

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. Ubaldi, G.D. Norata, F. Fumagalli, L. Caffino
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

L'anoressia 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 trascrittomiche 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'inferiore 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, comorbilità (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 comorbilità.

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 mieloidale ($p < 0,05$) e sia indipendente dall'ipercolesterolemia. Tra le cellule di origine mieloidale, 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 amiloidogena 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.