è un processo complesso in cui entrano in gioco alterazioni qualitative e quantitative dei lipidi circolanti e l'attivazione di processi di natura infiammatoria. Fra i markers infiammatori di rischio CV ha ricevuto particolare attenzione la proteina C-reattiva (CRP). Diversi studi infatti hanno messo in evidenza una relazione prognostica tra CRP e le complicanze aterosclerotiche.

Nei pazienti con forme genetiche di ipercolesterolemia, quando la terapia convenzionale con dieta e i comuni farmaci ipolipemizzanti non è in grado di portare i livelli di colesterolo a target, vi è indicazione alla rimozione extracorporea periodica delle lipoproteine aterogene (aferesi lipoproteica) che oltre a ridurre il colesterolo LDL, e molecole pro-infiammatorie, determina un rallentamento/regressione della malattia CV. La recente introduzione nella pratica clinica degli anticorpi monoclonali anti PCSK9 (PCSK9i), ha aperto nuove opportunità di trattamento per i pazienti ad alto rischio, con la possibilità di sospendere l'aferesi lipoproteica (AL). Nonostante sia stato ben dimostrato l'effetto di alirocumab (A) ed evolocumab (E) sul controllo della colesterolemia e degli eventi CV, l'impatto di questi farmaci sul profilo infiammatorio risulta ancora poco indagato.

Scopo. Confrontare il profilo lipidico e i livelli di hs-CRP nel corso dell'ultimo anno di trattamento aferetico (T1 nel periodo A) e dopo almeno 6 mesi dalla sospensione dell'AL e avvio del trattamento con PCSK9i (T2 nel periodo B) in pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH) e/o con Lp(a)iperlipoproteinemia.

Metodi. Studio osservazionale su 9 pazienti (pz) (6 M, 3F, età media 65 aa, range 47-77) con storia di malattia CV, in trattamento cronico con AL (periodo A) che hanno sospeso l'aferesi per passare alla terapia con PCSK9i (periodo B). 4 pz presentavano una Lp(a)iperlipoproteinemia. Nel periodo B, 7 pz sono stati trattati con E 140 mg, 1 pz con A 150 mg, e 1 pz con A 75 mg.

Al T1 e T2 è stato eseguito prelievo per la determinazione del profilo lipidico [c-Tot, c-LDL, c-HDL, trigliceridi, Lp(a)] e CRP ad alta sensibilità (hs-CRP).

Risultati. Effetti dell'AL sul profilo lipidico (periodo A): c-LDL prima e dopo AL (media \pm DS) 138 \pm 32 mg/dl e 46 \pm 16 mg/dl ($p=0.008$) con valori interaferetici di 114 \pm 26 mg/dl; c-HDL prima e dopo AL (media \pm DS) di 45 \pm 17 mg/dl e 38 \pm 13 mg/dl ($p=0.008$); Lp(a) prima e dopo AL (mediana, range interquartile) di 42 [28-80] e 17 [12-36] mg/dl, $p=0.008$.

Effetti dei PCSK9i sul profilo lipidico (periodo B): valori medi di c-LDL a 1, 3, 6 e 12 mesi rispettivamente di 59 \pm 25; 41 \pm 22; 42 \pm 21;

39 \pm 10 mg/dl. Rispetto al periodo A, si è osservato un incremento di c-HDL del 34% e una riduzione significativa di Lp(a) 18 [8-69] mg/dl, $p=0.008$. Confronto degli effetti dell'AL e PCSK9i sulla hsCRP (T1vsT2): hsCRP pre-aferesi 1,5 \pm 1,2 mg/L; post-aferesi 0,6 \pm 0,6 mg/L ($p<0,001$). Al T2: hsCRP 2,11 \pm 1,9 mg/L (T2 vs T1 preaferesi $p=ns$).

Conclusioni. I nostri dati mostrano che, con la transizione dall'AL al trattamento con i PCSK9i, si è ottenuto:

- 1) il raggiungimento e mantenimento del target di cLDL;
- 2) un incremento di cHDL;
- 3) la riduzione di Lp(a), che risulta tuttavia inferiore a quanto ottenuto con l'AL;
- 4) mancato effetto sui livelli di hsCRP, che vengono significativamente ridotti dall'AL. Ulteriori studi sono necessari per valutare gli effetti clinici dei due approcci terapeutici rispetto agli outcome cardiovascolari.

IL RUOLO DELL'ECOGRAFIA TENDINEA NELL'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

P. Scarinzi, M. Biolo, P. Bigolin, M. Moro, L. Benvegnù, C. Panzavolta, R. Marin, D. Vianello, S. Bertocco, F. Fabris, E. Manzato, S. Zambon, L. Previato, A. Zambon
Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova

Introduzione. L'ipercolesterolemia familiare è uno tra i più comuni disordini ereditari di tipo metabolico. I soggetti affetti presentano elevati valori di colesterolemia con complicanze cardiovascolari precoci. Tuttavia il colesterolo in eccesso si accumula anche in altre sedi, oltre al distretto vascolare, manifestandosi come arco corneale lipidico e/o xantomi tendinei.

Obiettivi. Analizzare il valore diagnostico dell'ecografia nell'identificazione degli xantomi tendinei rispetto al solo esame clinico in soggetti con ipercolesterolemia familiare.

Materiali e Metodi. Tra gennaio 2016 e ottobre 2017 sono stati reclutati 101 soggetti con sospetta ipercolesterolemia familiare. Sono stati raccolti l'anamnesi, l'esame obiettivo, il profilo lipidico completo e il Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) di ciascun paziente. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad ecografia tendinea bilaterale volta alla valutazione dello spessore anteroposteriore, dell'ecostruttura e della presenza di formazioni ipocogene all'interno del tendine. Sono stati esclusi dallo studio soggetti con pregresse rotture tendinee.

Risultati. 101 soggetti (63 femmine e 38 maschi) con un'età media di 48,0 \pm 15,5 anni e un DLCNS medio di 10,1 \pm 4,9. Il 10,2% dei soggetti presentava xantomi tendinei apprezzabili all'esame clinico con pattern ecografico compatibile, il 51% dei soggetti presentava invece un pattern ecografico compatibile con xantoma non evidenziabile però all'esame clinico, nel 38% dei soggetti non si evidenziavano xantomi né clinicamente né ecograficamente. Lo spessore tendineo massimo risultava significativamente correlato al colesterolo LDL senza terapia ($r=0,411$; $p<0,001$). Tale associazione si mantiene inoltre all'analisi di regressione logistica multipla nel modello aggiustato per età, sesso e terapia ipolipemizzante (OR 1,020; IC 95% 1,004-1,035; $p=0,012$).

Conclusioni. I risultati di questo lavoro confermano la maggior sensibilità dell'ecografia rispetto all'esame clinico nella ricerca di xantomi tendinei. Tale metodica, associata ad un'accurata anamnesi e ad un esame obiettivo completo, potrebbe condurre ad una diagnosi più precoce di Ipercolesterolemia Familiare.

SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELLA ATEROSCLEROSI (SISA)

XVIII Congresso della Sezione Emilia Romagna

Modena, 29 Settembre 2018

Il Congresso Annuale della SISA Emilia Romagna, si è svolto il 29 settembre a Modena.

Nel Congresso si sono affrontati temi di ricerca attuali e tradizionali per la SISA. In particolare si è parlato della gestione dei fattori di rischio cardiovascolare lipidici, partendo dalla gestione del rischio lipidico (G.B. Vigna), all'intervento sullo stile di vita e sull'utilizzo dei nutraceutici (A. Passaro). Il Prof. Corsini ha discusso sulla necessità della Nota 13, condividendo l'opinione di un'interpretazione della Nota come suggerimento al trattamento. Una sessione è stata dedicata agli inibitori di PCSK9, individuando effetti che vanno oltre la riduzione della colesterolemia (M.P. Adorni); si è verificato l'effetto di questi farmaci in setting di soggetti trattati in un ambulatorio delle dislipidemie (S. D'Addato). Ci sono state due sessioni di comunicazioni orali, una su temi di ricerca di base e una su temi di ricerca clinica. Entrambe sono state introdotte da due relazioni, la prima sugli effetti degli inibitori di SGLT-2 (V. Spigoni) e la seconda sulla predizione del rischio cardiovascolare (M.L. Morieri). Nell'ambito del Congresso si è tenuto il simposio congiunto SISA - SIGG in cui è stato presentato il documento SIPREC 2018 sulla prevenzione cardiovascolare nell'anziano (M. Bertolotti), e sulla corretta prevenzione dell'invecchiamento cognitivo (G. Zuliani). Il Congresso si è concluso ponendo l'accento sul rischio cardiovascolare nei pazienti con HIV (G. Guaraldi) e sulle malattie rare associate ad alterazioni del metabolismo lipidico (F. Carubbi). Al termine dei lavori, sono stati consegnati due premi a giovani ricercatori per la migliore presentazione rispettivamente nell'ambito della ricerca di base e di quella clinica.

CARATTERIZZAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ DELLE HDL E DEI METABOLITI DERIVATI DALLA DIETA NELLA CALCIFICAZIONE DELLA VALVOLA AORTICA

Cinzia Marchi¹, Francesca Zimetti¹, Ilaria Zanotti¹, Duygu Kocyigit², Lale Tokgozoglu², Kadri M. Gurses³, Marcus Stahlman⁴, Jan Boren⁴, Mehmet F. T. Soyali⁵, Hande Canpinar⁶, Dicle Guç⁶, Arzu Saglam Ayhan⁷, Tuncay Hazirolan⁸, Kudret Aytemir², Necla Ozer²
¹Dip. di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università degli Studi di Parma; ²Dep. of Cardiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ³Dep. of Histology and Embryology, Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Aydin, Turkey; ⁴Dep. of Molecular and Clinical Medicine, University of Gothenburg Institute of Medicine, Göteborg, Sweden; ⁵Dep. of Cardiovascular Surgery, Medicana International Ankara Hospital, Ankara, Turkey; ⁶Dep. of Basic Oncology, Hacettepe University Institute of Oncology, Ankara, Turkey; ⁷Dep. of Pathology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ⁸Dep. of Radiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

Obiettivo. La calcificazione della valvola aortica è la più diffusa malattia cardiaca valvolare, la cui patogenesi non è ancora completamente chiara. In questo studio abbiamo indagato la relazione tra capacità delle HDL di promuovere l'efflusso di colesterolo, indice di funzionalità delle stesse e parametro inversamente associato al rischio cardiovascolare, e la severità della calcificazione aortica. Inoltre, abbiamo misurato i livelli di alcuni metaboliti della dieta e derivati dall'attività del microbiota intestinale e valutato la loro relazione con la severità della patologia.

Materiali e Metodi. In questo studio sono stati reclutati soggetti con stenosi aortica calcificata moderata-severa (CAS) (n=60), sclerosi aortica (ASc) (n=49) e soggetti controllo matchati per età e sesso (n=48). La gravità della patologia è stata determinata da esami ecocardiografici, di tomografia computerizzata e istopatologici. La capacità delle HDL di promuovere l'efflusso totale di colesterolo (cholesterol efflux capacity, CEC) è stata valutata mediante una tecnica radioisotopica. I livelli di colina, betaina e di metaboliti derivati dall'attività del microbiota intestinale sono stati misurati tramite cromatografia liquida e spettroscopia di massa.

Risultati. I pazienti con CAS presentano una CEC significativamente più bassa rispetto al gruppo controllo (p=0.011) e al gruppo con ASc (=0.015). Inoltre, la CEC correla negativamente con alcuni parametri prognostici per l'AS, come la velocità di picco aortico (AVmax) (=0.302, p=0.002), il calcium score dell'arteria aortica (AVC) (r= 0.332, p=0.010) e dell'arteria coronaria (CAC) (r=0.355, p=0.005). Un'analisi multivariata ha permesso di evidenziare che la CEC è indipendentemente associata con AVmax (β : -0.419, p=0.005). I pazienti con CAS moderata-severa presentano livelli plasmatici di colina significativamente più elevati rispetto al gruppo controllo (p < 0.001) e al gruppo ASc (p=0.006). I livelli plasmatici di betaina e trimetilammina-N-ossido (TMAO) invece non differiscono tra i gruppi (p>0,05). I quartili più alti di colina plasmatica sono stati anche associati all'AVC (p<0,001), alla deformazione sistolica del ventricolo sinistro (p=0,012) e al calcium score mitralico (MAC) (p=0,013). I livelli plasmatici di colina inoltre correlano negativamente con la CEC delle HDL (r=-0.210, p=0,031).

Conclusione. La funzionalità HDL, misurata come CEC, è indipendentemente associata alla gravità di CAVD. Abbiamo inoltre dimostrato una relazione tra la severità della CAVD e i livelli plasmatici dei metaboliti derivati dalla dieta. Questi risultati suggeriscono che anche la funzionalità delle HDL così come colina e betaina potrebbero rappresentare un nuovo marker di CAVD oltre ai tradizionali fattori di rischio.

ELEVATI LIVELLI PLASMATICI DI SFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P) MIGLIORANO LA FUNZIONE ENDOTELIALE E RIDUCONO L'ATEROSCLEROSI IN MODELLI SPERIMENTALI IN VIVO

F. Potì¹, R. Feuerborn², M. Besser³, R. Burkhardt⁴, G. Weißen-Plenz², U. Ceglarek⁴, M. Simoni⁵, R.L. Proia⁶, H. Freise³, J.-R. Nofer²

¹Dip. di Medicina e Chirurgia, Unità di Neuroscienze, Università di Parma; ²Centro per la Medicina di Laboratorio, Ospedale Universitario di Münster, Germania; ³Dip. di Anestesiologia e Terapia Intensiva, Ospedale Universitario di Münster, Germania; ⁴Istituto di Medicina di Laboratorio, Chimica Clinica e Diagnostica Molecolare, Ospedale Universitario di Lipsia, Germania; ⁵Dip. di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Unità di Endocrinologia, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; ⁶Istituto Nazionale del Diabete e delle Malattie del Rene e del tratto Digestivo, Istituto Nazionale della Salute (NIH), Bethesda, Maryland, Stati Uniti

Obiettivo. La sfingosina-1-fosfato (S1P) è un lisosfingolipide bioattivo, costituente delle lipoproteine ad alta densità (HDL), che esercita numerosi effetti ateroprotettivi in vitro. Tuttavia, i pochi studi sugli effetti anti-aterogeni di S1P in vivo hanno portato a risultati controversi. In questo studio, abbiamo valutato l'influenza di elevati livelli di S1P endogena sullo sviluppo dell'aterosclerosi in topi knock-out per i recettori delle lipoproteine a bassa densità (LDLR^{-/-}).

Metodi e Risultati. I topi LDLR^{-/-} sono stati irradiati sub-letalmente e trapiantati con midollo osseo di topi knock-out per la sfingosina chinasi 2 (SphK2). L'assenza di SphK2 a livello emopoietico nei topi LDLR^{-/-} (SphK2^{-/-}/LDLR^{-/-}) ha prodotto un aumento della concentrazione di S1P negli eritrociti, nel plasma e nelle HDL di circa 1,5-2,0 volte. Successivamente, i topi sono stati nutriti con una dieta di tipo Western per 14 settimane. L'aumento di S1P endogena ha ridotto significativamente la formazione di lesioni aterosclerotiche (circa 50% rispetto al controllo) senza alterare il profilo lipidico plasmatico. Inoltre, nei topi SphK2^{-/-}/LDLR^{-/-} il contenuto di macrofagi nelle lesioni aterosclerotiche e il reclutamento di monociti indotto da lipopolisaccaride batterico (LPS) nella cavità peritoneale erano ridotti. Esperimenti di microscopia intravitale hanno rivelato che l'aumento di S1P endogena era in grado di ridurre l'adesione dei leucociti alla parete capillare e la permeabilità endoteliale alle LDL marcate in fluorescenza. I topi SphK2^{-/-}/LDLR^{-/-} mostravano, inoltre, minore espressione di molecole di adesione (VCAM-1) sia nelle lesioni aterosclerotiche sia nel plasma. Studi in vitro hanno dimostrato ridotta adesione e infiltrazione di monociti su monostri di cellule endoteliali esposti a concentrazioni crescenti di S1P, plasma murino arricchito in S1P o plasma ottenuto da animali SphK2^{-/-}. Inoltre, le cellule endoteliali trattate con S1P risultavano anche meno permeabili a sfere di destrano e LDL marcate in fluorescenza.

