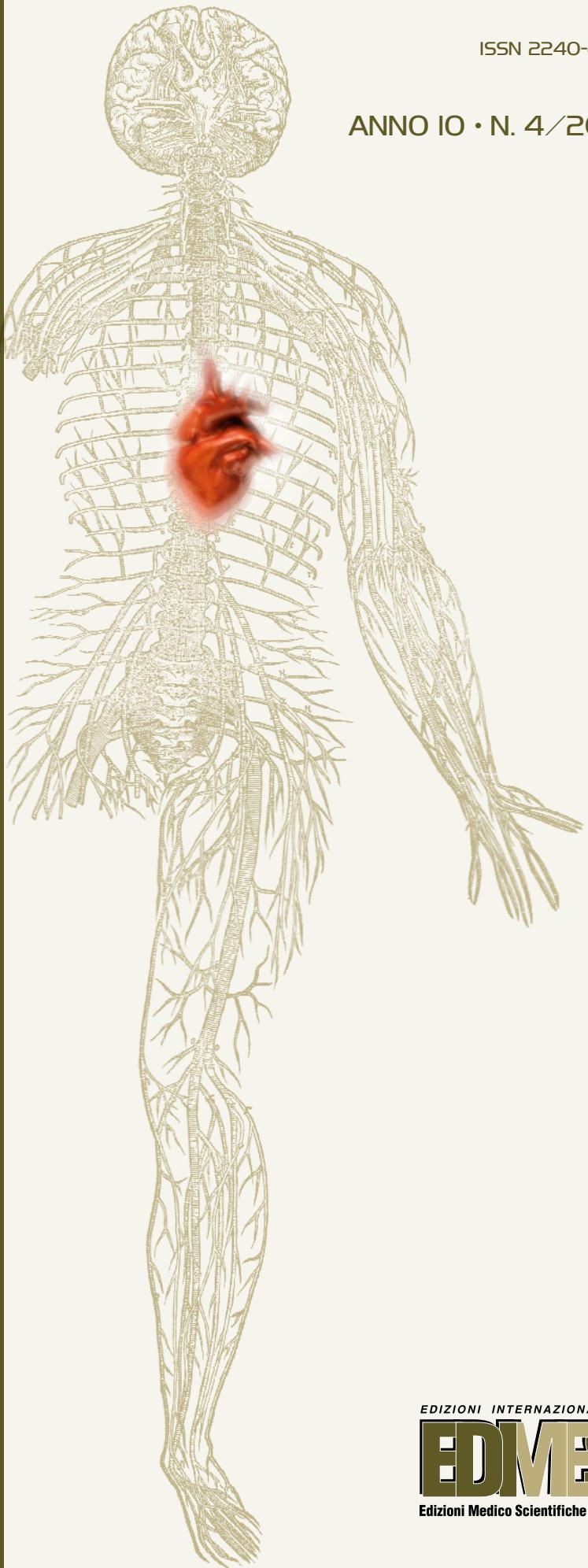


# GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI

ISSN 2240-4821

ANNO IO • N. 4/2019



EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

**EDMES**

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia



Rivista ufficiale della Società Italiana  
per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA)

**Direttori emeriti**

A. Ventura  
G.F. Salvioli  
G. Crepaldi  
E. Mannarino  
R. Fellin  
A. Mezzetti

**Direttore scientifico**  
E. Manzato (Padova)

**Editore**  
L. Cattin (Trieste)

**Vice Editore**  
F. Angelico (Roma)

**Responsabili di area**

*Review e Linee Guida* – D. Sommariva (Milano)  
*Ricerca e Farmacologia* – G.D. Norata (Milano)  
*Studi Clinici* – M. Pirro (Perugia)  
*Epidemiologia* – Salvatore Panico (Napoli)

**Comitato di Redazione**

A. Baragetti (Milano)  
C.M. Barbegalio (Palermo)  
A. Belfiore (Bari)  
F. Bonacina (Milano)  
M. Casula (Milano)  
M. Del Ben (Roma)  
O. Guardamagna (Torino)  
M.R. Mannarino (Perugia)  
T. Montalcini (Catanzaro)  
L. Pisciotti (Genova)  
A. Poli (Milano)  
T. Sampietro (Pisa)  
R. Sarzani (Ancona)  
G.B. Vigna (Ferrara)  
A. Zambon (Padova)

**Segreteria editoriale**

V. Flores d'Arcais  
E. Loggia  
R. Zecca  
Via Balzaretti, 7 - 20133 Milano  
E-mail: giornalearteriosclerosi@sisa.it

*In copertina:* De Humani Corporis Fabrica  
di Andreas Vesalius (Basilea, 1543)

# SOMMARIO

## ■ FOCUS

**PCSK9, colesterolo e malattia di Alzheimer:  
quali evidenze dalla ricerca di base** ..... 5

**PCSK9, cholesterol and Alzheimer's disease:  
evidence from basic research**

*Maria Pia Adorni, Massimiliano Ruscica, Nicola Ferri, Franco Bernini,  
Francesca Zimetti*

## ■ ATEROSCLEROSI CAROTIDEA

**Placca carotidea e malattia cerebrovascolare** ..... 21  
**Carotid plaque and cerebrovascular disease**  
*Francesco Moroni, Enrico Ammirati*

## ■ NUTRACEUTICA

**La nutraceutica nel bambino dislipidemico** ..... 32  
**Nutraceutics in the dyslipidemic child**  
*Giulia Massini, Raffaele Buganza, Luisa De Sanctis, Ornella Guardamagna*

## ■ FARMACI

**Effetti collaterali inconsueti o dubbi della terapia con statine** ..... 49  
**Unusual or doubtful adverse effects of HMG-CoA  
reductase inhibitors**  
*Daniela Tortola, Angela Colangiulo, Giovanni B. Vigna*

## ■ MEDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ

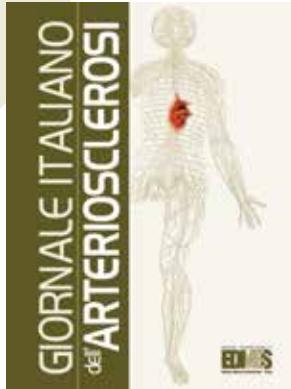
**Sulla malattia di L. van Beethoven** ..... 63  
**The disease of L. van Beethoven**  
*Renato Fellin, Jürgen Richert*

## ■ NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI

**ESC 2019** ..... 76

**Riassunto delle comunicazioni presentate  
al 33° Congresso Nazionale S.I.S.A.** ..... 81

**Indice degli Autori** ..... 133



## Consiglio Direttivo SISA

Enzo Manzato - *Presidente*  
Anna Belfiore  
Giulia Chiesa  
Francesco Cipollone  
Gennaro Marotta  
Antonino Saitta  
Anna Solini  
Patrizia Tarugi  
Gaetano Vaudo  
Maurizio Averna - *Past President*  
Marcello Arca - *Segretario*

## Presidenti Sezioni Regionali SISA

Marco Bucci (Adriatica)  
Piero Portincasa (Appulo-Lucana)  
Arcangelo Iannuzzi (Campania)  
Angelina Passaro (Emilia-Romagna)  
Maria Del Ben (Lazio)  
Alberico L. Catapano (Lombardia)  
Luigi Gentile (Piemonte-Liguria-  
Valle d'Aosta)  
Antonio Baule (Sardegna)  
Tiziana Montalcini (Sicilio-Calabria)  
Tiziana Sampietro (Toscana)  
Nadia Citroni (Triveneto)  
Giacomo Pucci (Umbria)

## Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi

Viale Maresciallo Pilsudski, 118  
00197 Roma

Autorizzazione Trib. di Milano n. 242  
del 21/09/2016

Direttore Responsabile: P. E. Zoncada

## Norme editoriali

### Pubblicità/Abbonamenti

*Redazione GIA*  
Via Balzaretti, 7  
20133 Milano  
Tel. 0249636373  
Fax 0249633384  
E-mail: giornalearteriosclerosi@sisa.it

### Condizioni di abbonamento

Canone per l'Italia € 65,00, per l'estero € 75,00.