Conclusione. I nostri dati indicano che l'innalzamento dei livelli di S1P endogena esercita effetti anti-aterogeni nei topi LDLR^{-/-} attraverso una modulazione favorevole della funzione endoteliale.

SIGNIFICATO CLINICO DELLE DIFFERENZE DI GENERE NELLA SINDROME METABOLICA NEGLI ANZIANI

Y. Grassi, M. Bertolotti, C. Mussi

Unità Operativa di Geriatria, Ospedale Civile di Baggiovara (Modena), Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, AOU di Modena

Obiettivi. La Sindrome Metabolica (MetS) viene definita come un insieme di fattori di rischio che se associati aumentano il rischio di sviluppare Diabete Mellito di tipo 2 e malattie cardiovascolari. Risulta fondamentale comprendere quale sia l'impatto della sindrome sulla popolazione geriatrica e quali siano le principali differenze di genere, sia per quanto riguarda l'incidenza dei vari componenti, sia per l'impatto che essa ha sul rischio cardiovascolare e sulle comorbidità. Questo potrebbe avere conseguenze rilevanti anche sulle opzioni di trattamento, spesso problematiche nella popolazione anziana. Scopo di questo studio è analizzare le differenze di genere, scarsamente studiate in Geriatria, nei pazienti con MetS.

Materiali e Metodi. Sono stati arruolati 1382 pazienti consecutivamente afferenti all'ambulatorio di Cardiogeriatrics (età media $76,99 \pm 6,9$, di cui 56,7% femmine). Da questo gruppo sono stati selezionati i pazienti con Sindrome Metabolica, definita secondo la «*Harmonized Definition*» del 2009. Tutti i pazienti sono stati valutati secondo il protocollo clinico di routine, basato sulla valutazione multidimensionale geriatrica e comprendente: anamnesi clinica e farmacologica, esame obiettivo con particolare attenzione ai valori pressori e ai segni di scompenso cardiaco, parametri antropometrici, valutazione dei sintomi depressivi e delle principali sindromi geriatriche, esami biochimici.

Risultati. La prevalenza della MetS è risultata del 27,8% (27,3% nei maschi e 28,2% nelle femmine); all'analisi multivariata il sesso femminile è risultato un fattore di rischio indipendente per MetS (OR 2,56; $p=0,001$). Il gruppo delle femmine >85 anni ha una prevalenza significativamente maggiore della Sindrome rispetto alla controparte maschile (F=76% vs M=24%; $p<0,001$). Negli uomini con MetS è più frequente l'intolleranza glucidica (M: 32,4% vs F: 23,2%; $p<0,001$) mentre le donne hanno valori maggiormente patologici di circonferenza vita (M:46,9% vs F: 68,6%; $p<0,001$). Il 93,2% della popolazione con MetS è affetta da ipertensione, senza differenze di genere. Le sindromi geriatriche di maggior riscontro nella popolazione femminile con MetS sono: vertigine (M: 22,1% vs F: 37% $p=0,003$) e depressione (M:29,1% vs F: 50,8%; $p<0,001$). Sebbene i maschi con MetS abbiano un maggior rischio di cardiopatia ischemica rispetto all'altro sesso (M:39,3% vs F: 25,3%; $p=0,003$), non esistono differenze significative riguardo il trattamento con farmaci attivi sul sistema cardiovascolare.

Conclusioni. Le principali differenze tra i sessi riguardano le donne molto anziane (elemento che richiama la differenza tra aspettativa di vita e aspettativa di vita in salute), la prevalenza di cardiopatia ischemica (maggiore nell'uomo) e di vertigine (più elevata nella donna); il dato, non giustifica un diverso approccio farmacologico nei riguardi dei due sessi, almeno per quanto riguarda la donna in post-menopausa. È necessario inoltre porre l'attenzione sulla depressione nella donna anziana, soprattutto se affetta da MetS. La mancanza di differenze di genere nella prevalenza del trattamento farmacologico per il rischio cardiovascolare pone l'attenzione sulla consapevolezza crescente della classe medica dell'importanza della prevenzione, anche nella donna.

VALUTAZIONE ECOGRAFICA DEL TENDINE DI ACHILLE NELLA DIAGNOSI DI IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE: UNO STUDIO CASO-CONTROLLO

M. Dall'Agata, O. Ghirardello, M. Bove, A. Colangiulo, E. Giorgini, F. Luciani, U. Politti, F. Ristè, D. Tortola, G.B. Vigna
Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara

Obiettivi. L'ipercolesterolemia familiare (FH) è una malattia metabolica monogenica caratterizzata da un difetto nella capacità cellulare di legare e internalizzare le lipoproteine a bassa densità (LDL) e conseguente ipercolesterolemia e aterosclerosi prematura. Riconosce alcune varianti in rapporto alla modalità di trasmissione e al gene interessato (autosomica dominante: LDLR [forma classica], APOB, PCSK9, STAP1; autosomica recessiva: LDLRAP).

La diagnosi di tale malattia si avvale di dati laboratoristici, clinici, anamnestici e genetici (talora integrati in un punteggio complessivo - es. Dutch Lipid Clinic Network Score [DLS]): tra di essi il ruolo dell'ispessimento tendineo quale marcatore di malattia, in particolare a livello del t. di Achille, si è venuto affermando causa la disponibilità di metodiche non invasive, economiche e di rapida esecuzione a fronte di tempi e costi più elevati relativi all'indagine genetica.

Materiali e Metodi. Abbiamo arruolato 120 soggetti (60 di sesso maschile e 60 di sesso femminile) di età 18 - 70 anni con diagnosi di FH eterozigote, confermata all'analisi genetica, che si sono presentati consecutivamente presso il Centro per le Malattie Metaboliche di Ferrara. Per ciascuno di tali pazienti sono stati individuati un soggetto affetto da ipercolesterolemia poligenica ed un soggetto di controllo normolipemico, confrontabili per età e sesso, analogamente inclusi nello studio. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a valutazione ecografica del tendine di Achille, di cui sono stati misurati lo spessore (a 2 cm dall'inserzione calcaneare) e la presenza di caratteri eco-strutturali propri della xantomatosi.

Risultati. L'ispessimento tendineo determinato ecograficamente, e definito secondo valori soglia età e sesso-specifici, ha mostrato una sensibilità diagnostica pari al 72% e una specificità del 79% nella totalità della popolazione esaminata. La capacità classificativa della metodica, valutata attraverso curve ROC, si è dimostrata discreta (AUC 0.78) quantunque inferiore a quella del DLS (non considerando il punteggio genetico) nella popolazione complessiva. Abbiamo infine considerato l'utilità della metodica ecografica nel sottogruppo di pazienti con score di probabilità clinica intermedio (DLS 4-5): in tali soggetti la valutazione combinata del DLS insieme all'ecografia migliora l'accuratezza diagnostica delle due metodiche separatamente, ottenendo valori di sensibilità 96% e specificità 87% (vs 74% e 60%, rispettivamente, del solo DLS). Il riscontro ecografico di aree focali ipo-aneogene nel contesto di un ispessimento tendineo, riferibili a xantomatosi (ATX), è risultato patognomico di FH (specificità 100%) sebbene non correlato significativamente alla presenza di cardiopatia ischemica precoce (ATX+ 17.9% vs ATX- 9.8%, $p=n.s.$).

Conclusioni. Il nostro studio conferma l'ottima applicabilità e costo-efficacia, rispetto all'indagine genetica, della misurazione ecografica del tendine di Achille nella comune pratica ambulatoriale, soprattutto in quei soggetti in cui la probabilità di FH risulta intermedia con i soli esami laboratoristici e la valutazione clinico-anamnestica.

EFFICACIA E SICUREZZA DELLA TERAPIA CON INIBITORI DI PCSK9: L'ESPERIENZA "REAL LIFE" DEL CENTRO DISLIPIDEMIE DI MODENA

F. Nascimbeni, S. Lugari, A. Mondelli, S. Bursi, G. Onfiani, M. Milazzo, A. Fabbri, E. Pellegrini, F. Carubbi
U.O. di Medicina Interna ad Indirizzo Metabolico, Ospedale Civile, A.O.U. di Modena

Obiettivo. Gli inibitori di PCSK9 (iPCSK9) sono una nuova classe di farmaci in grado di ridurre la colesterolemia LDL in maniera estremamente efficace e sicura nei trial clinici. Questo studio ha lo scopo di valutare il profilo di efficacia e di sicurezza del trattamento con iPCSK9 nel contesto "real life" del Centro Dislipidemie di Modena.

Pazienti e Metodi. Sono stati arruolati consecutivamente tutti i pazienti che hanno iniziato un trattamento con iPCSK9 secondo indicazioni ALFA da Febbraio 2016 a Giugno 2018 e per i quali erano disponibili dati di follow-up. Per ogni paziente sono stati raccolti dati clinico-anamnestici, biochimici e strumentali al tempo basale pre-terapia con iPCSK9 e durante il follow-up in corso di terapia con iPCSK9.

Risultati. 35 pazienti (maschi/femmine 23/12, età 60 [26-76] anni), 17 trattati con evolocumab 140 mg e 18 con aliocumab (11 con 150 mg e 7 con 75 mg), sono stati seguiti per un periodo mediano di follow-up di 20 (6-116) settimane. 26 pazienti avevano una diagnosi clinica di ipercolesterolemia familiare (FH), 25 pazienti erano in prevenzione cardiovascolare (CV) secondaria, 5 pazienti erano intolleranti totali alle statine, 5 pazienti erano affetti da diabete mellito tipo 2 (DMT2). 7 pazienti erano in trattamento lipofaeretic prima di iniziare la terapia con iPCSK9. La terapia con iPCSK9 durante il periodo di follow-up ha determinato una riduzione statisticamente significativa dei valori di colesterolemia LDL (-63 [-77 - -27]%; $p < 0.001$) che ha consentito di raggiungere il target terapeutico nell'83% dei pazienti (29/35). Sono state inoltre osservate riduzioni statisticamente significative dei valori di colesterolemia totale (-51 [-64 - -20]%; $p < 0.001$), trigliceridemia (-21 [-62 - +87]%; $p = 0.002$), apolipoproteinemia B (-58 [-76 - -27]%; $p < 0.001$) e fibrinogeno (-10 [-45 - +9]%; $p = 0.020$). Anche i valori di Lp(a) si sono significativamente ridotti (-40 [-97 - +21]%; $p < 0.001$), ma solo 5 dei 13 pazienti (38%) con valori basali di Lp(a) > 50 mg/dl hanno raggiunto il target terapeutico di Lp(a). L'efficacia ipocolesterolemizzante sui valori di LDL degli iPCSK9 è risultata indipendente dalla diagnosi di dislipidemia (FH vs. non FH, $p = 0.473$), dalla storia CV (prevenzione primaria vs. secondaria, $p = 0.742$), dalla presenza/assenza di DMT2 ($p = 0.671$) e dall'iPCSK9 utilizzato (evolocumab vs aliocumab, $p = 0.741$). L'86% dei pazienti in lipoferesi (6/7) ha potuto interrompere il trattamento lipofaeretic mantenendo il target di colesterolemia LDL. Tuttavia, i pazienti con intolleranza totale alle statine hanno presentato una riduzione di colesterolemia LDL significativamente inferiore (-52 [-63 - -38]%; vs -63 [-77 - -27]%; $p = 0.048$) rispetto ai pazienti non intolleranti e hanno raggiunto meno frequentemente il target terapeutico (1/5, 20% vs 28/30, 93%; $p < 0.001$). Durante il periodo di follow-up non sono state osservate variazioni significative dei valori di glicemia, CK, GOT e GPT. 1 paziente ha presentato una reazione cutanea nel sito di iniezione ed 1 paziente ha presentato rinfaringite, entrambi di lieve entità ed autolimitanti; 1 paziente ha manifestato un rash cutaneo in corso di inquadramento diagnostico (vasculite?). Tutti i pazienti hanno proseguito la terapia. 2 pazienti, entrambi con FH ed in prevenzione CV secondaria, hanno presentato eventi CV (1 rivascolarizzazione coronarica e 1 carotide) in corso di terapia con iPCSK9.

Conclusioni. In linea con quanto osservato nei trial clinici, la terapia con iPCSK9 si è dimostrata efficace anche in questa coorte

"real life" di pazienti ipercolesterolemici, consentendo di raggiungere il target terapeutico di colesterolemia LDL nella maggior parte dei pazienti, con un profilo di sicurezza accettabile. I problemi clinici che rimangono aperti sono: la gestione dei pazienti ipercolesterolemici ad alto/altissimo rischio CV con intolleranza totale alle statine; l'efficacia sui valori di Lp(a) e sugli outcome CV, e la sicurezza a lungo termine della terapia con iPCSK9.

LE DIVERSE MODALITÀ DI ASSUNZIONE DI ALCOL INFLUENZANO L'EFFICIENZA DEL PROCESSO DI TRASPORTO INVERSO DI COLESTEROLO IN VIVO

B. Papotti¹, D. Greco², S. Battista¹, L. Mele¹, A. Piemontese¹, F. Poti³, A. Poli⁴, F. Bernini¹, I. Zanotti¹

¹Dip. di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma; ²Biopharmanet-Tec Center, Università di Parma;

³Dip. di Medicina e Chirurgia-Unità di Neuroscienze, Università di Parma; ⁴Nutrition Foundation of Italy, Milano

Obiettivo. Le diverse modalità di assunzione di alcol sono fattori rilevanti che influenzano lo sviluppo di patologie cardiovascolari: se da una parte il consumo moderato è associato ad una ridotta incidenza di mortalità cardiovascolare, l'assunzione episodica di elevate dosi in breve tempo (binge) è associata ad un aumentato rischio di eventi acuti. Il trasporto inverso del colesterolo (RCT) è un processo ateroprotettivo che porta alla rimozione ed eliminazione del colesterolo in eccesso. Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'impatto di differenti tipologie di assunzione di alcol sul profilo lipidico e sull'RCT *in vivo*.

Metodi. Topi knock-out per l'Apolipoproteina E sono stati suddivisi in 3 gruppi: il gruppo placebo (n=9) ha ricevuto acqua per 28 giorni, il gruppo moderato (n=10) ha ricevuto 0,8 g/kg di alcol/giorno per 28 giorni, simulando un consumo di alcol moderato, mentre il gruppo binge ha ricevuto 0,8 g/kg di alcol/giorno per 5 giorni a settimana, seguiti dalla somministrazione di 2,8 g/kg di alcol/giorno per i restanti 2 giorni, simulando quindi un elevato consumo in breve tempo. L'RCT è stato misurato tramite una tecnica radioisotopica standardizzata; sono stati inoltre valutati parametri biochimici plasmatici quali colesterolo totale, colesterolo-HDL (HDL-c) e colesterolo non-HDL. L'espressione genica epatica del trasportatore Scavenger Receptor Class B Type I (SRB-1) è stata quantificata tramite Real Time qPCR, mentre con Western Blot ed analisi dell'immunofluorescenza tramite microscopia confocale è stata valutata l'espressione proteica.

Risultati. Il gruppo binge è caratterizzato da un aumento del colesterolo totale, HDL-c e colesterolo non-HDL (tutti $p < 0,0001$ rispetto al gruppo placebo), mentre il consumo moderato non comporta alcun cambiamento significativo nei lipidi circolanti. La valutazione dell'RCT *in vivo* ha evidenziato una significativa riduzione del colesterolo nelle feci nel gruppo binge rispetto al placebo ($p < 0,05$), oltre che un aumento della radioattività epatica nel gruppo moderato e binge comparata al placebo ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, rispettivamente). In accordo con questa osservazione, l'espressione genica di SRB-1 è significativamente maggiore nel gruppo binge rispetto al placebo ($p < 0,01$), mentre l'analisi dell'espressione proteica ha evidenziato una tendenza all'aumento di SRB-1 nel gruppo moderato e binge rispetto al placebo, seppure non significativo.

Conclusioni. Il consumo moderato di alcol nei topi è associato ad un impatto modesto sull'RCT macrofagico, mentre il consumo binge, in assenza di effetti tossici a livello epatico, esercita svariati effetti pro aterogeni, tra cui l'aumento del colesterolo totale e non-HDL e un'eliminazione ridotta di colesterolo.

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

XVII Congresso della Sezione Lombardia

Milano, 4-6 ottobre 2018

Nei giorni 5-6 ottobre 2018 si è tenuto a Milano il 12° Congresso Nazionale della Società di Terapia Clinica e Sperimentale (SITeCS). Dopo il successo delle precedenti edizioni, anche il Congresso di questo anno si è aperto con una giornata pregressuale il 4 ottobre, organizzata in collaborazione con SISA (Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi) Regione Lombardia, dedicata alla ricerca clinica e di base nell'ambito dell'aterosclerosi, e che ha visto la partecipazione attiva di giovani ricercatori.

Come di consueto, il Congresso Nazionale SITeCS ha dato ampio spazio alle più recenti evidenze emerse nell'area cardiovascolare (CV), ripercorrendo temi chiave, come la gestione dei fattori di rischio o l'utilizzo dei big data, ed esplorando ambiti emergenti, come il microbiota e il suo legame con infiammazione e aterosclerosi, o il ruolo della nutraceutica.

Varie relazioni si sono focalizzate sul ruolo dell'infiammazione e sui possibili approcci farmacologici in ottica di prevenzione cardiovascolare. La scoperta dei ruoli del sistema immunitario innato e adattativo nell'aterogenesi ha portato alla comprensione dello sviluppo della lesione e ad una nuova linea di ricerca per le terapie di prevenzione cardiovascolare.

Nuovi bersagli terapeutici includono l'Interleuchina 6 (IL-6), il tumor necrosis factor α e l'interleuchina-1 β (IL-1 β).

Un altro aspetto che di recente ha suscitato l'interesse della ricerca è il microbiota. Alcuni studi hanno dimostrato come possa essere uno dei fattori implicati nel promuovere l'aterosclerosi. Di notevole interesse è il ruolo obbligato del microbiota nella produzione di trimetilamina-N-ossido (TMAO) a partire da carnitina e fosfatidilcolina assunte con la dieta. La TMAO favorisce l'accumulo di colesterolo nei macrofagi e, in accordo, è stata riscontrata una relazione positiva tra alti livelli di

TMAO ed incidenza di eventi cardiovascolari maggiori. Altro argomento di interesse nel contesto del Congresso è stata la nutrizione. Emerge un quadro ancora poco chiaro sotto diversi punti di vista, in una situazione dove è difficile selezionare evidenze scevre da conflitti di interesse o ricavare dati relativi agli effetti di singoli nutrienti dalle raccomandazioni dietetiche. Sono incoraggianti i dati relativi al ruolo che alcuni nutraceutici possono avere nella prevenzione CV, tra cui fitosteroli, alcune fibre solubili, gli estratti di riso rosso fermentato e gli acidi grassi polinsaturi.

Oltre alle tematiche più strettamente cardiovascolari, il Congresso ha voluto dare spazio a un argomento di recente interesse, quale allo studio della fragilità nel soggetto anziano e al ruolo della disfunzione del midollo osseo. Il midollo infatti è la fonte delle cellule progenitrici che presiedono al riparo e al mantenimento della omeostasi di tutti gli organi e tessuti. Inoltre è noto che l'esercizio fisico ed interventi nutrizionali mirati hanno un effetto salutare sulle cellule progenitrici midollari.

Il congresso ha inoltre ospitato un simposio congiunto AMD (Associazione Medici Diabetologi), SID (Società Italiana di Diabetologia), SISA, SITeCS. La sessione ha discusso le più recenti evidenze in tema di nuovi farmaci antidiabetici, tra cui i farmaci incretino-mimetici e incretino-amplificatori (o gliptine), o le gliflozine, queste ultime caratterizzate da un meccanismo d'azione indipendente dalla secrezione di insulina e complementare a quello di altri farmaci antidiabetici ai quali le glifozine possono essere associate. Nei trial disegnati per valutare gli effetti cardiovascolari questi composti si sono dimostrati sicuri. Parallelamente ai risultati delle sperimentazioni cliniche, si stanno raccogliendo evidenze in real-life, che hanno confermato quanto osservato nei trial in termini di efficacia e sicurezza.

STUDI IN VITRO PER IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI VESICOLE EXTRACELLULARI IN BASE A SIZE E COMPOSIZIONE LIPIDICA. RISULTATI PRELIMINARI

F.M. Accattatis¹, S. Baroni¹, S. Mazza¹, A. Granata¹, L. Cantone², A. Corsini¹, V. Bollati², L. Arnaboldi¹

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

Le Vesicole Extracellulari rappresentano un gruppo eterogeneo di strutture derivate dalle membrane, comprendenti esosomi (50-150 nm) e microvescicole (50-1000 nm). Essi trasportano lipidi, proteine e acidi nucleici, sono presenti nei fluidi biologici e contribuiscono all'omeostasi, sviluppo e progressione di patologia. Il modello utilizzato è una linea cellulare di metastasi linfonodale di melanoma (LM-16).

1. Il più utilizzato metodo di isolamento delle EV è la centrifugazione differenziale (DC). Dal momento che è possibile calcolare in maniera teorica il "cut-off" size delle vescicole precipitate attraverso un algoritmo, che prende in considerazione la forza g, il tempo, la viscosità e la densità, al fine di definire le proprietà delle differenti popolazioni di EV che possono essere isolate, abbiamo deciso di dividerle in differenti frazioni basandoci sui loro size teorici. Dopo DC abbiamo ripreso i precipitati delle differenti frazioni e li abbiamo processati le analisi successive: lipidica attraverso Gasromatografia, e con Nanosight e TEM per la loro distribuzione e caratterizzazione dimensionale. I nostri dati suggeriscono che il decremento nella popolazione di EV con diametro maggiore è accompagnato da un incremento in percentuale relativa di acidi grassi saturi (da 44.05% porzione 300 nm a 71.44% per 50 nm), controbalanciato da un decremento negli insaturi (da 44.89% a 23.66%).

2. Dal momento che le EV sono costituite principalmente da colesterolo e fosfolipidi, si può assumere che alterazioni lipidiche possano influenzarne size, composizione e funzioni. A tal proposito stiamo quindi valutando se la simvastatina, inibitore della HMG-CoA riduttasi, attraverso l'inibizione della biosintesi del colesterolo influenzi le caratteristiche delle EV. Dopo 6 giorni di incubazione con 0.75 µM di simvastatina e 24 ore con medium privo di siero, abbiamo isolato le EV attraverso DC. I nostri dati preliminari indicano che la simvastatina incrementa il size delle EV (da 171.30 a 201.2 nm).

In futuro utilizzeremo trealosio per prevenire l'aggregazione delle EV e utilizzeremo e cercheremo nuovi biomarker per validare la nostra metodica. Analizzeremo anche la composizione lipidica delle EV e delle loro cellule parentali per comprendere se queste alterazioni possano tradursi in EV disfunzionali per cercare un nuovo approccio farmacologico atto a ridurre l'invasione tumorale.

LA SOVRAESPRESSIONE DI "ANKYRIN REPEAT DOMAIN 1" A LIVELLO MIOCARDICO CAUSA DIFETTI MORFOGENETICI E CONDUCE A DISFUNZIONE DIASTOLICA NELL'ETA' ADULTA

F. Acquati¹, N. Piroddi², G. S. Ganzetti³, P. Pesce⁴, L. Monti¹, B. Cellini², G. Chiesa³, I. Badi⁵, S. Tiso⁶, M. Campione⁷, C. Parolini³

¹Department of Biotechnology and Life Sciences, Università degli Studi dell'Insubria, Varese; ²Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Firenze; ³Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ⁴Department of Medicine, University of Padova; ⁵Experimental Cardio-Oncology and Cardiovascular Aging Unit, Centro Cardiologico Monzino-IRCCS, Milan; ⁶Dept. of Biomedical Sciences, University of Padova; ⁷Dep. of Biology, University of Padova, and CNR-Neuroscience Institute, Padova

La proteina CARP (Cardiac Ankyrin Repeat Protein 1), codificata dal gene *Ankyrin repeat domain 1* (*Ankrd1*), è stata identificata nelle cellule endoteliali dei vasi, nei cardiomiociti, nel muscolo scheletrico e nelle cellule muscolari lisce. Risultati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca hanno portato all'identificazione del gene *Ankrd1* come uno dei geni responsabili del ritorno venoso anomalo polmonare totale (TAPVR). In particolare, due pazienti affetti da TAPVR presentavano una sovraespressione della proteina CARP: a livello di trascritto, nel portatore della traslocazione 10;21, mentre nel portatore della mutazione missense T116M (sostituzione di una treonina con una metionina) a livello di una maggior stabilità della proteina. Questi dati suggeriscono che la sovraespressione di CARP durante la morfogenesi cardiaca possa essere associata a una connessione anomala delle vene polmonari, in particolare all'insorgenza di patologie cardiache congenite che si manifestano nell'età adulta. L'associazione tra livelli elevati di *Ankrd1* e lo sviluppo di alterazioni cardiache strutturali e funzionali non è nota. Per questo motivo sono state generate due linee transgeniche murine che sovraesprimono rispettivamente la proteina CARP wild-type (WT-CARP) e la proteina mutata (T116M-CARP) sotto il controllo del promotore del gene murino per la catena pesante della miosina, al fine di ottenere un'espressione del transgene esclusivamente a livello del miocardio.

I dati ottenuti da esperimenti ex-vivo su cuori di topi transgenici dimostrano che la proteina *ANKRD1* delimita sub-compartmenti discreti. I topi transgenici appartenenti a entrambe le linee, presentano una compromissione del remodeling cardiaco, che influenza in modo significativo lo sviluppo della regione seno-atriale e porta a difetti a livello del seno venoso. I topi transgenici arrivano all'età adulta ma presentano un ingrossamento dell'atrio sinistro accompagnata da una grave disfunzione diastolica. Inoltre, la trabecolazione delle camere cardiache dei cuori prelevati dai topi transgenici è significativamente maggiore rispetto a quanto osservato nelle camere dei cuori controllo.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che mutazioni genetiche di *Ankrd1* o la sovraespressione della proteina wild-type può essere alla base sia dell'insorgenza di patologie cardiache congenite che di cardiomiopatie dell'età adulta. I nostri risultati aggiungono nuovi livelli di complessità nella regolazione genetica dello sviluppo cardiaco e si aggiungono ad altri dati di letteratura che supportano l'ipotesi di CARP come una "critical sensor-signaling molecule" in grado di modulare le proprietà dei cardiomiociti durante lo sviluppo neonatale.

CONFRONTO DEI CAMBIAMENTI FENOTIPICI INDOTTI DA COLESTEROLO E FUMO DI SIGARETTA IN CELLULE MUSCOLARI LISCE VASALI E RUOLO DELLE HDL₃ NELLA LORO MODULAZIONE

S. Castiglioni¹, I. Damiani¹, L. Canclini¹, A. Rizzi¹, A. Corsini^{1,2}, S. Bellostà^{1,2}

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

Oltre il 50% delle cellule schiumose presenti nella placca aterosclerotica originano da cellule muscolari lisce (SMCs). In seguito ad accumulo di colesterolo, le SMCs modificano il proprio fenotipo da contrattile a sintetico/proliferativo, diminuendo l'espressione di marker tipici delle SMCs (come α -actina e calponina) e aumentando quella di marker di tipo macrofagico/infiammatorio (come Mac-2). Il carico di colesterolo riduce l'espressione della miocardina, importante coattivatore del Serum Response Factor (SRF) coinvolto nella differenziazione delle SMCs verso un fenotipo contrattile e dei suoi modulatori, miR-143/145. Il colesterolo aumenta, inoltre, l'espressione del KLF4, inibitore della miocardina e promotore della transizione verso un fenotipo infiammatorio.

Dati recentemente pubblicati dal nostro gruppo hanno evidenziato come tali cambiamenti siano prevenuti dalle HDL₃ solo in presenza del trasportatore di membrana ABCA1.

Anche il fumo di sigaretta è un importante fattore di rischio aterosclerotico in grado di indurre il cambiamento fenotipico in SMCs. In maniera paragonabile a quanto osservato per il colesterolo, l'incubazione di SMCs con il condensato di fumo di sigaretta (CSC), che rappresenta la porzione idrofobica del fumo, riduce l'espressione di marker contrattili e promuove quella di marker pro-infiammatori. Il trattamento con HDL₃ previene questi effetti, riportando i valori di espressione simili a quelli del controllo. Come per il colesterolo, inoltre, il CSC aumenta l'espressione dei trasportatori di membrana ABCA1 e ABCG1, effetto prevenuto dalla presenza di HDL₃. Analogamente a quanto riscontrato per il colesterolo, l'espressione di miocardina e KLF4 risulta rispettivamente diminuita ed aumentata in presenza di CSC, indicando questa via come possibile meccanismo alla base della modulazione fenotipica delle SMCs. Tali variazioni vengono normalizzate in presenza di HDL₃ che riportano i valori di espressione genica prossimi al basale. Ancora una volta però, questo effetto preventivo si verifica solo in presenza di ABCA1. Come per il colesterolo infatti, il cambiamento fenotipico indotto dal CSC in SMCs di topi ABCA1 KO, non viene prevenuto dalle HDL₃, confermando come la presenza del trasportatore di membrana ABCA1 sia essenziale per il manifestarsi dell'attività protettiva delle HDL₃.

LA RIDOTTA ESPRESSIONE DI ABCA1 LIMITA L'EFFETTO INIBITORIO DELLE HDL SULLA PROLIFERAZIONE DI CELLULE DI CARCINOMA PROSTATICO

E. Giorgio¹, M. Ruscica², C. Macchi², L. Calabresi¹, M. Gomaraschi¹

¹Centro Enrica Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

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

Il carcinoma prostatico (PCa) è il tumore più comunemente diagnosticato e la seconda causa di morte per cancro negli uomini. Dopo un'iniziale risposta alla terapia di deprivazione androgenica, il PCa può evolvere ad un fenotipo resistente alla castrazione (CRPC), per il quale le opzioni terapeutiche sono scarse e poco efficaci. I meccanismi responsabili di tale transizione non sono noti e potrebbero essere legati ad alterazioni metaboliche. È noto che le cellule hanno bisogno di colesterolo per proliferare, a causa del suo ruolo strutturale e funzionale nelle membrane cellulari e quale precursore per la sintesi ormonale. Poiché le HDL sono in grado di promuovere l'efflusso cellulare di colesterolo, scopo dello studio è di valutare se mediante tale processo le HDL siano in grado di influenzare la crescita di due linee cellulari di carcinoma prostatico: LNCaP, androgeno-dipendenti, e PC-3, androgeno-indipendenti.

In LNCaP, la capacità delle HDL di ridurre il contenuto di colesterolo cellulare è risultata preservata e in grado di inibire la proliferazione indotta dalle LDL del 40% circa. Al contrario, nella linea androgeno-indipendente PC-3, le HDL non sono in grado di promuovere la riduzione di colesterolo cellulare e, conseguentemente, di ridurre la proliferazione indotta dalle LDL. L'analisi dell'espressione dei recettori e trasportatori coinvolti nei meccanismi di efflusso di colesterolo ha evidenziato che nelle PC-3 l'espressione di ABCA1 è pressoché nulla, probabilmente a causa di modifiche post-traduzionali.

I dati ottenuti dimostrano che le HDL possono inibire la proliferazione di cellule di carcinoma prostatico riducendo il contenuto di colesterolo. Inoltre, l'alterazione dei meccanismi di efflusso di colesterolo potrebbe essere coinvolta nella transizione ad un fenotipo androgeno-resistente. Pertanto, ripristinare la corretta espressione di ABCA1 potrebbe rappresentare un nuovo approccio per lo sviluppo di farmaci per il trattamento del CRPC.

MODELLING MOLECOLARE E MECCANISMO DI INTERAZIONE DEL COMPLESSO LCAT-RHDL

T. Laurenzi, C. Parravicini, L. Palazzolo, U. Guerrini,
L. Calabresi, I. Eberini

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

LCAT è una proteina secreta principalmente dal fegato circolante nel plasma legata reversibilmente a lipoproteine, la sua funzione principale, infatti, è di catalizzare l'esterificazione del colesterolo trasferendo una catena acilica dalla fosfatidilcolina al colesterolo. Mutazioni nel gene che codifica per LCAT possono provocare la perdita di funzionalità dell'enzima (LCAT deficiencies), portando a disordini del metabolismo lipidico con gravi conseguenze cliniche, come anemia e insufficienza renale, la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti. Al momento, non esistono terapie farmacologiche per queste patologie. La sperimentazione di una terapia sostitutiva con enzima ricombinante (ERT) ha avuto successo, tuttavia, dati i limiti dei farmaci biologici in terapia, tale approccio potrebbe non essere efficace in caso di trattamenti cronici. Pertanto, l'utilizzo di piccole molecole per il trattamento del deficit familiare di LCAT risulterebbe in un miglioramento della qualità di vita dei portatori e una diminuzione dei costi sanitari.