### Periodicità

Trimestrale

### Scopi

Il "Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi" (GIA), è un periodico di aggiornamento che nasce come servizio per i medici, operatori sanitari e studenti di medicina e delle professioni sanitarie, con l'intenzione di rendere più facilmente disponibili informazioni e revisioni critiche nel campo dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate. Lo scopo della rivista è quello di assistere il lettore fornendogli:

- a) revisioni critiche di argomenti di grande rilevanza nel campo dell'arteriosclerosi sia per quanto riguarda gli aspetti di base che gli aspetti clinico-applicativi;
- b) quesiti relativi agli argomenti trattati per una verifica di auto apprendimento;
- c) opinioni di esperti qualificati sui nuovi sviluppi delle conoscenze sull'arteriosclerosi;
- d) lavori originali relativi ad aspetti di ricerca sanitaria nell'ambito dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate.

### TIPOLOGIA E STRUTTURA DEGLI ARTICOLI

GIA accetta le seguenti categorie di contributi: lavori originali, rassegne, casi clinici e forum dei lettori. Titolo e, se previsti, parole chiave e sommario dovranno essere sia in italiano che in inglese.

Le tabelle dovranno pervenire in formato editabile (word, excel, txt, ecc...).

Le figure dovreanno essere inviate oltre al formato originario anche in formato grafico (pdf, jpg, png, ecc...).

### Lavori originali

I lavori originali saranno sottoposti a processo di "peer review". La lunghezza del testo non deve superare le 4.000 parole (esclusa la bibliogra-

fia) ma incluso l'abstract, con un massimo di 4 figure o tabelle.

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo
- 2) Autori e loro affilazione
- 3) Nome e affilazione dell'autore corrispondente.

- **Sommario:** dovrà essere strutturato (premesse, obiettivi, metodi, risultati, conclusioni) e non dovrà superare le 250 parole.

- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.

- **Testo:** Il corpo del testo dovrà comprendere: a) Introduzione b) Materiali e metodi c) Risultati d) Discussione e) Tavole f) Figure g) Bibliografia.

### Bibliografia

Citazione di articoli su riviste: Es. 1: Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease. Am J Epidemiol 160: 421-429, 2004. Es. 2: Humphries SE, Whittall RA, Hubbard CS et al. Genetic causes of familial hypercholesterolemia in patients in the UK: a relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. J Med Genet 43: 943-949, 2006. Citazioni di capitoli di libri Assmann G, von Eckardstein A, Brewer H. Familial analphalipoproteinemia: Tangier disease. In "The metabolic and molecular bases of inherited disease", Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001; 2937-60.

### Rassegne

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo;
- 2) Autori e loro affilazione;
- 3) Nome e affilazione dell'autore corrispondente.

La lunghezza del testo non deve superare di norma le 5.000 parole, incluso, sommario, glossario, e l'elenco puntato degli argomenti affrontati (bullet points). Il numero massimo di figure e tabelle è 5. Il numero massimo di voci bibliografiche è 50. Le rassegne devono includere in appendice un questionario di autoapprendimento relativo all'argomento affrontato nella rassegna.

- **Sommario:** non dovrà superare le 250 parole.

- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.

- **Testo:** L'autore è invitato a suddividere la rassegna in capitoli e sotto-capitoli.

Al termine del testo è opportuno inserire un capitolo dedicato alle prospettive future con particolare riferimento agli aspetti clinico-applicativi.

**Glossario:** È uno strumento di comunicazione fortemente raccomandato.

Esso dovrebbe contenere una concisa ma esauriente spiegazione dei termini "nuovi o meno comuni" utilizzati nella rassegna. Qualora l'autore lo ritenga utile, al glossario può essere allegata una o più "finestre esplicative" dedicate ad argomenti a cui si fa riferimento nella rassegna e che non sono discussi in sufficiente dettaglio nel corpo del testo.

**Elenco degli argomenti trattati:** A conclusione della rassegna l'autore è invitato a fornire un conciso elenco puntato degli aspetti più rilevanti affrontati.

**Bibliografia:** Le citazioni bibliografiche dovranno essere numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo. Le pubblicazioni citate dovranno contenere il nome di tutti gli autori (fino a un massimo di 4). Nel caso gli autori fossero più di quattro, si mette dopo il terzo autore la scritta et al.

**Questionario di auto-apprendimento:** Per ogni rassegna il questionario dovrà contenere 5-10 domande con risposta a scelta multipla.

### Casi clinici

Si riferisce alla presentazione di un caso clinico, preparato su richiesta da medici esperti, che ha lo scopo di rafforzare standard di comportamento clinico, diagnostico e/o terapeutico, basati sulle evidenze.

### Forum su Medicina, Scienza e Società

Si tratta di articoli brevi o lettere all'editore (1.500 parole) sollecitati ad esperti, riguardanti commenti e/o opinioni su temi di particolare attualità. Il testo non dovrà superare le 1.500 parole. Non è richiesto un sommario. Le voci bibliografiche non devono superare il numero di 10 e devono essere riportate come indicate per le rassegne.

### NOTE PER GLI AUTORI

Il testo dell'articolo deve essere predisposto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh. I dischetti devono riportare sull'apposita etichetta il nome del primo autore, il titolo abbreviato dell'articolo, il programma di scrittura e la versione, ed il nome del contenuto/file.

L'autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora riproduca nel testo tabelle, figure, microfotografie od altro materiale iconografico, già pubblicato altrove. Tale materiale illustrativo dovrà essere riprodotto con la dicitura "per concessione di..." seguito dalla citazione della fonte di provenienza.

# PRESENTAZIONE DEL NUMERO

## ■ Focus

### PCSK9, colesterolo e demenza

PCSK9 sembra modulare i meccanismi patogenetici della malattia di Alzheimer e rappresentarne un potenziale bersaglio farmacologico.

## ■ Aterosclerosi Carotidea

### Placca carotidea e malattia cerebrovascolare

La relazione tra atherosclerosi carotidea e malattia cerebrovascolare viene analizzata in riferimento particolare alle lesioni definite White Matter Hyperintensities con la risonanza magnetica, che sembrano predisporre al decadimento cognitivo e all'ictus ischemico.

## ■ Nutraceutica

### La nutraceutica nel bambino dislipidemico

La supplementazione della dieta nel bambino per migliorarne il profilo lipidico richiede attenzione nella scelta del nutraceutico ed un attento monitoraggio clinico per confermarne l'efficacia.

## ■ Farmaci

### Effetti collaterali inconsueti delle statine

Le statine godono in generale di un buon profilo di sicurezza, con un rischio di ADR gravi inferiore all' 1-2%. Oltre a danno muscolare, aumento asintomatico di alcuni enzimi e disturbi gastrointestinali, sono state osservate occasionali manifestazioni che necessitano di approfondimento e caratterizzazione.

## ■ Medicina, Scienza e Società

### Controversie sulla malattia di L. van Beethoven.

Nonostante le gravi sofferenze che hanno accompagnato la vita del compositore dagli anni giovanili all'età adulta, Beethoven ha mantenuto fino a pochi mesi dalla morte una brillante creatività grazie alla forza d'animo e alla ferrea disciplina che ne accrescono la dimensione umana.