Risultati preliminari hanno dimostrato che l'attività di mutanti di LCAT può essere ristabilita *in vitro*, almeno parzialmente, con l'utilizzo di attivatori allosterici. Lo scopo di questo progetto, infatti, è quello di razionalizzare la progettazione *in silico* di attivatori di LCAT, in grado di ripristinare la funzionalità dell'enzima nei portatori di mutazioni.

Al fine di identificare tali composti, è necessario comprendere a fondo il meccanismo di reazione enzimatica di LCAT e come questo venga compromesso in caso di mutazioni. Tuttavia, poiché LCAT è attivo principalmente sulla superficie delle HDL, il ruolo dell'interazione tra LCAT e Apo-AI non può essere sottovalutato. Abbiamo pertanto sviluppato un modello di HDL ricostituita (rHDL) e, utilizzando i dati cristallografici recentemente pubblicati riguardanti la struttura di LCAT, impiegato tecniche di dinamica molecolare, ricerca conformazionale, docking molecolare proteina-proteina e altre metodologie di bioinformatica strutturale per proporre un modello generale del meccanismo di attivazione di LCAT da parte di Apo-AI, nonché uno studio sulle dinamiche dei domini di LCAT critici per l'accessibilità al sito catalitico e per l'interazione con le HDL. I modelli proposti saranno utili per studiare le mutazioni di LCAT e comprendere come piccole molecole possano ripristinare l'attività.

RUOLO DELLE PRE β HDL NELL'INSORGENZA DEL DANNO RENALE NEL DEFICIT DI LCAT

A. Strazzella¹, A. Ossoli¹, S. Simonelli¹, D. Rottoli²,
M. Locatelli², M. Abbate², C. Zoja², L. Calabresi¹

¹Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Centro Anna Maria Astori, Parco Scientifico Tecnologico Kilometro Rosso, Bergamo

Il deficit genetico di LCAT è una malattia rara causata da mutazioni nel gene *LCAT*, che codifica per l'unico enzima umano deputato all'esterificazione del colesterolo plasmatico ed è coinvolto nella maturazione delle HDL. I soggetti portatori della patologia mostrano livelli plasmatici di HDL-C estremamente ridotti. Inoltre, anche la distribuzione delle lipoproteine risulta alterata, con comparsa di LpX e accumulo di HDL piccole e discoidali, chiamate pre β -HDL. Il ruolo di queste ultime nello sviluppo della malattia renale, che rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nei soggetti portatori, è ancora sconosciuto, e, pertanto, lo scopo del lavoro è stato quello di valutare l'impatto di queste particelle nell'insorgenza del danno renale. A tal fine, topi Wild Type C57Bl/6 (WT) e LCAT KO sono stati trattati per quattro settimane con HDL sintetiche paragonabili alle pre β -HDL ed è stato valutato l'effetto di tale trattamento sul profilo lipidico e sulla funzionalità renale. I risultati mostrano che, al termine dell'esperimento, negli animali LCAT KO si è verificato un aumento del colesterolo totale (14,64%, $p=0,008$ vs basale) e del HDL-C (168,28%, $p=0,008$ vs basale), dei trigliceridi (176%, $p=0,008$ vs basale) e dei fosfolipidi (111,94%, $p=0,002$ vs basale). Negli animali LCAT KO si osserva anche un aumento della BUN (19,07%, $p=0,006$ vs basale) che non varia invece negli animali WT. Inoltre l'analisi istologica mostra una diffusa vacuolizzazione delle cellule tubulari negli animali trattati, indice di danno locale. Per investigare ulteriormente il meccanismo alla base di questa condizione, è stato condotto uno studio *in vitro* su cellule del tubulo prossimale renale incubate con HDL isolate dal plasma di portatori e controlli. Le HDL dei portatori, principalmente pre β -HDL, inducono un aumento dello stress ossidativo, valutato come produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), nelle cellule tubulari rispetto alle HDL dei controlli (28,57%, $p=0,0489$ vs controllo). In conclusione, l'accumulo di pre β -HDL induce un aumento nella produzione di ROS nelle cellule tubulari e contribuisce allo sviluppo della malattia renale, come evidenziato dallo studio *in vivo*.

IL TRATTAMENTO CON TOPIRAMATO PROTEGGE I TOPI APOE-KO DALL'INSORGENZA DI DANNO RENALE SENZA MODIFICARE I LIVELLI DEI LIPIDI PLASMATICI

M. Busnelli¹, S. Manzini¹, C. Parolini¹, L. Minoli^{2,3}, A. Ossoli⁴, S. Simonelli⁴, E. Brambilla¹, E. Lekka⁵, A. Persidis⁵, E. Scanziani^{2,3}, G. Chiesa¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano; ³Mouse & Animal Pathology Laboratory (MAPLab), Fondazione UniMi, Milano; ⁴Center E. Grossi Paoletti, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ⁵Biovista, Ellinikon, Athens, Greece

Il topiramato è un farmaco impiegato nel trattamento dell'epilessia e prescritto anche nella profilassi dell'emigrania che si caratterizza per i molteplici meccanismi d'azione. Diversi studi indicano che il trattamento con topiramato promuove la riduzione del peso corporeo e riduce moderatamente i livelli dei lipidi plasmatici e la glicemia. In considerazione di questi effetti metabolici positivi si è deciso di valutare se il trattamento con topiramato potesse modulare lo sviluppo di aterosclerosi e al tempo stesso avere effetti protettivi sugli organi bersaglio di condizioni dismetaboliche.

Trenta topi apoE-KO sono stati distribuiti in tre gruppi sperimentali e alimentati per 12 settimane con una dieta ad elevato contenuto lipidico (controllo), oppure con la stessa dieta addizionata con topiramato allo 0.125% o allo 0.25%. Il peso corporeo e il consumo di cibo e acqua sono stati monitorati durante tutto lo studio. È stata inoltre misurata la concentrazione dei lipidi plasmatici e la glicemia, ed è stato effettuato un test di tolleranza al glucosio. Lo sviluppo di aterosclerosi è stato valutato nell'intera aorta e nel seno aortico. Sono state inoltre condotte indagini istologiche su fegato, rene e tessuto adiposo.

Il trattamento con topiramato non ha influenzato l'aumento di peso corporeo o il consumo di cibo. La tolleranza al glucosio e la concentrazione lipidica plasmatica sono risultati comparabili tra i gruppi, così come lo sviluppo di aterosclerosi. Il trattamento non ha inoltre alterato l'istologia del fegato e del tessuto adiposo. A livello renale, il trattamento con topiramato ha invece ridotto l'insorgenza di lipidosi glomerulare in modo dose-dipendente, riducendo l'accumulo di cellule schiumose e l'espressione di marcatori di infiammazione. Inoltre, anche i livelli plasmatici di urea sono risultati ridotti in seguito al trattamento.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che il trattamento con topiramato non influenza lo sviluppo di aterosclerosi, ma preserva struttura e funzionalità renale. Il topiramato potrebbe pertanto essere preso in considerazione in studi di riposizionamento farmacologico per il trattamento della lipidosi glomerulare.

IL RECETTORE DELLE LDL SVOLGE UN RUOLO FONDAMENTALE NELL'ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI CD8+

A. Moregola¹, F. Bonacina¹, D. Coe², A.L. Catapano^{1,3}, F. Marelli-Berg², G. D. Norata¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University, Londra, UK; ³IRCCS Multimedica, Milano

Scopo. Data l'importanza che ha il colesterolo per la corretta funzionalità e proliferazione delle cellule immunitarie, scopo di questo studio è stato quello di valutare il ruolo del recettore delle LDL nei linfociti T, che giocano un ruolo importante nel mantenimento della risposta cronica che caratterizza la patologia aterosclerotica.

Metodi. Valutazione della risposta dei linfociti T dopo attivazione *in vitro* (stimolazione anti-CD3/anti-CD28, reazione mista linfocitaria) e *in vivo* (proliferazione omeostatica e mediata da recettore). Valutazione di produzione di citochine e marker di attivazione tramite citofluorimetria, espressione genica e western blot.

Risultati. L'espressione del recettore delle LDL aumenta in modo significativo dopo attivazione *in vitro* nei linfociti CD8+. Usando topi LDLR KO abbiamo evidenziato difetti nella proliferazione dei linfociti T CD8+ sia dopo attivazione *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28, che dopo stimolazione con splenociti allogenei (numero cellule proliferate: 1764±38 WT, 1144± LDLR KO, p<0.01). Inoltre, risulta essere ridotta la produzione di IFN γ (13.9±1% WT, 8.4±0.6% LDLR KO p<0.01). In un modello *in vivo* di risposta antigene-specifica (vaccinazione con ovalbumina), abbiamo osservato gli stessi difetti nella proliferazione e nella produzione di citochine (\downarrow IFN γ p<0.001, \downarrow IL13 p<0.01, \downarrow perforina p<0.05) dei linfociti CD8+ dei topi LDLR KO. L'esperimento di proliferazione omeostatica dei linfociti, non guidata da antigene, non hanno evidenziato differenze nei due modelli animali. I difetti osservati potrebbero essere dovuti ad un alterato signaling legato al TCR, infatti nelle cellule T CD8+ prive di recettore delle LDL sono risultate ridotte, dopo stimolazione con antiCD3/antiCD28, la fosforilazione di Akt (p<0.01) e l'espressione di CD69 (WT 61.6±6.1%, LDLR KO 41.8±8.5%, p<0.01), marker di rapida attivazione. Il difetto nel segnale potrebbe derivare da una non corretta formazione dei lipid rafts, porzioni di membrana ricche di colesterolo necessarie per un corretto signaling, infatti abbiamo osservato una lieve riduzione della positività al Ctxb, marker di lipid raft, e significativa riduzione di lipidi neutri (MFI nile red WT 12520±2071, MFI LDLR KO 9639.7±272.5, p<0.05) nelle CD8+ degli LDLR KO dopo stimolazione *in vitro*.

Conclusioni. Il recettore delle LDL svolge un ruolo importante nelle risposte immunometaboliche dei linfociti CD8+, in particolare permettendo una corretta proliferazione e attivazione in risposta a stimoli che inducono una rapida attivazione, come possono essere gli antigeni non-self presenti nella placca aterosclerotica. Il recettore delle LDL nei linfociti potrebbe quindi funzionare da asse di collegamento tra risposta immunitaria, infiammazione ed aterosclerosi.

LO STRESS SUB-CRONICO ESACERBA IL FENOTIPO PRO-TROMBOTICO IN TOPI BDNFVAL66MET

L. Sandrini^{1,2}, A. Ieraci¹, P. Amadio², M. Popoli¹, F.S. Lee³, E. Tremoli², S.S. Barbieri²

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano; ³Dipartimento di Psichiatria, Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, USA

Introduzione. Le patologie cardiovascolari rappresentano oggi la principale causa mondiale di mortalità e morbilità con un'incidenza del 20% sulla popolazione, percentuale in crescita nonostante i progressi in ambito diagnostico, chirurgico e farmacologico. È stato osservato come i classici fattori di rischio non siano sufficienti a spiegare la totalità della casistica osservata ed è stato dimostrato come fattori ambientali possano contribuire allo sviluppo e alla progressione delle malattie cardiovascolari, ed in particolare come un ruolo di primo piano sia attribuibile allo stress psicofisico.

È stato osservato come lo stress sia in grado di alterare parametri funzionali a livello cardiovascolare non solo attivando il sistema adrenergico e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene ma coinvolgendo anche pathways molecolari incluso quello delle neurotrofine, tra cui il Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) a carico del BDNF, noto come BDNF Val66Met, è associato ad una maggiore incidenza di malattie neuropsichiatriche e neurodegenerative così come ad una maggiore incidenza di infarto acuto del miocardio e trombosi.

In particolare è stato osservato come topi eterozigoti per l'allele mutato (BDNF^{Val/Met}) mostrino un fenotipo ansioso-depressivo solo quando sottoposti a stress sub-cronico, supportando il concetto di interazione gene-ambiente (GxE). Tuttavia nessun dato risulta disponibile riguardo a questa interazione GxE a riguardo della trombosi arteriosa.

Risultati. Topi BDNF^{Val/Met} sottoposti al paradigma di "restraint" sub-cronico due ore al giorno per sette giorni mostrano una maggior propensione allo sviluppo di trombosi arteriosa indotta da FeCl₃. In questi topi, rispetto ai wild-type (WT), lo stress aumenta marcatamente il numero di leucociti circolanti e di piastrine rendendo queste ultime iper-reattive, come mostrato dall'elevata percentuale di aggregati piastrine-leucociti e dalla maggiore espressione di P-selectina e GPIIb/IIIa sulla loro superficie. Inoltre, nonostante nei topi mutanti sottoposti a stress si osservi un aumento nel numero di piastrine reticolate, questo fenomeno non sembra riflettere alterazioni a livello midollare. Infatti, il numero e lo stato di maturazione dei megacariociti a livello del midollo osseo risulta simile a quello osservato nei topi WT stressati. Lo stress sub-cronico porta inoltre ad una riduzione dei livelli di BDNF e ad un aumento dell'attività del fattore tissutale nell'aorta indipendentemente dal genotipo considerato.

Conclusioni. Questo studio rivela una possibile interazione tra il polimorfismo BDNFVal66Met e lo stress nello sviluppo della trombosi arteriosa. Studi su pazienti saranno necessari al fine di chiarire se questa interazione GxE possa risultare utile nella stratificazione dei pazienti con rischio cardiovascolare.

IL TRATTAMENTO CON FENRETINIDE PEGGIORA L'ATEROSCLEROSI NONOSTANTE EFFETTI METABOLICI FAVOREVOLI

S. Manzini¹, M. Busnelli¹, C. Parolini¹, F. Bonacina¹, S.S. Barbieri², L. Sandrini², F. Arnaboldi³, S. Paltrinieri⁴, E. Scanziani⁴, G. Chiesa¹
¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Istituto Cardiologico Monzino; ³Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano; ⁴Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano

È noto che la fenretinide, un retinoide di derivazione sintetica studiato principalmente per la prevenzione e il trattamento del cancro, contribuisca alla riduzione della massa grassa e aumenti la tolleranza al glucosio. Questi effetti, combinati alla sua abilità di inibire la sintesi dei ceramidi, hanno fatto ipotizzare che fenretinide potesse avere effetti anti-aterosclerotici.

Per testare questa ipotesi, topi apoE-KO (EKO) femmina di 9 settimane di età sono stati alimentati per 12 settimane con dieta Western, senza supplementazione (controllo), o supplementata con 0.1% w/w fenretinide (n=20 topi/gruppo). Topi C57BL/6J (WT) sono stati similmente arruolati per escludere effetti dipendenti dal genotipo (n=10). Peso e consumo di cibo e acqua sono stati monitorati lungo tutto il periodo di trattamento. Alla fine del trattamento sono stati dosati i lipidi plasmatici e il glucosio ematico (basale e curva di carico) in EKO. Al sacrificio, cuore e aorta sono stati campionati per valutare lo sviluppo di aterosclerosi. Fegato, milza, rene, cuore, polmone e tessuto adiposo bianco addominale sono stati valutati istologicamente.

Nei topi EKO, la somministrazione di fenretinide ha ridotto significativamente il peso, i livelli di glucosio ematico e i livelli di colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi plasmatici. Nel fegato, il trattamento ha ridotto significativamente il contenuto di glicogeno e lipidi normalmente osservato a dieta Western. Inaspettatamente, l'assunzione di fenretinide ha causato un abnorme ingrossamento della milza, dove si è osservata una severa atrofia follicolare e un'aumentata ematopoiesi extramidollare. Quest'ultimo fenomeno era rilevabile anche nel fegato, dove altresì si è osservata eritrofangocitosi. Una pesante deposizione renale di emosiderina si è riscontrata nei reni degli animali trattati. Infine, lo sviluppo di aterosclerosi è risultato marcatamente aumentato in EKO trattati vs controllo a livello dell'arco aortico (34.6±7.3% vs 26.1±5.8%, +33%), aorta toracica (14.2±4.9% vs 4.9±2.1%, +190%) e addominale (7.4±3.3% vs 3.3±1.8%, +124%). Calo ponderale e riduzione dell'adiposità viscerale si sono osservati anche in topi WT trattati con il farmaco, assieme ad un minore, ma presente, ingrossamento della milza.

In conclusione, è stato dimostrato come, nonostante i numerosi effetti metabolici positivi, il trattamento con fenretinide possa risultare in un aggravamento severo della patologia aterosclerotica.

UTILIZZO DI MODELLI MURINI CON FEGATO UMANIZZATO PER LO STUDIO DI MARCATORI EPIGENETICI DELLA REGOLAZIONE METABOLICA NELL'INVECCHIAMENTO

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

Laboratorio "G. Galli" di Biochimica e Biologia Molecolare del Metabolismo-Spettrometria di Massa, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

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. I topi con fegato umanizzato, sottoposti a diete ad alto contenuto lipidico, vengono caratterizzati fenotipicamente e molecolarmente con approcci omici (epigenoma, trascrittoma, metaboloma, proteoma). I risultati vengono integrati per valutare i circuiti di regolazione che si verificano in individui con alleli di rischio o protezione per le patologie metaboliche. I dati provenienti dallo studio di questi modelli murini indicano che i topi con fegato umanizzato sono caratterizzati da un accentuato metabolismo ossidativo.

Scopo. questa ricerca si prefigge di determinare la diversa distribuzione di marcatori istonici associati ai fenotipi dei modelli murini umanizzati con epatociti derivanti da donatori con diverse varianti alleliche di TCF7L2 e di confrontarne la distribuzione rispetto agli epatociti murini.

Risultati. Mediante l'utilizzo della tecnica di immunoprecipitazione della cromatina seguita dal suo sequenziamento (ChIP-seq) abbiamo valutato il marcatore istonico di enhancer attivi H3K27ac e H3K4me3 marcatore di promotori attivi. Gli arricchimenti, valutati su diverse regioni del genoma umano, hanno rivelato valori di arricchimento per PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) più elevati, seppur non statisticamente significativi, nei topi con allele di protezione (30%) rispetto a quelli con allele di rischio (22%) per H3K27ac ($p=0,4385$). Il marcatore istonico H3K27ac risulta essere maggiormente arricchito nella regione di PPAR α umano nei topi umanizzati (30%) rispetto alla regione omologa di PPAR α negli epatociti murini (18%, $p=0,0406$). Questo dato si correla con la maggior espressione di FGF21, bersaglio di PPAR α , negli epatociti umani rispetto a quelli murini. L'incrementata espressione di FGF21 potrebbe spiegare l'aumentato metabolismo ossidativo osservato nei topi con fegato umanizzato.

Conclusioni. Il protocollo di ChIP-seq ha permesso di evidenziare i cambiamenti nei marcatori epigenetici in topi con fegato umanizzato recanti una variante allelica protettiva di TCF7L2 rispetto agli epatociti murini. I nostri risultati indicano che i topi con fegato umanizzato hanno un aumentato metabolismo ossidativo. Questi dati suggeriscono un possibile ruolo dell'asse PPAR α -FGF21 nell'aumentata capacità ossidativa osservata nei topi con fegato umanizzato. [Finanziamento EU FP7-602757 HUMAN].

EFFETTI NEUROMETABOLICI IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI ANORESSIA NERVOSA

F. Mottarlini, F. Bonacina, F. Telese, P. Uboldi, G.D. Norata, F. Fumagalli, L. Caffino
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

L'anorexia nervosa (AN) è una patologia psichiatrica caratterizzata da ridotta assunzione di cibo, paura di acquisire peso ed intensa attività fisica. Nonostante l'elevata incidenza fra le ragazze in età adolescenziale (1-2%), l'alta probabilità di ricaduta e l'alto tasso di mortalità (0.56% annuo), i fattori neurobiologici sottesi sono ancora largamente sconosciuti.

Lo scopo del nostro progetto è verificare il coinvolgimento dell'asse neurometabolico Irisin/BDNF, attivato in seguito ad esercizio fisico nel muscolo e nel cervello, nel modello sperimentale di anoressia nervosa noto come ABA (activity-based anorexia).

Ratte femmine adolescenti sono state esposte dal giorno postnatale [PND] 38 al PND42 ad un programma nutrizionale restrittivo (2 ore al giorno per 5 giorni) ed accesso libero ad una ruota di attività. Un gruppo di animali è stato sacrificato al PND42 (fase acuta della patologia), mentre i rimanenti sono stati sacrificati dopo 7 giorni, al recupero del peso corporeo (PND 49).

Dopo tre giorni dall'induzione del fenotipo anoressico, il gruppo ABA mostra una riduzione del peso corporeo significativamente maggiore rispetto agli animali esposti alla sola restrizione calorica (FR). Inoltre, diversamente dagli animali esposti al solo esercizio fisico (EXE) che mostrano un'attività fisica costante, gli animali ABA aumentano gradualmente la distanza percorsa sulla ruota e la velocità media e massima di corsa, suggerendo che la corsa per gli animali ABA diventa un rinforzo positivo, compulsiva.

Nella fase acuta, le ratte ABA mostrano una marcata riduzione dei trigliceridi e colesterolo plasmatico. In ippocampo il protocollo ABA aumenta i livelli di mRNA della neurotrofina BDNF, ma ne riduce l'espressione proteica e l'attivazione delle vie di segnalazione intracellulare da esso controllate. Dopo sette giorni di remissione gli animali ABA recuperano la perdita di peso ma in ippocampo permane la riduzione dell'espressione di BDNF. In accordo, i livelli plasmatici di irisin, una miochina rilasciata dal muscolo che stimola l'espressione cerebrale di BDNF, aumentano negli animali ABA al PND42 e sono ridotti significativamente al PND49, suggerendo che la possibile connessione fra alterazioni molecolari negli organi periferici e disfunzioni nella plasticità cerebrale possa, almeno parzialmente, contribuire ad alterare l'omeostasi energetica e i meccanismi ricompensa che alimentano il fenotipo anoressico o la ricaduta.

SILENZIAMENTO DELL'ISTONE DEACETILASI 3 IN DIVERSI STADI DEL DIFFERENZIAMENTO: EFFETTI EPIGENETICI SUL METABOLISMO ADIPOCITARIO

D. Cricri, R. Longo, A. Ferrari, N. Mitro, D. Caruso, E. De Fabiani, M. Crestani

Laboratorio "Giovanni Galli" di Biochimica e Biologia Molecolare del Metabolismo, Spettrometria di Massa, Università degli Studi di Milano, 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. Le istone deacetilasi (HDAC) esercitano un ruolo emergente nella regolazione epigenetica del metabolismo nel tessuto adiposo. Il nostro gruppo ha dimostrato che l'inibizione selettiva delle HDAC di classe I utilizzando MS275 migliora la funzionalità degli adipociti e ne 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.** Il meccanismo molecolare attraverso il quale le HDAC esercitano la loro azione nel tessuto adiposo non è stato completamente chiarito e non è noto se gli effetti della loro inibizione si esplicano a livello dei precursori o degli adipociti maturi. Per rispondere a queste domande, sono stati studiati gli effetti del silenziamento di HDAC3 durante il differenziamento adipocitario. Procedure sperimentali. HDAC3 è stata silenziata in cellule C3H/10T1/2 in diversi stadi del differenziamento ad adipociti. Per generare questo modello è stato utilizzato shRNA specifico per HDAC3.

Risultati. Il silenziamento precoce di HDAC3 comporta l'aumento dell'espressione genica di *Pparg*, principale regolatore del differenziamento adipocitario (scramble 1.570 ± 0.03 vs shHDAC3 3.767 ± 0.06) e, di conseguenza, di marker di funzionalità adipocitaria (e.g. *AdipoQ*, scramble 3.032 ± 0.09 vs shHDAC3 6.028 ± 0.20). Risulta, inoltre, amplificata l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo ossidativo (e.g. *Acadm*, scramble 0.831 ± 0.03 vs shHDAC3 2.263 ± 0.14). Infine, aumenta l'espressione di *Ucp1*, gene chiave nel processo di browning (scramble 0.474 ± 0.08 vs shHDAC3 1.580 ± 0.05). Le differenze osservate, tuttavia, si annullano quando HDAC3 viene silenziata negli stadi terminali del differenziamento (e.g. *Pparg*, scramble 1.712 ± 0.12 vs shHDAC3 1.730 ± 0.12 ; *Acadm*, scramble 1.391 ± 0.14 vs shHDAC3 1.158 ± 0.14).

Conclusioni. Il silenziamento di HDAC3 promuove la funzionalità adipocitaria aumentando in maniera significativa l'espressione di geni coinvolti nel differenziamento e nel metabolismo delle cellule adipose e riproducendo in buona misura gli effetti dell'inibizione biochimica con MS275. Inoltre, gli eventi epigenetici precoci mediati dal silenziamento di HDAC3 all'inizio del differenziamento cellulare sono quelli cruciali per indirizzare i precursori verso il fenotipo metabolico sopra descritto. In base a questi risultati ipotizziamo che gli effetti dovuti all'inibizione/silenziamento delle HDAC di classe I nel tessuto adiposo si esplicano nei precursori adipocitari. [MIUR Progetto Eccellenza, FP7 NR-NET PITNGA-2013-606806, Fondazione Cariplo 2015-0641]

ZC3H10 CONTROLLA LA FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE E IL DIFFERENZIAMENTO NEGLI ADIPOCITI

S. Pedretti, M. Audano, D. Caruso, M. Crestani, E. De Fabiani, N. Mitro

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

Introduzione. L'aumento dell'incidenza dell'obesità rappresenta uno dei principali problemi a livello mondiale. L'adipogenesi è controllata da una cascata di fattori di trascrizione fra cui i membri della famiglia CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP α , β , δ) e peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Inoltre, numerosi studi dimostrano una correlazione tra obesità e disfunzione mitocondriale.

I mitocondri sono organelli essenziali per le funzioni cellulari fra cui produzione di energia e regolazione del differenziamento cellulare. Recentemente nel nostro laboratorio abbiamo identificato l'RNA binding protein Zinc finger CCCH-type containing 10 (Zc3h10) come nuovo regolatore mitocondriale e abbiamo, quindi, validato il suo ruolo durante il processo di adipogenesi.

Metodi. Cellule mesenchimali murine (CH3/10T1/2) sono state differenziate ad adipociti in presenza e in assenza di Zc3h10. La quantificazione dei metaboliti energetici è stata eseguita mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS/MS) mentre per l'analisi del ciclo cellulare è stata utilizzata la citofluorimetria a flusso. Infine, è stata eseguita l'immunoprecipitazione degli RNA associati a Zc3h10 per identificare i suoi bersagli molecolari coinvolti nell'adipogenesi.

Risultati. Abbiamo osservato che i livelli della proteina Zc3h10 aumentano durante il differenziamento adipocitario. Il silenziamento di Zc3h10 (ShZc3h10) ha un effetto negativo sia sull'adipogenesi che sull'attività mitocondriale. Infatti, cellule ShZc3h10 presentano un quadro alterato di metaboliti energetici. È stato osservato che Zc3h10 presenta un effetto sia sulla proliferazione (conta cellulare, Scramble: 18851 ± 1543 vs ShZc3h10: 7259 ± 630 , $p < 0,001$) sia sul ciclo cellulare degli adipociti durante il differenziamento. Dall'analisi del ciclo cellulare risulta che cellule ShZc3h10 non progrediscono correttamente nel ciclo cellulare durante l'espansione clonale mitotica, condizionando l'abilità dei preadipociti di uscire dalla fase G2/M (% cellule in G2, Scramble: $9,49 \pm 0,25$ vs ShZc3h10: $12,39 \pm 0,38$, $p < 0,001$) e impedendo il corretto differenziamento (colorazione Oil Red O, Abs490nm, Scramble: $265 \pm 0,02$ vs ShZc3h10: $192 \pm 0,008$, $p < 0,001$). Infine, abbiamo dimostrato che Zc3h10 lega l'RNA nascente di C/EBP β e ne assicura la corretta sintesi.

Conclusioni. I nostri risultati dimostrano che Zc3h10 favorendo la sintesi dell'mRNA di C/EBP β permette la corretta espansione clonale mitotica, un processo fondamentale per la corretta maturazione degli adipociti. [Cariplo Foundation grant number 2014-0991].

IL RUOLO DI eIF6 NELLA PREVENZIONE DELL'OBESITÀ E DELL'ATEROSCLEROSI

A. Scagliola^{1,2}, A. Miluzio¹, R. Alfieri³, G. Ventura², C. Cordiglieri³, S. Oliveto^{1,2}, N. Manfrini¹, S. Biffo^{1,2}

¹*Molecular Histology and Cell Growth Unit, Istituto Nazionale Genetica Molecolare, "Romeo ed Enrica Invernizzi", Milano;*
²*Dipartimento di Bioesienze, Università di Milano;*
³*Istituto Nazionale Genetica Molecolare, "Romeo ed Enrica Invernizzi", Milano*

L'aterosclerosi è un disturbo multifattoriale delle pareti arteriose, causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati. Le patologie di origine metabolica, come ad esempio diabete e obesità, sono un insieme di disfunzioni caratterizzate da resistenza all'insulina, iperglicemia e lipidemia. Esse sono fattori di rischio delle patologie cardiovascolari, tra cui l'aterosclerosi. Diabete, obesità e aterosclerosi spesso si presentano nello stesso individuo. L'identificazione di nuovi target terapeutici per la prevenzione e la cura delle sindromi metaboliche è dunque di cruciale importanza nell'ambito dell'aterosclerosi. Un ruolo emergente nell'insorgenza dei disturbi metabolici è svolto da fattori che regolano la sintesi proteica. Tra questi, Eukaryotic Initiation Factor 6 (eIF6) è un fattore di regolazione della traduzione di specifici mRNA: in condizioni fisiologiche, l'attività traduzionale di eIF6 regola diversi processi metabolici, tra cui la sintesi degli acidi grassi. L'aumento di espressione della proteina eIF6 è proporzionale alla comparsa di resistenza all'insulina e di obesità.

Dato il ruolo di eIF6 nella sintesi lipidica, abbiamo studiato gli effetti della sua inibizione nei disturbi metabolici, sottoponendo topi eterozigoti per eIF6 ad una dieta ricca di grassi. In questi topi, l'insorgenza di obesità, resistenza all'insulina, lipidemia, steatosi e fibrosi epatica è significativamente ridotta rispetto ai topi con normali livelli di eIF6. L'analisi trascrittomicca dei loro fegati ha evidenziato che in condizione di inibizione di eIF6 l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi dei lipidi, dei trigliceridi e del colesterolo è ridotta, così come i livelli di fattori trascrizionali lipogenici. I mitocondri sono il principale compartimento cellulare di produzione dell'energia e le alterazioni dell'attività mitocondriale contribuiscono allo sviluppo dei disturbi metabolici. Utilizzando diverse metodologie, tra cui analisi trascrizionali, saggi metabolici e imaging cellulare, abbiamo dimostrato che l'attività mitocondriale e la produzione di ATP sono aumentate nei topi eterozigoti per eIF6. I nostri risultati dimostrano che la parziale delezione di eIF6 riduce la sintesi lipidica e abolisce le disfunzioni mitocondriali riscontrate nei disturbi metabolici.

I nostri dati dimostrano l'efficacia dell'inibizione di eIF6 nella prevenzione della sindrome metabolica e di conseguenza ne evidenziano le potenzialità terapeutiche nell'ambito dell'aterosclerosi. [Progetto Cariplo: 2015-0540].

LAV-BPIFB4 COME TOOL TERAPEUTICO PER PREVENIRE CAUSE DI INSORGENZA DELLA SINDROME DI FRAGILITÀ NELL'UOMO

A. Ferrario¹, F. Villa¹, A. Maciag¹, M. Cattaneo¹, C.C. Spinelli¹, A. Carrizzo², C. Vecchione², P. Beltrami³, A. Puca^{1,2}

¹*Gruppo Multimedia;* ²*Università di Salerno;* ³*Università di Udine*

Con l'avanzare dell'età gli individui incominciano a perdere forza, a sentirsi stanchi ed iniziano a diventare incapaci di svolgere autonomamente le attività basilari della vita quotidiana. Questa condizione clinica viene definita come sindrome della fragilità dell'anziano ed è sintomo di un danneggiamento dei sistemi fisiologici dell'uomo. È noto che tra le principali cause della fragilità ci siano le complicanze delle malattie cardiovascolari, tra le quali la disfunzione endoteliale. L'invecchiamento si associa ad una diminuita vasodilatazione endotelio-dipendente che può rappresentare un meccanismo fisiopatologico per lo sviluppo di danno d'organo di tipo aterosclerotico, in diretta correlazione con la sindrome di fragilità umana.