**FOCUS**

# **PCSK9, COLESTEROLO E MALATTIA DI ALZHEIMER: QUALI EVIDENZE DALLA RICERCA DI BASE**

## **PCSK9, cholesterol and Alzheimer's disease: evidence from basic research**

**MARIA PIA ADORNI<sup>1</sup>, MASSIMILIANO RUSCICA<sup>2</sup>, NICOLA FERRI<sup>3</sup>,  
FRANCO BERNINI<sup>1</sup>, FRANCESCA ZIMENTI<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Italy;

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova

### **SUMMARY**

Alzheimer's disease, as can be seen from numerous studies, is also associated with a dysregulation of cholesterol homeostasis in the brain. Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin type 9 (PCSK9), known for its role in the regulation of plasma cholesterol levels, was initially identified in the brain, assuming its possible involvement in neuronal development and apoptosis. However, its precise function in the central nervous system (CNS) and in the pathogenesis of Alzheimer's disease has not yet been fully understood and is currently being studied. In this regard, the data currently available in vitro and in vivo, as well as the results of genetic studies, have led to controversial results. Potential cognitive disorders associated with treatment with anti-PCSK9 antibodies were excluded in light of the results of the EBBINGHAUS trial, a subgroup of the FOURIER study with evolocumab. However, a longer follow-up will be decisive in definitively clarifying this doubt. At the mechanistic level, PCSK9 is able to influence the expression of neuronal receptors involved in cholesterol homeostasis and in neuro-inflammation; moreover, higher concentrations of PCSK9 have been found in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients, suggesting its involvement in the pathology. The objective of this review is to critically analyze the state of the art of PCSK9 as a modulator of the mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. Furthermore, based on the available literature data, we formulated the hypothesis that the PCSK9 protein can be considered a negative modulator of cerebral cholesterol homeostasis and neuro-inflammation and a potential pharmacological target for the development of new therapeutic approaches to counteract such pathology.

**Keywords:** *Proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 (PCSK9), Alzheimer's disease, cholesterol, apolipoprotein E (apoE), receptors for apoE, neuron.*

### *Indirizzo per la corrispondenza*

Nicola Ferri

Dipartimento di Scienze del Farmaco,

Università degli Studi di Padova

E-mail: nicola.ferri@unipd.it

## Introduzione

La proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) rappresenta uno dei principali regolatori dell'omeostasi del colesterolo, mediando la degradazione dei recettori delle lipoproteine a bassa densità (LDL) a livello epatico (1). È interessante sottolineare come la proteina PCSK9 sia stata inizialmente identificata col nome di NARC-1 (neural apoptosis-regulated convertase-1) proprio nel cervello, in cui la sua espressione, a livello delle cellule embrionali primarie del telencefalo, risultava massima tra il 13° e il 15° giorno del processo di embriogenesi, un periodo gestazionale caratterizzato da un'intensa fase di neurogenesi (2). È stato anche osservato come in un modello di zebrafish, ma non nel modello murino, la delezione del gene PCSK9 induceva una globale disorganizzazione dei neuroni del cervelletto, portando in ultima analisi alla morte embrionale (3).

Alla luce di queste premesse, questa breve rassegna si concentra sul ruolo di PCSK9 a livello cerebrale con particolare attenzione al suo potenziale coinvolgimento nelle funzioni neuronali e nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Inoltre, sulla base dei dati presenti in letteratura, è stata criticamente presa in esame la possibilità di considerare PCSK9 come un

modulatore dell'omeostasi del colesterolo e dell'infiammazione a livello cerebrale e quindi come un potenziale bersaglio farmacologico.

## Omeostasi del colesterolo cerebrale

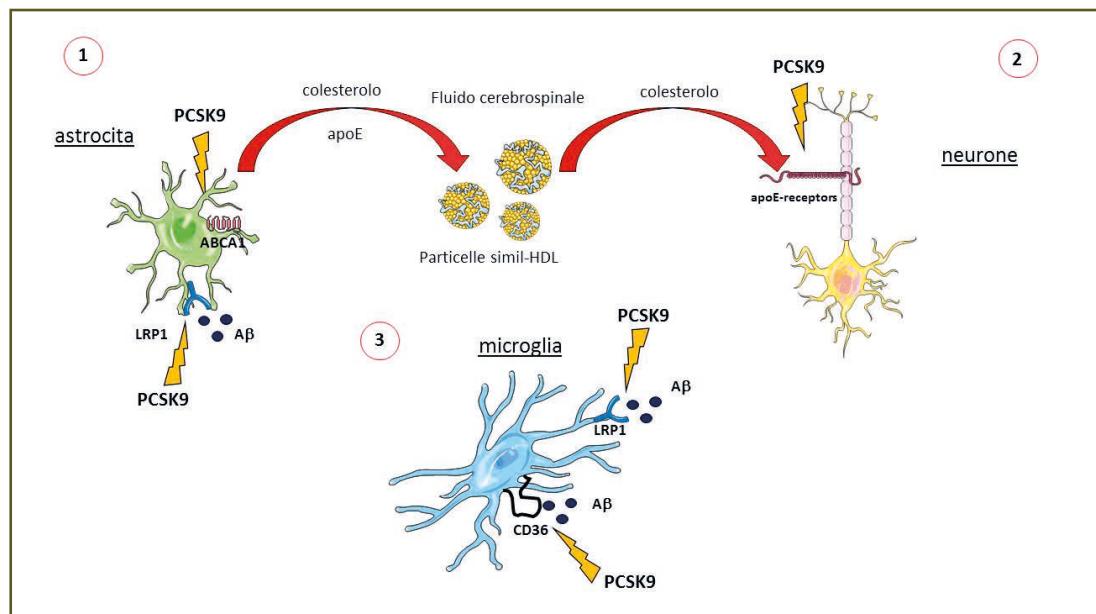
Il colesterolo è una delle molecole più importanti nell'ambito della fisiologia del cervello (4): è infatti un componente importante della mielina, è coinvolto nello sviluppo neuronale, nella sinaptogenesi, nello sviluppo dei neuriti e nel mantenimento dell'integrità e nei processi di riparazione delle membrane cellulari (5). Il colesterolo, a differenza dei suoi metaboliti 24S- e 27-idrossicolesterolo, non può passare dal plasma al compartimento centrale attraversando la barriera ematoencefalica (BEE) (6): Il cervello è quindi in grado di provvedere alla sintesi del colesterolo *in situ* (7). Le cellule del sistema nervoso centrale (SNC) sono in grado di sintetizzare autonomamente il colesterolo anche se i neuroni perdono progressivamente questa capacità e necessitano del colesterolo esogeno che viene fornito dagli astrociti per il mantenimento delle funzioni fisiologiche (8, 9). Studi *ex vivo* hanno dimostrato come la deplezione di colesterolo nei neuroni porti ad un'eccessiva fosforilazione della proteina tau, ad alterazioni del metabolismo del peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), all'induzione di stress ossidativo a livello neuronale, con conseguente neurodegenerazione (10). Il trasporto di colesterolo dagli astrociti ai neuroni è mediato da peculiari molecole e recettori che cooperano tra loro in modo coordinato. Nello specifico, il colesterolo prodotto dagli astrociti subisce il processo di efflusso di colesterolo verso particelle contenenti l'apolipoproteina E (ApoE). Tale processo è mediato dall'attività di trasportatori di membrana appartenenti alla famiglia ATP binding

### Elenco degli argomenti trattati

- Omeostasi del colesterolo cerebrale.
- PCSK9 e patogenesi della malattia di Alzheimer.
- Recettori target di PCSK9 e il loro ruolo nella malattia di Alzheimer.
- PCSK9 e la malattia di Alzheimer: evidenze nell'uomo.
- Effetto degli inibitori di PCSK9 sui disturbi neuro-cognitivi.

cassette (ABC) come ABCA1, ABCG1 e ABCG4 (11). Infine, il colesterolo trasportato da tali particelle, che per composizione e dimensioni assomigliano alle lipoproteine plasmatiche ad alta densità (HDL), viene incorporato nei neuroni attraverso il legame di queste stesse particelle a recettori specifici, come il recettore per le LDL (LDLr), il low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), il recettore per le VLDL (VLDLr) ed il recettore 2 per ApoE (ApoEr2) (12). Diversi studi documentano come PCSK9 sia in grado di degradare tali recettori (13, 14), mettendo in luce un ruolo di PCSK9 nell'omeostasi del colesterolo a livello cerebrale. Questa ipotesi è supportata da studi *in vivo* che dimostrano come l'espressione di LDLr venga ridotta

da PCSK9 durante lo sviluppo del cervello e dopo ictus ischemico transitorio (15). È quindi ipotizzabile che la degradazione dei recettori neuronalni deputati all'uptake di colesterolo mediata da PCSK9, si traduca in una ridotta captazione di colesterolo da parte dei neuroni, con potenziali conseguenze deleterie (10) (*Figura 1*). Tuttavia, non tutti i dati presenti in letteratura supportano questa ipotesi. Infatti, Liu e collaboratori non hanno osservato alcun effetto significativo da parte di PCSK9 sull'espressione dei recettori LDLr, VLDLr e ApoEr2 a livello cerebrale in un modello murino (16). Queste discrepanze evidenziano la necessità di approfondire il possibile coinvolgimento di PCSK9 nell'omeostasi del colesterolo nel SNC.



**Figura 1 -** Potenziale implicazione di PCSK9 nella patogenesi della malattia di Alzheimer a livello astrociotario, neuronale e della microglia.

- 1) Nell'astrocita PCSK9 degrada il recettore LRP1, riducendo la clearance di Aβ e favorendone la deposizione nelle placche; PCSK9 riduce l'espressione di ABCA1, impedendo così con la lipidazione di ApoE e la generazione di particelle simil-HDL; 2) PCSK9 degrada i recettori neuronalni che internalizzano il colesterolo attraverso l'interazione con le lipoproteine contenenti ApoE. Il mancato apporto di colesterolo al neurone ne altera la fisiologia e le funzioni determinando neurodegenerazione. 3) Nella microglia PCSK9 degrada il recettore LRP1, riducendo la clearance di Aβ e favorendone la deposizione nelle placche. Inoltre PCSK9 modula l'espressione di CD36, amplificando la risposta neuroinfiammatoria Aβ-dipendente.

## PCSK9 e patogenesi della malattia di Alzheimer

Le patologie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, sono caratterizzate anche da alterazioni dell'omeostasi del colesterolo nel SNC (17, 18). Per esempio, attraverso uno studio di associazione genome-wide (GWAS), tra i geni correlati alla malattia sono stati identificati diversi loci coinvolti nel metabolismo lipidico. Un esempio è l'allele ε4 del gene APOE che codifica per ApoE, la principale apolipoproteina che media il trasporto di colesterolo nel SNC (19). L'isoforma ε4 è, a sua volta, senza dubbio uno dei fattori più predittivi per l'insorgenza della malattia di Alzheimer (20). Altri geni sono implicati nel metabolismo lipidico e si associano alla patologia, come BIN1, CLU, PICALM, ABCA7, ABCA1, ABCG1 e SORL1 (21, 22). Da un punto di vista molecolare, il colesterolo a livello cerebrale si accumula nei cosiddetti "lipid rafts", cioè microdomini di membrana dove avviene la processazione della proteina precursore dell'amiloide che, a sua volta, favorisce la formazione e la deposizione di frammenti insolubili di beta amiloide ( $A\beta$ ) nel parenchima cerebrale. A questo proposito, è stato dimostrato come il colesterolo promuova l'amiloidogenesi fornendo stabilità strutturale ai lipid rafts localizzati a livello della membrana plasmatica cellulare (23). Di conseguenza, la modulazione del contenuto di colesterolo specificamente a livello dei lipid rafts, è in grado di influenzare la deposizione di  $A\beta$ .

I dati disponibili in letteratura sul ruolo di PCSK9 nella malattia di Alzheimer sono ancora limitati e controversi e in questa rassegna sono riassunti nella *Tabella 1*. Per quanto riguarda l'apoptosi a livello neuronale, PCSK9 svolge un'attività pro-apoptotica attraverso un aumento dell'espressione delle caspasi o una riduzione

dei livelli del recettore ApoEr2 (24). In topi knockout per APOE, sottoposti a una dieta ricca di grassi, l'apoptosi neuronale a livello dell'ippocampo risultava essere associata ad un'aumentata espressione di PCSK9 (25). In linea con queste osservazioni, in modelli murini il silenziamento di PCSK9 è coinciso con fenomeni di apoptosi neuronale indotta da ischemia cerebrale riducendo così il danno cerebrale (26). Al contrario, è stata messa in luce un'azione preventiva di PCSK9 sull'apoptosi neuronale che sembra verificarsi attraverso la riduzione della produzione di  $A\beta$  (27). Un effetto diretto di PCSK9 sul metabolismo di  $A\beta$  non è ancora del tutto chiarito. Topi deficitari della proteina PCSK9 hanno una maggiore espressione del β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1), la proteasi che, nell'Alzheimer, induce la produzione di  $A\beta$  tossico che si va ad accumulare nelle placche neuritiche. Questo effetto si traduce in una maggiore deposizione di  $A\beta$  a livello cerebrale. Diversamente, una sovra espressione di PCSK9 nei topi riduce i livelli di BACE1 (28). D'altra parte, nei cervelli di ratti nei quali è stato indotto un danno neurologico in seguito a ischemia/riperfusione, la somministrazione di una piccola molecola con attività inibitoria su PCSK9, ha impedito la perdita dendritica a livello della colonna vertebrale mediante una riduzione sia della aggregazione di  $A\beta$  che della neuro infiammazione (29). Al contrario, altri studi hanno escluso una modulazione da parte di PCSK9 dei livelli di BACE1 o del metabolismo di APP nel cervello in modelli murini (16, 30). Ad oggi, non vi sono dati disponibili rispetto alla possibile influenza da parte di PCSK9 del processo di fosforilazione di tau, un altro tipico marcatore di malattia.