In questo contesto si inseriscono i longevi (che hanno il genotipo LAV-BPIFB4 arricchito rispetto al resto della popolazione) che sono geneticamente predisposti a ritardare il processo di invecchiamento e la fragilità associata all'età e possono essere considerati un modello positivo di fragilità.

Il nostro studio si concentra sull'approfondire il ruolo della proteina BPIFB4 e delle sue isoforme nel contrastare questo processo. Studi recentemente pubblicati hanno evidenziato come LAV-BPIFB4 sia in grado di recuperare la funzione endoteliale in topi anziani potenziando l'attività di eNOS e come questo meccanismo sia Ca²⁺-PKC alpha dipendente. Inoltre è stato anche osservato come in modelli murini di occlusione femorale dell'arteria, successivamente trattati con vettore adenovirale LAV-BPIFB4, essa sia in grado di aumentare l'homing di EPC (Endothelial Progenitor Cell) al sito ischemico rispetto ai topi controllo, meccanismo mediato dal recettore per chemochine CXCR4.

Dati recenti hanno evidenziato come topi ApoE^{-/-}, trattati con vettori adenovirali LAV-BPIFB4, mostrino sia una riduzione delle lesioni aterosclerotiche a carico dell'arco aortico che un potenziamento della reattività vascolare in arterie mesenteriche e femorali. Il coinvolgimento del pathway di CXCR4 è confermato dall'evidenza che il trattamento con il suo inibitore AMD3100 blocchi l'azione terapeutica di LAV-BPIFB4, inibendo la vasodilatazione e portando ad una perdita dell'organizzazione strutturale citosolica e nucleare delle cellule endoteliali del vaso.

Nell'insieme, questi dati forniscono evidenze preliminari dell'implicazione di BPIFB4 ed in particolare il ruolo dell'isoforma LAV-BPIFB4 nel mantenimento della corretta omeostasi del comparto vascolare e, di conseguenza, come LAV-BPIFB4 possa candidarsi come modulatore positivo dell'indice di fragilità nell'uomo. [Progetto Cariplo 2016].

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

L. Mancinelli^{1,2}, I. Badi², F. Zeni², F. Taccia², V. Saverio², A. Silanos², C. Saccu³, R. Spirito³, M.E. Bianchi⁴, A. Raucchi^{1,2}
¹Fondazione IEO-CCM, Milano; ²Unità di Cardio-Oncologia Sperimentale e Invecchiamento Cardiovascolare, CCM, Milano; ³Unità di Chirurgia vascolare e Endovascolare, CCM, Milano; ⁴Università 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. I tessuti molli di topi Hmgb1^{+/-} hanno una alterata tendenza a calcificare rispetto a topi Hmgb1^{+/+}. VSMCs silenziata per HMGB1 sono state generate e gli effetti di tale silenziamento sulla senescenza e calcificazione di queste cellule verranno presentati e discussi.

I nostri risultati suggeriscono che HMGB1 possa avere un ruolo nel determinare i meccanismi coinvolti nell'insorgenza della CV e rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico. [Progetto Cariplo 2015- Research on Ageing diseases 2015].

VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DI PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 (PCSK9) SUL METABOLISMO LIPIDICO A LIVELLO CARDIACO

L. Da Dalt¹, G. Balzarotti¹, M. Audano¹, L. Castiglioni¹, L. Sironi¹, N. Mitro¹, A.L. Catapano^{1,2}, G.D. Norata^{1,3}
¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; ²IRCCS MultiMedica Hospital, Sesto San Giovanni, Italia; ³Centro 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'espressione di recettori della famiglia delle LDL e CD36. La deficienza di PCSK9 porta quindi a una ridotta degradazione dei recettori della famiglia delle LDL, che presenti in numero maggiore nella membrana cellulare, mediano un accumulo di metaboliti potenzialmente tossici (acidi grassi a lunga catena, diacilgliceroli, triacilgliceroli e ceramidi) e colesterolo nei cardiomiociti, portando a danni cardiaci.

Scopo. Lo scopo di questo lavoro è di verificare se PCSK9 possa avere un ruolo nella regolazione del metabolismo lipidico a livello cardiaco e se questo si ripercuota in danni mitocondriali con disfunzione cardiaca.

Metodi. Sono stati usati modelli murini PCSK9-KO, WT e Albumin-cre/PCSK9-KO condizionale (senza espressione epatica di PCSK9) a dieta SFD (Standard Fat Diet) per 20 settimane. Su questi animali è stata effettuata un'analisi MRI ed è stato prelevato il cuore su cui sono state effettuate analisi di metabolomica, Oxygen Consumption Rate e analisi di espressione genica e proteica.

Risultati: La mancanza di PCSK9 porta ad una ridotta produzione di ATP che si rispecchia con una ridotta carica energetica cellulare (ATP; 15,07±1,49 vs 9,412±1,161 e Energy charge; 14,03±1,238 vs 9,439±1,161, p<0,05), indicando un alterato metabolismo dovuto a un possibile danno mitocondriale. Topi PCSK9 KO e Albcre-PCSK9 KO mostrano inoltre ridotti livelli di glucosio 6-P, ribosio-5P e erythrose-4P, associati ad aumentato flusso glicolitico, in parallelo a una riduzione degli intermedi del ciclo di Krebs negli animali PCSK9 KO e AlbCRE-PCSK9 KO rispetto ai WT. L'analisi WB dei lisati proteici ha mostrato una ridotta espressione di proteine chiave della catena di trasporto degli elettroni sia in modelli PCSK9 KO che AlbCRE-PCSK9 KO; alterazione che risulta essere associata ad alterato consumo di ossigeno legato alla respirazione cellulare. Nei topi PCSK9 KO è stato osservato come queste alterazioni portino a modifiche morfologiche che si rispecchiano in un aumentato spessore della parete ventricolare sinistra in sistole.

Conclusioni. I nostri dati suggeriscono che la mancanza di PCSK9 circolante sia associata ad un alterato metabolismo cardiaco che si ripercuote in una alterata morfologia e funzionalità cardiaca. [Progetto Cariplo 2016-0852].

COINVOLGIMENTO DELLA PROPROTEINA CONVERTASI SUBTILISINA / KEXINA TIPO 9 (PCSK9) NELLA CALCIFICAZIONE VALVOLARE AORTICA

P. Poggio¹, P. Songia¹, S. Barbieri¹, D. Moschetta¹, L. Cavallotti¹, V. Valerio¹, N. Ferri², I. Zanotti³, M. Camera^{1,4}

¹Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano; ²Università degli Studi di Padova; ³Università degli Studi di Parma; ⁴Università degli Studi di Milano,

Background. La degenerazione valvolare aortica (CAVD) colpisce il 3% della popolazione con età ≥ 65 anni. Studi clinici e sperimentali volti a trovare bersagli terapeutici non sono riusciti a modificare il decorso della patologia. È stato ipotizzato che la proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) possa accelerare la CAVD mediante meccanismi indipendenti dal recettore per le lipoproteine a bassa densità e che l'inibizione di PCSK9 possa ridurre la progressione della CAVD. Tuttavia, l'espressione valvolare di PCSK9 e il suo coinvolgimento nella CAVD rimane sconosciuto.

Metodi. Abbiamo utilizzato valvole aortiche umane (n=25) e topi *Pcsk9*^{-/-} (n=4) e *Pcsk9*^{+/+} (WT, n=4) di 12-mesi. Le cellule interstiziali (VIC) isolate dalle valvole mature sono state sottoposte a saggi di calcificazione (β -glicerofosfato e acido ascorbico (β GAA) per sette giorni) per analizzare la capacità osteogenica. Il sequenziamento di RNA è stato utilizzato per valutare i geni differenzialmente espressi nei due gruppi. L'analisi funzionale è stata eseguita con Cytoscape/ClueGO.

Risultati. PCSK9, presente in tutti i campioni umani analizzati, aumenta sia nel gruppo fibrotico sia in quello calcifico rispetto ai controlli sani (p<0.01). Il contenuto totale di calcio valvolare valutato nei topi *Pcsk9*^{-/-} era inferiore rispetto ai topi WT (1.5 \pm 0.7 vs. 10.1 \pm 0.5 ng di calcio/ μ g di proteine totali, rispettivamente; p=0.0002). La valutazione della capacità osteogenica ha rivelato che VIC-*Pcsk9*^{-/-} (non-trattate) erano in grado di calcificare in misura inferiore rispetto alle VIC-WT (4.4 \pm 0.6 vs. 8.0 \pm 0.5 ng/ μ g, rispettivamente; p=0.0001). Il trattamento con β GAA ha indotto la calcificazione in entrambi i tipi cellulari; tuttavia, è stata osservata un'infiorata capacità osteogenica (p=0.01) in VIC-*Pcsk9*^{-/-} (41.9 \pm 3.6 ng/ μ g) rispetto alle VIC-WT (55.9 \pm 3.5 ng/ μ g). RNA-Seq di VIC murine (*Pcsk9*^{-/-} vs. WT) ha identificato 363 geni differenzialmente espressi (P-aggiustato<0.05). L'analisi funzionale ha mostrato che i geni sovra-espressi in VIC-*Pcsk9*^{-/-} coordinano le vie molecolari di p38 e le modificazioni del citoscheletro, mentre quelli sotto-espressi controllano le vie molecolari coinvolte nell'apoptosi, nella proliferazione cellulare e nello stress ossidativo.

Conclusioni. Questi risultati mostrano che PCSK9 è espressa in VIC umane e aumenta durante la CAVD. I topi *Pcsk9*^{-/-} sono protetti dalla calcificazione valvolare. Pertanto, l'intervento farmacologico mirato a inibire PCSK9 può rappresentare un vantaggio per i pazienti affetti da questa patologia.

L'ALLARGAMENTO DEL DIAMETRO DELL'ARTERIA BRACHIALE È UN MARKER INDIPENDENTE DI EVENTI VASCOLARI NELLE DONNE MA NON NEGLI UOMINI

D. Coggi^{1,2}, M. Amato², D. Sansaro², A. Ravani², B. Frigerio², D. Baldassarre^{2,3}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; ²Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; ³Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università di Milano

L'allargamento del diametro della carotide comune (ICCAD, inter-adventitia common carotid artery diameter) o dell'arteria brachiale (DAB), misurati in zone libere da placca, migliora la stratificazione del rischio cardiovascolare, indipendentemente dai fattori di rischio e dall'aterosclerosi subclinica. Per chiarire se queste due variabili siano o meno espressione di fenomeni indipendenti abbiamo valutato se il mutuo aggiustamento faccia sparire una delle due associazioni. A tal fine, abbiamo misurato ecograficamente ICCAD e DAB in 4641 soggetti (44.6% donne; età 56.3 \pm 13.5) afferenti al Centro Cardiologico Monzino. Fra questi, 4271 erano asintomatici, 335 (64 donne) avevano avuto un infarto miocardico (IM) e 35 (11 donne) un ictus. Senza mutuo aggiustamento, sia DAB che ICCAD si associavano alla prevalenza di eventi vascolari (EV) combinati (IM+ictus) sia nelle donne [OR(95%CI) = 2.3(1.6, 3.3); p<0.0001 per il DAB e 2.1(1.6, 2.8); p<0.0001 per l'ICCAD] che negli uomini [OR(95%CI) = 1.6(1.3, 2.0); p<0.0001 per il DAB e 1.4(1.3, 1.6); p<0.0001 per l'ICCAD]. Il DAB era fortemente associato all'ICCAD sia negli uomini che nelle donne (Beta \geq 0.29, p<0.0001 in entrambi i sessi) ed entrambi erano fortemente associati all'età (Beta \geq 0.19, p<0.0001 in entrambi i sessi per il DAB; Beta \geq 0.29, p<0.0001 in entrambi i sessi per l'ICCAD). Era pertanto ipotizzabile che l'associazione DAB-EV fosse dovuta all'associazione DAB-ICCAD o DAB-età. Tuttavia, dopo aggiustamento per età, fattori di rischio, aterosclerosi subclinica e ICCAD, l'associazione DAB-EV persisteva solo nelle donne [OR(95%CI) = 2.2(1.1, 4.4); p<0.05]. Considerando separatamente IM ed ictus, risultava chiaro che l'associazione con gli EV combinati, osservata nelle donne, era dovuta principalmente all'associazione con l'IM. Infatti, l'OR(95%CI) dell'associazione DAB-IM aumentava fino a 2.6 (1.2, 5.6); p<0.05 nelle donne, mentre restava non significativa negli uomini. Questi dati suggeriscono che, almeno nelle donne, il DAB sia un marker di EV indipendente dall'ICCAD. Questa conclusione è anche supportata dal fatto che i determinanti indipendenti del DAB erano diversi da quelli dell'ICCAD. Ad esempio, il Framingham Risk Score era un determinante più forte dell'ICCAD (Beta \geq 0.30, p<0.0001 in entrambi i sessi) che del DAB (Beta \leq 0.20, p<0.0001 in entrambi i sessi). Si conclude che, almeno nelle donne, la misura del DAB migliora la stima del rischio cardiovascolare globale indipendentemente dall'ICCAD.

INDICE DIETETICO INFIAMMATORIO E PARAMETRI METABOLICI NELLA POPOLAZIONE GENERALE

E. Mattavelli¹, L. Redaelli¹, C. Tidone¹, L. Grigore^{1,3}, P. Magni^{1,3}, F. Pellegatta^{1,3}, V. Zampoleri¹, A. Baragetti^{1,2}, A.L. Catapano^{2,3}
¹SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milano; ²Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ³IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milano

Introduzione. La low-grade inflammation è un fattore patogenico per l'aterosclerosi, che è la causa principale di eventi cardiovascolari (CVD).

Scorrette abitudini alimentari sono un fattore di rischio per le CVD ed è noto che l'apporto di macro- e micro-nutrienti con dimostrate attività anti- oppure pro-infiammatorie in vitro contribuisca a favorire la low-grade inflammation.

Per valutare questo potenziale infiammatorio è stato sviluppato l'Indice Dietetico Infiammatorio (DII: "Dietary Inflammatory Index") e il nostro obiettivo è stato di valutare la sua associazione con parametri cardiometabolici e di rischio CV.

Materiali e Metodi. Sono stati analizzati i diari alimentari settimanali raccolti da 167 soggetti (Studio PLIC), attraverso l'attività ambulatoriale presso il Centro per lo Studio della Aterosclerosi (Ospedale Bassini). Sono state raccolte le informazioni circa la storia clinica e del profilo antropometrico e biochimico.

Risultati. Dei soggetti inclusi, 71 erano uomini e 96 donne, con età media di 65±11 anni e BMI di 26.6±4.1 kg/m². Da 75 dei diari analizzati abbiamo calcolato un DII negativo (-1.1±0.68), indice di un'alimentazione antinfiammatoria, mentre da 92 è stato derivato un DII positivo (1.2±0.9), indice di un'alimentazione pro-infiammatoria. Il DII pro-infiammatorio si associava a un ridotto consumo di pane, pasta, frutta, verdura e, a un ridotto apporto nutrizionale di proteine, acidi grassi mono- e poli-insaturi, carboidrati, fibre e vitamine. Inoltre, esso rifletteva anche una ridotta aderenza alla dieta mediterranea, in quanto associato inversamente allo score PREDIMED (R=-0.4 e p<0.001).

Abbiamo inoltre rilevato che il DII pro-infiammatorio era significativamente associato a ridotta attività fisica, consumo di alcol, a una riduzione di HDL-C (R=-0.14 e p=0.03), ApoA-I (R=-0.17 e p=0.03), e a un aumento in trigliceridi (R=0.17 e p=0.09). Tuttavia, il DII pro-infiammatorio non correlava né con i valori di proteina C-reattiva (CRP) né con lo spessore medio-intimale né con la presenza di aterosclerosi subclinica carotidea e nemmeno con il rischio cardiovascolare (algoritmo SCORE).

Conclusioni. Questi dati suggeriscono che il DII pro-infiammatorio si associa a scorrette abitudini alimentari, a parametri clinici cardio-metabolici, malgrado la relazione con determinanti clinici di rischio CV resti da chiarire, così da richiamare l'attenzione sulla promozione di una dieta antinfiammatoria per ridurre il rischio di CVD.