L'impatto di PCSK9 sulla performance neuro-cognitiva in modelli preclinici è

**Tabella I - Studi sul coinvolgimento di PCSK9 nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD).**

<b>Studio</b>	<b>Modello sperimentale</b>	<b>Impatto di PCSK9 nell'AD</b>	<b>Effetti sul metabolismo del colesterolo e la neuroinfiammazione</b>
Kysenius K et al. (2012) (24)	Modello cellulare	Promozione dell'apoptosi neuronale	Riduzione dell'espressione di ApoEr2
Wu et al. (2014) (27)	Modello murino	Prevenzione dell'apoptosi neuronale e riduzione della produzione di A $\beta$	
Zhao et al. (2017) (25)	Modello murino	Induzione di PCSK9 associata ad aumento dell'espressione di BACE1	Accumulo di lipidi nell'ippocampo
Wang et al. (2018) (26)	Modello murino	Attenuazione di apoptosi neuronale causata dall'inibizione di PCSK9	Riduzione dell'espressione di ApoEr2 nella corteccia e nell'ippocampo
Jonas et al. (2008) (28)	Modello cellulare	L'assenza di PCSK9 induce la produzione di A $\beta$ , la sua sovraespressione riduce i livelli di BACE1	Riduzione dell'espressione del LDLr
Apaijai et al. (2019) (29)	Modello di ratto	La somministrazione di un inibitore di PCSK9 attenua l'aggregazione di A $\beta$ e la neuroinfiammazione	Riduzione del numero di cellule CD 11b+/ CD 45+high
Liu et al. (2010) (16)	Modello murino	PCSK9 non ha impatto sui livelli di BACE1 o sul metabolismo di APP	Nessun effetto sull'espressione di LDLr, VLDLr e apoEr2
Fu et al. (2017) (30)	Modello cellulare e murino	PCSK9 non regola il metabolismo di APP	Nessun effetto sull'espressione di LDLr
Reynolds et al. (2010) Shibata et al. (2005) Benn et al. (2017) Mettford et al. (2018) Paquette et al. (2018) (82-86)	Studi genetici sull'uomo	Varianti genetiche di PCSK9 non sono associate al rischio di AD	
Zimmetti et al. (2017) (50)	Studio osservazionale sull'uomo	Aumento dei livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti con AD	Correlazione tra livelli di PCSK9 ed apoE4; aumento dei livelli di PCSK9 nei portatori dell'isoforma apoE4
Courtemanche et al. (2018) (90)	Studio osservazionale sull'uomo	Aumento dei livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti con malattie neurodegenerative e correlazione con i marcatori diagnostici	
Picard C et al. (2019) (87)	Studio osservazionale sull'uomo	Aumento dell'espressione di PCSK9 nella corteccia frontale di pazienti con AD; correlazione tra PCSK9 nel fluido cerebrospinale di soggetti a rischio di AD con i livelli di tau e p-tau; Individuazione di due polimorfismi associati a rischio di AD	Aumento dell'mRNA ma non dell'espressione proteica di LDLr; correlazione tra PCSK9 nel fluido cerebrospinale di soggetti a rischio di AD e i livelli di apoE e apoJ

stato indirettamente suggerito dall'osservazione per cui, nel topo, la delezione del recettore LRP1, sensibile all'azione degradante di PCSK9 (13), porta ad una riduzione della clearance di A $\beta$  e a un deficit cognitivo (31). Coerentemente, topi privi del recettore per le LDL mostrano segni di compromissione della capacità di apprendimento e di memoria (32) e una riduzione della proliferazione cellulare ippocampale e della formazione delle sinapsi (33).

### **Recettori target di PCSK9 e il loro ruolo nella malattia di Alzheimer**

Oltre ad APOE, sono diversi i geni implicati nella modulazione dell'omeostasi del colesterolo e studiati per la loro associazione con la malattia di Alzheimer (34). Alcuni di questi geni codificano per recettori sensibili all'azione degradante di PCSK9 (*Figura 1*). Per esempio LRP1 è uno tra i recettori in grado di interagire con ApoE e, nonostante alcuni risultati in merito alla sua associazione con la patologia nell'uomo siano controversi (35), è stato dimostrato che l'espressione di LRP1 nel cervello e nei capillari cerebrali si riduce progressivamente all'aumentare dell'età e in modo ancor più marcato nell'Alzheimer (36-38). LRP1 media infatti la clearance di A $\beta$  mediante attraversamento della BEE (39) e la presenza dell'allele APOE4 si associa ad una sua ridotta clearance tramite questo recettore (40, 41). Consistentemente, la delezione specifica di LRP1 a livello dell'endotelio cerebrale aumenta la deposizione di A $\beta$ , determinando deficit cognitivo e di memoria in modelli sperimentali murini (31). LRP1 sembra inoltre svolgere un ruolo fondamentale nel metabolismo del complesso ApoE-A $\beta$ , per cui ApoE può competere con A $\beta$  per l'interazione con LRP1, causando una ridotta eliminazione del peptide tossico dal cervello

(42). LRP1 è anche coinvolto nella clearance epatica di A $\beta$  (43). Poiché il recettore LRP1 è espresso in diversi tipi di cellule cerebrali, tra cui neuroni, astrociti e cellule vascolari, i suoi livelli possono essere modificati in modo diversificato e cellula-dipendente nella malattia di Alzheimer (44, 45). In effetti, i livelli di LRP1 risultano ridotti a livello neuronale ma aumentati nelle cellule vascolari o negli astrociti che si trovano in prossimità delle placche amiloidi tipiche della patologia (44-46). PCSK9 può indurre la degradazione di LRP1 in diversi tipi di cellule, inclusi gli epatociti (13) e le cellule vascolari (47, 48). Poiché PCSK9 è espressa sia nei neuroni che nelle cellule vascolari, potrebbe quindi influenzare i livelli di LRP1 in entrambi i tipi cellulari (49). Pertanto, gli aumentati livelli di PCSK9 del liquido cerebrospinale (CSF) di soggetti con la malattia che sono stati osservati dal nostro gruppo di ricerca (50) potrebbero essere associati ad un maggiore turnover di LRP1 nei diversi tipi cellulari, influenzando così l'eliminazione del peptide A $\beta$  attraverso la BEE.

Il LDLr è un altro importante recettore per l'ApoE espresso a livello cerebrale. Anche in questo caso gli studi genetici volti a identificare il suo legame con l'Alzheimer sono controversi, sebbene una ricerca condotta su un'ampia coorte di soggetti abbia riscontrato un'associazione tra un comune polimorfismo del recettore e la prevalenza di malattia, evidenziabile negli uomini ma non nelle donne (51,52). Inoltre, in un modello animale di Alzheimer, il recettore ha dimostrato un effetto benefico tramite il potenziamento della clearance di A $\beta$  (53) rinforzandone l'associazione con il rischio e ipoteticamente il coinvolgimento dell'azione degradante di PCSK9. Anche il VLDLr può essere coinvolto nella clearance del complesso ApoE-A $\beta$  (54). Tuttavia, i risultati di una meta-analisi di

studi genetici condotta su un polimorfismo del VLDLr ha dato risultati contraddittori in quanto ne sarebbe emerso un ruolo protettivo nei confronti della malattia nella popolazione caucasica e un effetto invece deleterio nella popolazione asiatica (55). Inoltre, è stata descritta un'associazione genetica con l'Alzheimer in uno studio ma i risultati non sono stati successivamente confermati (56). Pertanto, l'associazione diretta di VLDLr con la malattia resta da dimostrare.

Il recettore scavenger CD36 è coinvolto nell'attivazione della microglia dipendente da A $\beta$  e nella conseguente attivazione della risposta immunitaria innata (57-59). È stato dimostrato che PCSK9 determina un aumento dell'espressione di CD36 nei macrofagi e in cellule microglia-like (60), suggerendo un coinvolgimento della proteina sia nella clearance di A $\beta$  mediata da CD36 (*Figura 1*), che nella risposta innata dell'ospite ad agenti tossici come per esempio lo stesso A $\beta$  e le LDL-ossidate (oxLDL) nelle cellule cerebrali. In effetti, CD36 funge da co-recettore nell'etero-dimerizzazione dei recettori Toll like (Toll like receptors, TLR), un processo essenziale per l'attivazione di segnali infiammatori intracellulari e per la conseguente induzione della neuro-degenerazione microglia-dipendente (61). Questo dato è consistente con l'effetto pro-infiammatorio di PCSK9 nei macrofagi (62) e con l'osservazione che la somministrazione di un inibitore di PCSK9 determina un'attenuazione della neuro-infiammazione in modelli sperimentali murini (29). Il nostro gruppo di ricerca ha inoltre precedentemente dimostrato che la PCSK9 ricombinante umana inibisce l'efflusso di colesterolo mediato dal trasportatore di membrana ABCA1 nei macrofagi (63). A questo proposito, anche i dati sulla possibile implicazione di ABCA1 nella patologia di Alzheimer sono piuttosto

controversi. Per esempio, i portatori della variante genetica R219K nel gene ABCA1 presentano una riduzione del 33% dei livelli di colesterolo totale nel CSF rispetto ai non portatori. Lo stesso polimorfismo risulterebbe parallelamente associato ad un ritardo medio nell'insorgenza della malattia di 1,7 anni (64). Questi dati suggeriscono che la variabilità genetica di ABCA1 potrebbe favorire lo sviluppo della malattia, probabilmente anche tramite un'interferenza con l'omeostasi del colesterolo nel SNC. Al contrario, la stessa variante R219K del gene ABCA1 in un altro lavoro è stata associata ad un aumentato rischio (65). A dimostrare l'eterogeneità dei risultati in questo ambito, un buon numero di osservazioni ha riportato un'associazione tra varianti genetiche del gene ABCA1 e riduzione o aumento del rischio (66-68). Infine, sono stati pubblicati anche alcuni studi ad esito negativo, in cui non è stata riscontrata alcuna associazione tra polimorfismi del gene ABCA1 (R219K, I883M e R1587K) ed il rischio (69). Il coinvolgimento di ABCA1 nella malattia è stato studiato anche in modelli murini di malattia in cui la proteina ABCA1 è stata deleta. In questi animali, l'assenza di ABCA1 ha determinato una deposizione più accentuata di A $\beta$  a livello cerebrale (70-72). Altri risultati hanno tuttavia portato a conclusioni opposte, poiché non hanno evidenziato alcun effetto di ABCA1 sulla deposizione di amiloide (73, 74). Poiché ABCA1 è responsabile della secrezione di ApoE a livello degli astrociti e media quindi il primo step del trasferimento del colesterolo verso neuroni (75), il suo potenziale impatto sulla fisiopatologia dell'Alzheimer potrebbe coinvolgere anche PCSK9, che ha dimostrato di modularne l'espressione (*Figura 1*) (63). Coerentemente con questa ipotesi, in modelli murini knock-out per ABCA1 è stata osservata, sia a livello della

corteccia che nel CSF, una marcata riduzione dei livelli di ApoE, che risulta anche essere meno lipidata (75). Inoltre, il CSF di pazienti affetti da patologia di Alzheimer ha una ridotta capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo ABCA1-mediato rispetto a soggetti controllo (76, 77). Infine, un ulteriore livello di complessità in questi processi potrebbe essere rappresentato dal possibile legame tra PCSK9 e lipoproteine contenenti ApoE come precedentemente descritto per le LDL (78), la Lipoprotein (a) (79) e le HDL (80, 81).

### **PCSK9 e la malattia di Alzheimer: evidenze sull'uomo**

Gli studi genetici condotti finora sull'uomo (*Tabella 1*) non sono conclusivi rispetto all'impatto delle mutazioni del gene codificante PCSK9 sulla prevalenza o il rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer. Sebbene alcuni autori abbiano identificato anche PCSK9 tra i geni implicati nel metabolismo del colesterolo e associati all'Alzheimer (34), in due studi di coorte, giapponese e svedese, non è stata riscontrata alcuna associazione tra polimorfismi di PCSK9 e rischio di insorgenza della patologia (82, 83). Coerentemente, una recente analisi di randomizzazione mendeliana non ha evidenziato nessuna associazione significativa tra la presenza di una mutazione con perdita di funzione a carico di PCSK9 ed il rischio (84), escludendone quindi un impatto sulla patologia. Ad una conclusione negativa sono giunti anche i risultati dello studio genetico REGARDS condotto su una popolazione afroamericana che presentava o meno le varianti C697X o Y142X con perdita di funzione di PCSK9. La presenza di tali varianti non ha avuto alcun impatto sulle performances cognitive, che rappresentavano lo scopo principale dello studio (85). Inoltre, In una

coorte di abitanti del Canada francese e affetti da malattia di Alzheimer, i portatori di mutazione di PCSK9 con perdita di funzione non differivano dai non portatori in termini di prevalenza o età di insorgenza della malattia (86). Al contrario, un recente studio che ha coinvolto soggetti ad alto rischio, ha individuato due polimorfismi di PCSK9 associati ad un aumentato rischio di sviluppare la patologia ed evidenziato questa relazione in modo specifico nelle donne. Nello stesso lavoro gli autori hanno riscontrato un'aumentata espressione di PCSK9 in sezioni autoptiche di corteccia frontale di soggetti affetti dalla malattia (87).

PCSK9 è stata identificata nel fluido cerebrospinale umano anche se ad una concentrazione molto più bassa rispetto a quella plasmatica (88). Le concentrazioni liquorali di PCSK9 sembrerebbero costanti, senza presentare il tipico andamento circadiano che si verifica per PCSK9 nel plasma (89), a suggerire pertanto un meccanismo di regolazione differente nei compartimenti periferico e centrale dell'organismo (88). Sulla base di questa osservazione il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato la presenza di aumentati livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da morbo di Alzheimer, fenomeno particolarmente evidente nei portatori dell'isoforma APOE4 (50). Questi dati suggeriscono quindi un possibile coinvolgimento della proteina PCSK9 nella fisiopatologia dell'Alzheimer e un link con l'isoforma APOE4 che dovrà essere oggetto di ulteriori approfondimenti. La nostra osservazione è stata successivamente confermata da Courtemanche e collaboratori, che tuttavia dimostrano anche una tendenza all'aumento di PSCK9 nel liquor di pazienti affetti da malattie neurodegenerative non correlate alla malattia, a suggerire un coinvolgimento nei

processi neurodegenerativi non legati ad una specifica patologia (90).

### **Inibitori di PCSK9 e disturbi neurocognitivi**

Il trattamento con inibitori di PCSK9 alirocumab, evolocumab o bococizumab ha determinato il raggiungimento di livelli molto bassi di colesterolo totale plasmatico (concentrazioni medie di 30 mg/dL nello studio FOURIER e 25 mg/dL negli studi ODYSSEY a LUNGO TERMINE e SPIRE) (91-93). Questi dati di elevata efficacia hanno sollevato alcune preoccupazioni in merito ai potenziali effetti collaterali correlabili all'utilizzo clinico degli inibitori di PCSK9. In particolare, alcuni studi hanno evidenziato una potenziale associazione tra il trattamento con anticorpi monoclonali anti-PCSK9 ed eventi cognitivi avversi (92, 94). Bisogna tuttavia ricordare che tali disturbi sono stati spesso riportati dal paziente stesso e si sono verificati in un numero esiguo di soggetti che presentavano specifiche condizioni patologiche preesistenti o altri fattori confondenti, come emerso dai risultati di un'analisi condotta dalla Food and Drug Administration (FDA) (95-96).