ACCUMULO DI ACIDI GRASSI DURANTE LA LIPEMIA POST-PRANDIALE: FOCUS SU CD36

V. Zampoleri^{1,2}, A. Baragetti^{1,2}, F. Bonacina¹, S. Pedretti¹, L. Grigore^{2,3}, F. Pellegatta^{2,3}, L. Redaelli², N. Mitro¹, G.D. Norata^{1,4}, A.L. Catapano^{1,3}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milano; ³IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milano;

⁴School of Biomedical Sciences, Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, Perth, Western Australia

Scopo. CD36 (Cluster of Differentiation CD36) è una glicoproteina di membrana espressa ubiquitariamente con elevata affinità per ligandi quali lipoproteine ossidate e acidi grassi (FA). Il ruolo di CD36 è stato ampiamente studiato in diversi tessuti metabolici e nell'aterosclerosi; l'elevata espressione anche in cellule leucocitarie circolanti (PBMCs) suggerisce un suo possibile ruolo anche in queste cellule. Lo scopo di questa analisi è stato quello di investigare se le variazioni nel contenuto di FA cellulare correlino con quelle di CD36 in risposta all'assunzione di un carico orale di lipidi (OFL).

Metodi. Soggetti volontari sani sono stati sottoposti ad un carico orale di lipidi e abbiamo quindi determinato: il quantitativo di FA nel plasma e nei PBMCs; le variazioni di espressione genica e proteica nei PBMCs durante la lipemia postprandiale (PP) in seguito a OFL. Successivamente il carico lipidico è stato effettuato in soggetti portatori di una variante di CD36, rs1761667, associata ad un ridotto trascritto e produzione della proteina, con l'intento di studiare se la modulazione dell'espressione di CD36 in vivo si associ a una diversa risposta postprandiale.

Risultati. Già a tre ore dall' OFL, si apprezza un aumento significativo di trigliceridi (TG) nel plasma ed un loro arricchimento nelle lipoproteine ricche in trigliceridi, parallelamente ad un'aumentata espressione genica di IL-6, IL-1β MCP-1 e TNF-α supportando l'aumento di infiammazione cellulare durante la fase PP. È stato inoltre osservato un aumento di FA nel plasma e nei PBMCs, suggerendo che l'aumento della lipemia plasmatica si associa ad un aumentato accumulo intracellulare di FA nelle cellule circolanti. Nelle stesse cellule sono stati osservati aumenti significativi di espressione genica di CD36 (+14±11,34 folds of induction). Inoltre nelle cellule isolate dai portatori dell'allele mutato durante la fase PP, le quali mostravano una riduzione del trascritto (0,44±0,29 folds of induction) e dei livelli di CD36 (-21%), si osservava una ridotta concentrazione di FA, rispetto ai soggetti con l'allele comune.

Conclusioni. La risposta post-prandiale si associa a variazioni di CD36 nelle cellule circolanti associata a cambiamenti nel profilo infiammatorio. La rilevanza fisiopatologica di questo meccanismo rimane da esplorare.

DIFFERENZE DI GENERE NELL'ADERENZA ALLA TERAPIA CON STATINE

F. Galimberti¹, E. Olmastroni¹, M.T. Boccalari¹, E. Tragni¹, M. Casula¹, F. Rea², G. Corrao², A.L. Catapano^{1,3}

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

Introduzione. Diversi studi hanno dimostrato una differenza di genere non solo nella risposta ai farmaci, ma anche nel loro utilizzo. Obiettivo di questo studio era valutare l'effetto del genere sull'aderenza alla terapia con statine e se potenziali fattori influenzanti abbiano un impatto diverso tra uomo e donna.

Metodi. È stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo, selezionando nel database amministrativo del Servizio Sanitario della Lombardia gli assistiti over 45 aventi una prima prescrizione di statine tra 01/01/2002 e 31/12/2009. È stata valutata l'aderenza nel primo anno mobile di terapia come MPR (*Medication Possession Ratio*), calcolando il rapporto tra il numero di dosi giornaliere del farmaco e il tempo di osservazione, definendo un livello ottimale di aderenza $\geq 0,80$. Mediante modelli di regressione log-binomiale, stratificati per genere, sono stati calcolati i rischi relativi (RR) e gli intervalli di confidenza al 95% (IC95%) per l'associazione tra l'aderenza ottimale ed alcuni fattori influenzanti.

Risultati. Sono stati identificati 764.342 nuovi utilizzatori di statine, di cui il 31,0% con una sola prescrizione. Tra i soggetti con più di una prescrizione ($n=527.485$), il 48,4% era di sesso femminile, l'età media era di $65,4 \pm 9,9$ anni per le femmine e $62,3 \pm 10,2$ per i maschi. L'MPR medio per gli uomini era maggiore rispetto alle donne ($0,64 \pm 0,28$ vs $0,58 \pm 0,28$; $p < 0,0001$). Anche stratificando per classi di età, gli uomini risultavano essere più aderenti. Dal modello è emerso che la presenza di diabete, comorbidità (Charlson score ≥ 1) e l'uso di statine ad alta potenza erano associati a una maggiore probabilità di aderenza, senza distinzione di genere. Nei soggetti di genere maschile, una maggiore probabilità di essere aderenti, rispetto alle stesse condizioni valutate nel sottogruppo femminile, era evidente in presenza di terapia antipertensiva (RR 0,87; IC95% 0,87-0,88 vs RR 0,93; IC95% 0,92-0,93) e di eventi cardiovascolari pregressi (RR 0,80; IC95% 0,80-0,81 vs RR 0,87; IC95% 0,86-0,88).

Conclusioni. Tra gli utilizzatori di statine, le donne presentavano un livello medio di aderenza inferiore a quello degli uomini, indipendentemente dall'età. Sono necessarie ulteriori ricerche per individuare gli interventi più adatti ad aumentare l'aderenza alla terapia, al fine di migliorare la salute e assicurare un più efficace utilizzo delle risorse.

PREVALENZA DI SINTOMATOLOGIA MUSCOLO-SCHELETRICA ASSOCIATA AL TRATTAMENTO CON STATINA SUL TERRITORIO ITALIANO: LO STUDIO PROSISA

M. Gazzotti¹, M. Casula¹, F. Bonaiti¹, L. Grigore^{2,3}, A.L. Catapano^{1,2} on behalf of the PROSISA Group
¹*Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano;* ²*IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano;* ³*Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano*

Introduzione. I sintomi muscolari associati alle statine (SAMS) rappresentano gli effetti avversi predominanti in corso di terapia statinica, contribuendo significativamente all'interruzione del trattamento con conseguente impatto su aderenza e risultati clinici. Tuttavia, una diagnosi di intolleranza è complessa poiché non vi è consenso unanime sulla definizione, i fattori di rischio possono variare a seconda della popolazione considerata e la segnalazione di sintomi muscolari è soggettiva e spesso influenzata da comorbidità.

Scopo e Metodi. Lo studio PROSISA (Project Statin Intolerance SISA) è uno studio di coorte osservazionale, multicentrico, retrospettivo avente come obiettivo primario la determinazione della prevalenza di intolleranza alla terapia con statina per comparsa di sintomatologia muscolo-scheletrica in pazienti affetti da dislipidemia e trattati con statina afferenti a centri specialistici tra 1° gennaio 2006 e 31 dicembre 2015. Sono stati raccolti dati anamnestici, valori biochimici prima e durante il trattamento statinico ed eventuale comparsa di sintomi muscolari.

Risultati. Nei primi sei mesi, la coorte PROSISA comprendeva 6429 pazienti (età media $66,7 \pm 12$ anni; 53,9% maschi) trattati con statina. Durante la terapia, 787 pazienti (12,2%), principalmente trattati con simvastatina (30,6%), rosuvastatina (28,3%) e atorvastatina (27,1%), hanno manifestato sintomi muscolari: mialgia (74,2%), crampi (25,8%), fatica (18,8%), miosite (1,4%) e rabdomioli (0,8%). Di questi, 375 pazienti sono stati sottoposti a dechallenge, con scomparsa di sintomatologia muscolare nel 87,2% dei casi, mentre complessivamente 503 pazienti sono stati sottoposti a rechallenge (237 con cambio di statina/riduzione del dosaggio senza interruzione della terapia) principalmente con rosuvastatina (32,6%) e simvastatina (30,4%) a basso dosaggio, con ricomparsa di sintomatologia muscolare in 151 pazienti. Tra questi, il principale sintomo muscolare riportato è stato mialgia (76,2%), mentre non sono stati registrati casi di miosite e rabdomioli.

Conclusioni. Questa analisi preliminare offre una prima caratterizzazione dei pazienti con SAMS. La percentuale di pazienti in cui l'intolleranza è stata confermata da dechallenge/rechallenge è compresa tra il 26% e 30%, sottolineando quindi la necessità di non soffermarsi alla semplice comparsa di sintomatologia muscolare per una diagnosi definitiva di SAMS e interruzione del trattamento. Solo i risultati finali dello studio permetteranno di ottenere una panoramica completa dell'identificazione e della gestione di SAMS sul territorio italiano.

VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE DEL DUTCH LIPID CLINIC NETWORK SCORE UTILIZZANDO UN DATABASE ITALIANO DI PAZIENTI CON IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

E. Olmastroni¹, M. Casula¹, A. Pirillo^{2,3}, M. Arca⁴, M. Averna⁵, S. Bertolini⁶, S. Calandra⁷, P. Tarugi⁸, A.L. Catapano^{1,3}, on behalf of the LIPIGEN Group

¹Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; ²Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale E. Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; ³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano, Italia ⁴Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma; ⁵Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S.), Università di Palermo; ⁶Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova; ⁷Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena; ⁸Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

Introduzione. L'ipercolesterolemia familiare (FH) è uno dei più comuni disordini genetici caratterizzato da elevati livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C) e un aumento del rischio di cardiopatia coronarica precoce. Sebbene sia un disturbo grave, tale malattia è attualmente sotto-diagnosticata. Il Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) score è comunemente usato dagli operatori sanitari nel contesto della medicina generale come strumento di aiuto per l'identificazione di soggetti adulti a rischio di FH.

Obiettivi. Valutare la performance del DLCN score, stabilendo se eventuali criteri mancanti possano influenzare il riconoscimento di soggetti FH.

Metodi. I pazienti sono arruolati nello studio LIPIGEN (Lipid TransPort Disorders Italian GENetic). L'analisi è stata condotta su pazienti con mutazione positiva, di età pari o superiore a 18 anni, sottoposti a valutazione clinica e con informazioni disponibili sui livelli di LDL-C pre-trattamento.

Risultati: Il DLCN score è stato applicato su 1377 adulti (età media 42,9±14,2 anni) con diagnosi genetica di FH. Il 28,5% del campione ha ricevuto una diagnosi probabile di FH, mentre per il 37,9% la diagnosi era certa. In totale, il 43,4% aveva almeno un dato mancante sugli 8 criteri utilizzati per il calcolo dello score, mentre il 10,0% dei soggetti aveva almeno 4 informazioni mancanti. Se analizzati in base al tipo di dato mancante, ad una percentuale più alta di soggetti con informazioni mancanti nella storia clinica (54,6%) o nell'esame obiettivo (40,4%) è stata attribuita una diagnosi possibile di FH (punteggio DLCN 3-5). Inoltre, è emerso che il DLCN score può differire sensibilmente a seconda del valore di LDL-C pre-trattamento utilizzato per il calcolo del punteggio (reale o stimato). In particolare, si osserva una sovrastima del numero di pazienti con diagnosi certa di FH nel caso in cui vengano considerati per la diagnosi, in assenza dei dati reali, ipotetici livelli di LDL-C pre-trattamento stimati sulla base del farmaco e della dose.

Conclusioni. Sebbene il DLCN score sia uno strumento utile per la diagnosi di FH, il calcolo di questo punteggio può essere limitato dalla difficoltà di ottenere tutte le informazioni necessarie, sottolineando il ruolo cruciale del giudizio clinico nell'identificazione dei soggetti con ipercolesterolemia familiare.

L'ESPOSIZIONE A LUNGO TERMINE ALL'INQUINAMENTO AMBIENTALE AUMENTA I LIVELLI CIRCOLANTI DI PCSK9 IN SOGGETTI OBESI

C. Macchi¹, N. Ferri², C. Favero³, L. Cantone³, L. Vigna⁴, A.C. Pesatori^{3,4}, M.G. Lupo², C.R. Sirtori⁵, A. Corsini^{1,6}, V. Bollati^{3,4}, M. Ruscica¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova; ³EPIGET Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan; ⁴Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milan; ⁵Centro Dislipidemie, A.S.S.T. Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan; ⁶IRCCS, MultiMedica, Milano

Introduzione e Scopo. L'esposizione all'inquinamento ambientale e al particolato atmosferico (PM) è associata a una maggiore percentuale di decessi, la maggior parte dei quali dovuti a cause cardiovascolari. Dati epidemiologici hanno dimostrato come ci sia un aumento della mortalità compresa tra lo 0,5% e il 2% per ogni incremento di 10-20 µg/m³ del PM. L'obesità, uno dei principali fattori di rischio nell'ambito delle patologie cardiovascolari, aumenta la suscettibilità agli eventi avversi mediati dall'esposizione al PM. La proteina PCSK9 (proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9), il principale regolatore della colesterolemia LDL, è associata a un numero sempre maggiore di fattori di rischio cardiovascolare quali l'aterosclerosi e l'infiammazione. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare, in una coorte di pazienti obesi, l'effetto dell'esposizione al PM₁₀ (particelle con diametro inferiore a 10 µm) sui livelli circolanti della proteina PCSK9 e come questi possano essere associati al Framingham Risk Score (FRS).

Metodi. Mediante analisi ELISA, la proteina PCSK9 è stata dosata in 500 soggetti obesi appartenenti alla coorte SPHERE (Susceptibility to Particle Health Effects, miRNAs and Exosomes). Le concentrazioni giornaliere di PM₁₀ sono state monitorate dall'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Lombardia.

Risultati. In soggetti obesi (BMI 33,3±5,2 kg/m²) un'esposizione annuale al PM₁₀ di 40,12±4,71 µg/m³ è coincisa con valori circolanti della proteina PCSK9 pari a 248,7±78,6 ng/mL. In analisi univariata, l'esposizione annuale al PM₁₀ è risultata positivamente associata ai livelli circolanti di PCSK9 (β=1,83; SE=0,75; p=0,014) così come a quelli di LDL-C (β=0,33; SE=0,10), TGs (β=0,11; SE=0,05) e HDL-C (β=0,71; SE=0,24). In un modello di regressione lineare multivariata, l'associazione tra PM₁₀ e PCSK9 è risultata consistente soltanto in quei soggetti con concentrazioni plasmatiche basse di interferone-γ. I livelli di PCSK9 sono corrisposti a un aumento dell'algoritmo Framingham per la stima del rischio di infarto e morte cardiaca; per un incremento di 100 ng/mL della proteina PCSK9 si è stimato un +15,8% del FRS.

Conclusioni. I soggetti obesi, con un basso grado di infiammazione, sembrano essere più suscettibili all'esposizione al PM₁₀ come indicato dalle aumentate concentrazioni plasmatiche di PCSK9.

MECCANISMI TRASCRIZIONALI RESPONSABILI DELL'INVECCHIAMENTO DEL SISTEMA IMMUNITARIO

V. Piccolo¹, S. Polletti¹, E. Gardiman³, S. Ghisletti², E. Prosperini², N. Tamassia³, F. Aguilera³, M.A. Cassatella³, G. Natoli^{1,2}
¹Humanitas University, Rozzano, Milano; ²Humanitas Clinical Research Center, Rozzano, Milano; ³University of Verona

L'aumento di malattie infettive nell'anziano è un problema di primaria importanza socio-sanitaria e può avere origine multifattoriale, essendo in parte legato a variazioni dello stile di vita, errate abitudini alimentari e l'uso crescente di farmaci.

Inoltre, evidenze scientifiche recenti suggeriscono la possibilità che alcuni tipi di cellule dell'immunità adattiva ed innata possano presentare alterazioni funzionali in individui anziani sani, predisponendo così allo sviluppo di alcuni tipi di malattie infettive. Mentre le alterazioni delle cellule dell'immunità adattiva, e in particolare i linfociti T, sono ben documentate negli anziani, la comprensione del funzionamento dei neutrofili in soggetti in età avanzata è molto meno sviluppata, in parte a causa di difficoltà tecniche nel loro studio. Visto il ruolo dei neutrofili come prima linea essenziale di difesa contro le malattie infettive, la caratterizzazione della loro funzionalità in soggetti anziani normali può fornire indicazioni rilevanti per la profilassi e la terapia di malattie infettive comuni in età avanzata.

Il progetto finanziato dalla Fondazione Cariplo si propone di complementare approcci cellulari e funzionali con tecnologie genomiche di ultima generazione e strumenti di analisi computazionale e statistica, al fine di:

- acquisire maggiori conoscenze riguardo al funzionamento dei neutrofili i soggetti anziani;
- identificare meccanismi regolatori alla base di alterazioni del loro funzionamento in soggetti anziani;
- delineare le basi per eventuali interventi correttivi. [Progetto CARIPLO 2015-0584].