Al fine di chiarire meglio questo dubbio, un recente studio ha valutato in modo prospettico l'effetto dell'anticorpo monoclonale anti-PCSK9 evolocumab sulle funzioni cognitive, misurate mediante specifici test neuropsicologici (97). In tale studio, 1.204 soggetti con età media di 65 anni, che non presentavano disturbi neurolologici durante il trattamento con evolocumab o placebo, sono stati monitorati per i successivi 1,6 anni senza evidenziare effetti avversi di tipo cognitivo (98). Questo risultato è stato ulteriormente confermato da recenti meta-analisi (99, 100). Tuttavia, un follow-up di durata maggiore, come

quello di 5 anni dello studio FOURIER ancora in corso, fornirà ulteriori indicazioni relative all'impatto a lungo termine degli inibitori di PCSK9 sulle funzioni neurocognitive. D'altra parte, la mancanza di un evidente effetto neuro-cognitivo da parte degli inibitori di PCSK9 è probabilmente spiegabile dalla presenza della BEE, che isola il SNC dal compartimento periferico, con la conseguenza che i livelli plasmatici di colesterolo in periferia non necessariamente riflettono quelli cerebrali (101). A supporto di questo concetto, nello studio con i portatori di varianti genetiche associate a perdita di funzione di PCSK9, un'esposizione a livelli molto bassi di colesterolo LDL (LDL-C) per tutto il corso della vita, non è stata associata all'instaurarsi di disturbi neuro-cognitivi (85,86). Inoltre, la BEE limita l'accesso al SNC sia di PCSK9 (15) e a maggior ragione di molecole a più elevato peso molecolare come gli anticorpi monoclonali alirocumab ed evolocumab. Infatti, in condizioni di integrità di BEE, la presenza delle "tight junctions" impedisce la diffusione transcellulare degli anticorpi attraverso i capillari. In queste condizioni, infatti, la penetrazione di anticorpi nel cervello è stata stimata essere circa lo 0,1%, sia nell'uomo che negli animali (102). D'altra parte, in alcune condizioni patologiche, come il diabete, la BEE potrebbe essere compromessa e risultare più permeabile (103). Nonostante questo, qualche indicazione che esclude la possibilità che gli anticorpi attraversino la BEE anche in queste condizioni è fornita dallo studio EBBINGHAUS, in cui è stata inclusa una buona percentuale di soggetti diabetici (37,2%) e in cui non è stata osservata alcuna variazione delle funzioni cognitive (96). Pertanto, sarebbe di grande interesse valutare l'effetto di piccole molecole attualmente in fase di studio, che sono invece in grado di attraversare la BEE e di inibire PCSK9. A

questo proposito un recente studio ha dimostrato che la somministrazione endovenosa di Pep2-8 trifluoroacetato, molecola in grado di inibire PCSK9, ha determinato una riduzione dell'aggregazione di A $\beta$  e attenuazione della neuro-infiammazione in modelli murini (29).

### Glossario

**ABCA1, ABCG1, ABCG4:** ATP Binding Cassette transporter A1, G1 e G4. Sono proteine integrali di membrana che utilizzano ATP come fonte di energia per trasportare metaboliti attraverso le membrane. Mediano il processo di efflusso di colesterolo e fosfolipidi cellulari in maniera unidirezionale verso specifici accettori extracellulari.

**LRP1:** Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1. È un recettore posto sulla membrana plasmatica delle cellule, principalmente espresso a livello di cellule muscolari lisce, epatociti e neuroni. Media il processo di endocitosi-recettore mediato e svolge un ruolo chiave nella trasduzione di diversi segnali cellulari regolando vari processi biologici.

**CD36:** Cluster of Differentiation 36. È una glicoproteina localizzata in microdomini specifici della membrana plasmatica, le caveole. Appartiene alla famiglia degli scavenger receptors di classe B. Insieme a SR-BI è stato identificato come recettore delle LDL ossidate; è coinvolto nell'immunità naturale contro miceti e batteri; è in grado di legare anche le lipoproteine ad alta densità HDL.

**TLR:** Toll-like receptors. Sono recettori in grado di riconoscere agenti patogeni batterici, virali o fungini con un ruolo determinante nel processo di immunità innata, poiché attraverso l'attivazione di meccanismi di signaling intracellulare, scatenano la produzione di citochine pro-infiammatorie e promuovono la maturazione delle cellule dendritiche.

**APP:** Amyloid Precursor Protein. È una proteina il cui clivaggio ad opera di enzimi chiamati secretasi dà origine a frammenti di beta-amiloide (A $\beta$ ). A seconda della secretasi coinvolta ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ), si possono formare peptidi solubili o insolubili e tossici.

**BACE1:** Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1. Chiamata anche  $\beta$ -secretasi, è l'enzima che induce la proteolisi dell'APP causando la formazione di peptidi di A $\beta$  insolubili e tossici che aggregano e si accumulano nelle placche cerebrali tipiche dei soggetti affetti da malattia di Alzheimer.

### Conclusioni

Sebbene diversi effetti extra epatici di PCSK9, indipendenti da quello più noto sui livelli circolanti di LDL-C siano stati identificati e ben caratterizzati (104), il ruolo di questa proteina nel cervello e il suo potenziale coinvolgimento nelle malattie del SNC sono ancora oggetto di studio. A questo proposito, gli studi di fisiopatologia condotti in modelli animali di malattia di Alzheimer hanno portato a risultati controversi, lasciando aperta la questione della potenziale implicazione di PCSK9 nella patogenesi di questa malattia. Tuttavia, i limitati studi genetici disponibili che si sono concentrati sulle varianti di PCSK9 associate a perdita di funzione della proteina in genere non supportano un'associazione tra PCSK9 e rischio di insorgenza di malattia (85, 86). È importante notare, tuttavia, come in tutti gli studi sono state valutate le concentrazioni plasmatiche di PCSK9, e sappiamo come PCSK9 non sia in grado di attraversare la BEE e la sua regolazione sembra essere differente tra i due compartimenti corporali, centrale e periferico. Sulla base dei dati ottenuti nel nostro laboratorio, che dimostrano aumentati livelli di PCSK9 nel liquido cerebrospinale dei pazienti con la patologia e di dati di letteratura, che evidenziano la capacità di PCSK9 di interferire con il trasporto di colesterolo nel SNC mediante la degradazione dei recettori neuronali per ApoE, responsabili dell'uptake di colesterolo derivante dagli astrociti, pensiamo sia possibile ipotizzare che nella patologia vi sia una generale deplezione neuronale di colesterolo mediata da PCSK9. Le conseguenze di tale effetto includono la perdita delle funzioni fisiologiche dei neuroni e, in ultimo, la neuro-degenerazione. Inoltre, PCSK9 può contribuire ad aggravare la neuro-

infiammazione, eventualmente agendo sui recettori CD36 e TLR4 (61). Queste ipotesi, che stiamo attualmente valutando, possono costituire la base per testare nuovi approcci farmacologici, ad esempio piccole molecole già esistenti e potenzialmente in grado di attraversare la BEE mediante processi di diffusione o attraverso

specifici trasportatori, diversamente dagli anticorpi anti-PCSK9. Queste molecole, ripristinando il trasporto fisiologico del colesterolo dagli astrociti ai neuroni nel cervello, e attenuando la neuro-infiammazione mediante l'inibizione della via CD36-TLR4, potrebbero aprire la strada a potenziali future terapie innovative.

### Questionario di auto-apprendimento

**1) Il colesterolo presente a livello cerebrale:**

- a) Viene prodotto in situ
- b) Deriva dalla circolazione periferica mediante l'attraversamento della barriera ematoencefalica.
- c) Non è ancora nota l'origine del colesterolo cerebrale.

**2) Il trasporto di colesterolo tra neurone e astrocita:**

- a) È fondamentale in quanto gli astrociti perdono progressivamente la capacità di sintetizzare autonomamente il colesterolo.
- b) Involge molecole e specifici recettori di membrana deputati all'efflusso e all'uptake di colesterolo che cooperano in maniera coordinata.
- c) È mediato dalle lipoproteine a bassa densità LDL.