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

F. Bonacina¹, D. Coe², G. Wang², M.P. Longhi², A. Baragetti^{1,3}, A. Moregola¹, K. Garlaschelli³, P. Uboldi¹, F. Pellegatta³, L. Grigore³, L. Da Dalt¹, A. Annoni⁴, S. Gregori⁴, Q. Xiao², D. Caruso¹, N. Mitro¹, A.L. Catapano^{1,5}, F.M. Marelli-Berg², G.D. Norata^{1,3}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²William Harvey Research Institute, Queen Mary University, London, UK; ³Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; ⁴San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano; ⁵IRCCS MultiMedica, Milano

L'attivazione del sistema immunitario ricopre un ruolo sempre più rilevante nella fisiopatologia delle malattie cardio-metaboliche. Rimane tuttora da chiarire se tale attivazione sia la conseguenza della dislipidemia o di un'alterazione del metabolismo lipidico intracellulare. Scopo progetto Cariplo 0524-2015 è studiare il ruolo dell'apolipoproteina E (apoE), una proteina a ponte tra il metabolismo lipidico sistemico e cellulare, sulla risposta immunitaria.

Rispetto a WT, topi apoE KO presentano un incremento della risposta immunitaria come dimostrato da un'espansione di linfociti ad attività effettrice TEM (CD4+CD44+CD62L, $p < 0,05$), valutato tramite analisi citofluorimetrica della milza. Tale fenotipo si osserva sia in condizioni basali che dopo un saggio di allotrapianto di cute, evento associato anche ad un rigetto più veloce ($p < 0,05$) nei topi apoE KO. Inoltre, lo stesso modello di allotrapianto, eseguito in topi WT e apoE KO sottoposti a trapianto di midollo osseo da donatori WT o apoE KO, ha dimostrato che l'aumentata attivazione immunitaria sia il risultato della mancanza di apoE a livello mieloidi ($p < 0,05$) e sia indipendente dall'ipercolesterolemia. Tra le cellule di origine mieloidi, oltre ai macrofagi, apoE viene espressa dalle cellule dendritiche (DCs) e la sua mancanza si associa ad un'aumentata abilità delle DCs di indurre la proliferazione di linfociti T ($p < 0,01$). Tale fenomeno è stato associato ad un aumento di colesterolo in membrana ($p < 0,01$) che favorisce la co-localizzazione del complesso maggiore di istocompatibilità II (MHCII, $p < 0,01$), responsabile dell'attivazione linfocitaria.

Nell'uomo, i portatori dell'isoforma ApoE4, caratterizzati da ipercolesterolemia, presentano livelli significativamente aumentati di CD4+TEM rispetto ai portatori dell'isoforma ApoE2 ed E3 (analisi citofluorimetriche su soggetti appartenenti allo studio PLIC). Esperimenti di co-cultura tra linfociti CD4+ e DCs derivate da mononucleati isolati da sangue intero, mostrano un aumento della polarizzazione dei linfociti verso i TEM nei carrier dell'isoforma ApoE4, fenotipo corretto dall'incubazione di queste cellule con la forma wild type apoE3.

Complessivamente, questi dati suggeriscono che apoE controlli in maniera autocrina l'abbondanza di colesterolo nelle DCs e influenzi di conseguenza la localizzazione del complesso MHCII, agendo quindi da modulatore della risposta immunitaria adattativa.

Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. Nat Commun. 2018;9:3083.

OBESITÀ E INFIAMMAZIONE CRONICA: RUOLO FISIOPATOLOGICO DEL LATTATO

M. Ruscica¹, C. Macchi¹, A. Baragetti^{1,2}, A. Moregola¹,
F. Bonacina¹, M. Botta¹, F. Pellegatta², L. Grigore², P. Magni¹,
A.L. Catapano^{1,4}, C. Mauro³, D. Norata^{1,2}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milano; ³Barts and The London School of Medicine and Dentistry, William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, London, United Kingdom; ⁴IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milano

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.

Scopo. Il presente progetto si pone l'obiettivo di approfondire il ruolo del sistema immunitario nel contesto dell'obesità e delle caratteristiche metaboliche a essa associate. L'impatto del trasportatore del lattato (Slc16a1), fondamentale per la migrazione dei linfociti, è stato valutato sia nel contesto di un modello animale che nella popolazione PLIC (Progressione delle Lesioni intimali Carotidiche).

Risultati. Per quanto riguarda il modello animale, sono stati utilizzati 4 quattro gruppi sperimentali come di seguito elencato:

- 1) topi transgenici Slc16a knockout specifici per i linfociti T CD4⁺ (KO) alimentati, per 12 settimane, sia con una dieta "high-fat" che chow-diet;
- 2) topi Slc16aflox/flox (control) per il canale Slc16a alimentati, per 12 settimane, sia con una dieta "high-fat" che chow-diet.

La delezione specifica del canale Slc16a nei linfociti T CD4⁺ sembra contrastare l'aumento di peso determinato dalla HFD. Rispetto al basale, alla fine delle 12 settimane, il peso dei topi KO era aumentato di 6.65 gr vs 13.04 gr dei topi controllo (Slc16aflox/flox). L'effetto protettivo è risultato evidente anche nel contesto della sensibilità glicemica. Dopo iniezione di 2g/kg di glucosio, l'AUC tra i due genotipi differiva significativamente: 26605 (KO) vs 45587 (control). La popolazione dello studio PLIC (2606 soggetti) è stata genotipizzata per la variante missenso, con perdita di funzione, rs1049434 (Asp490Glu) del canale del lattato, Slc16a1. La presenza di tale variante, determina un aumento dell'attività del trasportatore Slc16a1 e mostra una prevalenza dell'allele minore pari a 43%. Utilizzando l'analisi in silico Genotype-Tissue Expression, si è trovato come il canale del lattato Slc16a1 fosse espresso in modo ubiquitario: fibroblasti, ventricolo sinistro, muscolo scheletrico e tessuto adiposo viscerale. La presenza dell'allele codificante per l'isoforma mutata del trasportatore Slc16a1 si associa con una più alta espressione sia nel tessuto adiposo sottocutaneo che viscerale; al contrario diminuita risulta l'espressione nei miociti del ventricolo sinistro, nel fegato e nella milza. [Progetto Cariplo: 2015].

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

E. Martini¹, M. Kallikourdis^{1,2}, P. Carullo^{3,4}, C. Sardi¹,
C. M. Greco³, G. Roselli¹, F. Riva⁵, A. M. Ornbostad Berre⁶,
T. O. Stølen⁶, A. Fumero⁷, G. Faggian⁸, E. Di Pasquale^{4,3}, L. Elia³,
C. Rumio⁹, D. Catalucci^{10,4}, R. Papait^{3,4}, G. Condorelli^{3,2}

¹Adaptive Immunity Laboratory, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano; ²Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Rozzano, Milano; ³Department of Cardiovascular Medicine, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milano; ⁴Institute of Genetic and Biomedical Research (IRGB) - UOS of Milan, National Research Council of Italy, Rozzano, Milano; ⁵Department of Veterinary Sciences and Public Health (DIVET), Università degli Studi di Milano; ⁶KG Jebsen Centre of Medicine, Department of Circulation and Medical Imaging, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway; ⁷Cardiac Surgery, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milano; ⁸Department of Cardiac Surgery, University of Verona; ⁹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ¹⁰Laboratory of Signal Transduction in Cardiac Pathologies, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milano

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). [Progetto Cariplo 2014-1184].

T cell costimulation blockade blunts pressure overload-induced heart failure. Nat Commun. 2017;8:14680.

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

L. Oberti¹, M. Tasaki², P. Swuec¹, P. Rognoni², M. Maritan¹,
S. Ricagno¹, F. Lavatelli²

¹Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano;

²Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche,
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università di Pavia

Introduzione. L'amiloidosi AL è una patologia sistemica causata dall'aggregazione fibrillare di catene leggere (CL) immunoglobuliniche monoclonali a livello dei tessuti bersaglio, con disfunzione degli organi coinvolti. La presenza e la severità del coinvolgimento cardiaco sono i fattori prognostici più importanti. Analisi precedentemente condotte nell'ambito di questo progetto ci hanno permesso di dimostrare che una combinazione di ridotta stabilità di folding ed aumentata flessibilità conformazionale correlano con la tossicità. Le linee di ricerca attuali sono dedicate a definire la correlazione tra struttura primaria e cardiotossicità, ed a descrivere la struttura e la composizione molecolare delle fibrille di amiloidi naturali.

Metodi. La sequenza aminoacidica di una CL amiloidogenica cardiopatica rappresentativa (denominata H6) è stata modificata, mediante mutagenesi sito specifica, a livello di regioni strutturalmente distintive. La tossicità del mutante, rispetto a quella della proteina wild type, è stata valutata in colture di fibroblasti cardiaci umani (hCF) e nel modello animale *C. elegans*. La composizione biochimica di fibrille di amiloide estratte da cuore di un paziente deceduto per amiloidosi AL è stata studiata mediante proteomica (elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa) e proteolisi limitata. La struttura delle fibrille è in corso di studio mediante crio microscopia elettronica (cryo-EM).

Risultati. Il mutante della CL cardiopatica (H6mut) è risultato possedere una tossicità significativamente inferiore nei confronti sia di hCF che di *C. elegans*. La caratterizzazione strutturale del mutante, l'interazione con le cellule e le cinetiche di tossicità sono in corso. Abbiamo inoltre ottenuto abbondanti fibrille di amiloide da tessuto miocardico, con morfologia conservata. Le analisi proteomiche indicano che le fibrille siano costituite da una eterogenea popolazione di frammenti N-terminali della CL precursore. La proteolisi limitata suggerisce che il dominio N-terminale della CL, resistente alla digestione, sia protetto all'interno del core della fibrilla ed abbia un ruolo centrale nell'amiloidogenesi. Le immagini delle fibrille mediante crio-microscopia elettronica sono state acquisite e l'analisi dei dati è in corso.

Conclusioni. Il nostro studio supporta l'ipotesi di un legame fra struttura e tossicità delle CL cardiotossiche. La caratterizzazione delle fibrille cardiache fornirà informazioni chiave per definire il ruolo delle diverse regioni proteiche nella aggregazione ed il processo di amiloidogenesi. [Cariplo giovani 2016-0489].

LE ALTERAZIONI IMMUNITARIE INDOTTE DALL'ETÀ CONTRIBUISCONO AL PEGGIOR ESITO DELL'ICTUS ISCHEMICO NEGLI ANZIANI

G.S. Gullotta, D. De Feo, T. Vigo, N. Maugeri, P. Ronchi,
F. Ivaldi, M. Gallizioli, C. Doglioni, G. Comi, A. Uccelli,
G. Martino, M. Bacigaluppi
Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Studi recenti hanno dimostrato come l'invecchiamento è associato a cambiamenti nel sistema ematopoietico. Questi cambiamenti sono stati associati a complicazioni vascolari nel diabete, a condizioni aterosclerotiche e ad un'aumentata frequenza di complicanze cardiovascolari negli anziani.

Scopo di questo studio è stato quello di studiare come le alterazioni della risposta infiammatoria, che si verificano negli anziani, influenzano sull'esito dell'ictus sperimentale.

Topi giovani (2 mesi) e anziani (>18 mesi) C57Bl/6J sono stati sottoposti a occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media per 45 minuti (MCAo). Le analisi di citometria a flusso per le cellule infiammatorie sono state eseguite su sangue, midollo osseo e cervello prima e 2 giorni dopo ischemia. Il ringiovanimento del midollo osseo è stato eseguito su topi anziani mediante trapianto di midollo osseo da topo giovane.

I topi anziani mostrano dopo ischemia peggiore disabilità e mortalità rispetto ai topi giovani. Topi ischemici anziani hanno una peggiore riperfusione cerebrale e mostrano un significativo aumento dei marker di attivazione endoteliale. È stato inoltre osservato un aumento di stress ossidativo nell'area peri-ischemica degli anziani. L'ischemia cerebrale aumenta l'ematopoiesi mieloide legata all'età, determinando un aumento significativo del numero di granulociti circolanti e infiltranti il cervello dei topi anziani dopo ictus. Il trapianto di midollo osseo giovane negli anziani, ristabilisce conte ematiche periferiche normali e determina un miglioramento significativo dell'esito dell'ictus ischemico.

Le alterazioni correlate all'età nel compartimento ematopoietico sembrano quindi contribuire sostanzialmente al peggiorare esito dell'ictus degli anziani. Sono necessarie ulteriori analisi per identificare i mediatori molecolari ed occorre una validazione nell'ictus umano, prima di progettare strategie terapeutiche in grado di revertire questi fenomeni di senescenza immunitaria. [Progetto Cariplo Giovani Ricercatori 2015].

MC1R RIDUCE LA MIGRAZIONE DELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE AORTICHE MODULANDO LA VIA DI SEGNALE HSF1/P38-MAPK

V. Alfieri^{1,2}, F. Saporiti², F. Ferrari², L. Piacentini², E. Bono², M. Chiesa², M. Camera^{1,2}, G.I. Colombo²

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi, Milano; ²Unità di Immunologia e Genomica Funzionale, Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano

Introduzione. Il recettore-1 melanocortinico (MC1R) è un recettore accoppiato a proteine-G e appartiene ad un sistema ormonale che svolge diverse funzioni omeostatiche e protettive (1-3), inclusa la regolazione della migrazione cellulare. L'ormone α -melanotropo (α -MSH), principale agonista fisiologico di MC1R, riduce la migrazione di cellule infiammatorie/immunitarie come monociti, linfociti, neutrofilii (1) ed eosinofili (4). La migrazione di cellule muscolari lisce (SMC) è uno dei principali eventi alla base del rimodellamento vascolare patologico ed è importante trovare bersagli molecolari per prevenire questo processo. In questo studio, abbiamo valutato se SMC aortiche umane (HAoSMC) esprimessero MC1R e se la sua attivazione potesse controllare la loro migrazione.

Metodi. Abbiamo analizzato espressione e funzionalità di MC1R mediante RT-qPCR, western blot (WB) e misura della produzione di cAMP. Abbiamo valutato la migrazione delle HAoSMC sia con saggio direzionale (gap closure) che con saggio chemiotattico verso PDGF-BB (sistema Transwell). In esperimenti tempo-risposta, abbiamo analizzato effetti trascrizionali e vie di segnalazione del recettore mediante sequenziamento dell'RNA e WB.

Risultati. HAoSMC esprimono MC1R funzionalmente attivo. Nel saggio di migrazione direzionale, il trattamento con dosi fisiologiche di α -MSH riduce la velocità di chiusura del fronte cellulare,

con un picco del 20% tra le 9-12 ore ($p < 0.01$ vs cellule non trattate). Nel saggio di chemiotassi, abbiamo osservato una riduzione del 40% nella migrazione a 24 h dal trattamento ($p < 0.01$). Il pretrattamento con MSG-606, antagonista specifico di MC1R, preveniva l'inibizione della migrazione cellulare. I dati di sequenziamento dell'RNA mostravano diminuita espressione di geni coinvolti nella migrazione delle SMC, in particolare quelli sotto il controllo di fattori trascrizionali quali HSF1. Questo è direttamente collegato alla via di segnalazione delle MAPK (5). In effetti abbiamo osservato mediante WB che la fosforilazione di p38-MAPK, solitamente associata alla migrazione delle SMC (6), era significativamente ridotta dal trattamento con α -MSH ($p < 0.05$), così come l'espressione di HSF1. La defosforilazione di p38-MAPK era prevenuta dal pretrattamento con MSG-606.

Conclusioni. Questo studio mostra che l'attivazione di MC1R modula la migrazione delle SMC attraverso la via di segnalazione HSF1/p38-MAPK. Ciò rivela una nuova funzione per i recettori melanocortinici periferici, che può influenzare il rimodellamento vascolare controllando la migrazione delle SMC.

Bibliografia

1. Catania A, et al, Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation, *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 1-29.
2. Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev.* 2006; 27: 736-49.
3. Garcia-Borrón JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* 2005; 18: 393-410.
4. Raap, U., et al., Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2003; 171: 353-359.
5. Salinthon S, Tyagi M, Gerthoffer WT. Small heat shock proteins in smooth muscle. *Pharmacol Ther.* 2008; 119: 44-54.
6. Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 36: 49-56.