**3) È stato dimostrato che:**

- a) PCSK9 previene l'apoptosi neuronale.
- b) PCSK9 promuove l'apoptosi neuronale.
- c) Rispetto all'effetto di PCSK9 sull'apoptosi neuronale i dati sono contrastanti.

**4) Il recettore LRP1:**

- a) Dimerizza con il recettore CD36 e promuove l'attivazione di processi pro-infiammatori.
- b) Appartiene alla famiglia degli apoE-receptors e media l'internalizzazione del colesterolo a livello neuronale.
- c) È responsabile della lipidazione di apoE

ad opera degli astrociti e favorisce la produzione di particelle simil-HDL.

**5) I livelli di PCSK9 nel fluido cerebrospinale:**

- a) Sono più elevati nei soggetti con Alzheimer ed in particolare nei portatori dell'isoforma apoE4.
- b) Sono più elevati nei soggetti affetti da altre demenze ma non nella patologia di Alzheimer.
- c) Sono più bassi nei soggetti affetti da Alzheimer e correlano con i neuro-biomarker utilizzati per la diagnosi.

**6) Il trial clinico EBBINGHAUS ha dimostrato che**

- a) Il trattamento con l'anticorpo anti-PCSK9 evolocumab è stato associato all'insorgenza di eventi cognitivi avversi correlati al raggiungimento di livelli plasmatici molto bassi di colesterolo.
- b) Il trattamento con l'anticorpo anti-PCSK9 evolocumab è stato associato all'insorgenza di eventi cognitivi avversi unicamente in un sottogruppo di soggetti diabetici.
- c) Il trattamento con l'anticorpo anti-PCSK9 evolocumab non è stato associato all'insorgenza di eventi cognitivi avversi.

*Risposte corrette:  
1A, 2B, 3C, 4B, 5A, 6C*

## RIASSUNTO

La malattia di Alzheimer come si evince da numerosi studi, è anche associata ad una disgregazione dell'omeostasi del colesterolo a livello cerebrale. La Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina tipo 9 (PCSK9), nota per il suo ruolo nella regolazione dei livelli di colesterolo plasmatico, è stata inizialmente identificata a livello cerebrale, ipotizzandone un eventuale coinvolgimento nello sviluppo neuronale e nell'apoptosi. Tuttavia, la sua precisa funzione nel sistema nervoso centrale (SNC) e nella patogenesi dell'Alzheimer non è ancora stata pienamente compresa ed è attualmente oggetto di studio. A questo proposito, i dati attualmente disponibili *in vitro* ed *in vivo*, così come i risultati di studi genetici, hanno portato a risultati controversi. Potenziali disturbi cognitivi associati al trattamento con anticorpi anti-PCSK9 sono stati esclusi alla luce dei risultati del trial EBBINGHAUS, un sottogruppo dello studio FOURIER con evolocumab. Tuttavia, un follow-up più lungo sarà determinante nel chiarire definitivamente questo dubbio. A livello meccanicistico, PCSK9 è in grado di influenzare l'espressione dei recettori neuronali coinvolti nell'omeostasi del colesterolo e nella neuro infiammazione; inoltre sono state trovate concentrazioni più elevate di PCSK9 nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da Alzheimer, a suggerirne un suo coinvolgimento nella patologia. L'obiettivo di questa rassegna è quello di analizzare criticamente lo stato dell'arte di PCSK9 come modulatore dei meccanismi che stanno alla base della patogenesi della malattia di Alzheimer. Inoltre, sulla base dei dati di letteratura disponibili, abbiamo formulato l'ipotesi per cui la proteina PCSK9 possa essere considerata un modulatore negativo dell'omeostasi del colesterolo cerebrale e della neuro infiammazione e un potenziale bersaglio farmacologico per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per contrastare tale patologia.

**Parole chiave:** *Proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9), malattia di Alzheimer, colesterolo, apolipoproteina E (apoE), recettori per apoE, neurone.*

## Bibliografia

- Macchi C, Banach M, Corsini A, et al. Changes in circulating pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 levels - experimental and clinical approaches with lipid-lowering agents. *Eur J Prev Cardiol.* 2019; 2047487319831500.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 928-933.
- Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, et al. Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *J Neurochem.* 2006; 98: 838-850.
- Chang TY, Yamauchi Y, Hasan MT, Chang C. Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* 2017; 58: 2239-2254.
- Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem.* 2009; 390: 287-293.
- Bjorkhem I, Leoni V, Svenningsson P. On the fluxes of side-chain oxidized oxysterols across blood-brain and blood-CSF barriers and origin of these steroids in CSF (Review). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018.
- Bjorkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 806-815.
- Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1375-1397.
- Saito K, Dubreuil V, Arai Y, Wilsch-Brauninger M, et al. Ablation of cholesterol biosynthesis in neural stem cells increases their VEGF expression and angiogenesis but causes neuron apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 8350-8355.
- Koudinov AR, Koudinova NV. Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *J Neurol Sci.* 2005; 229-230: 233-240.
- Chen J, Zhang X, Kusumo H, et al. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831: 263-275.
- Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10: 333-344.
- Canuel M, Sun X, Asselin MC, et al. Proprotein convertase subtilisina/kexin type 9 (PCSK9) can

- mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). *PLoS One.* 2013; 8: e64145.
14. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem.* 2008; 283: 2363-2372.
  15. Rousselet E, Marcinkiewicz J, Kriz J, et al. PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. *J Lipid Res.* 2011; 52: 1383-1391.
  16. Liu M, Wu G, Baysarowich J, et al. PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *J Lipid Res.* 2010; 51: 2611-2618.
  17. Arenas F, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci.* 2017; 10: 382.
  18. Sato N, Morishita R. The roles of lipid and glucose metabolism in modulation of beta-amyloid, tau, and neurodegeneration in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front Aging Neurosci.* 2015; 7: 199.
  19. Mahoney-Sanchez L, Belaïdi AA, Bush AI, Ayton S. The Complex Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: an Overview and Update. *J Mol Neurosci.* 2016; 60: 325-335.
  20. Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013; 9: 106-118.
  21. Dong HK, Gim JA, Yeo SH, Kim HS. Integrated late onset Alzheimer's disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives. *Gene.* 2017; 597: 10-16.
  22. Picard C, Julien C, Frappier J, et al. Alterations in cholesterol metabolism-related genes in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2018; 66: 180 e181-180 e189.
  23. Vetrivel KS, Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801: 860-867.
  24. Kysenius K, Muggalla P, Matlik K, et al. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69: 1903-1916.
  25. Zhao XS, Wu Q, Peng J, et al. Hyperlipidemia-induced apoptosis of hippocampal neurons in apoE(-/-) mice may be associated with increased PCSK9 expression. *Mol Med Rep.* 2017; 15: 712-718.
  26. Wang L, Wang Z, Shi J, et al. Inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 attenuates neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia via apolipoprotein E receptor 2 downregulation in hyperlipidemic mice. *Int J Mol Med.* 2018; 42: 2098-2106.
  27. Wu Q, Tang ZH, Peng J, et al. The dual behavior of PCSK9 in the regulation of apoptosis is crucial in Alzheimer's disease progression (Review). *Biomed Rep.* 2014; 2: 167-171.
  28. Jonas MC, Costantini C, Pugliali L. PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. *EMBO Rep.* 2008; 9: 916-922.
  29. Apajai N, Moisescu DM, Palee S, et al. Pretreatment With PCSK9 Inhibitor Protects the Brain Against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury Through a Reduction of Neuronal Inflammation and Amyloid Beta Aggregation. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8: e010838.
  30. Fu T, Guan Y, Xu J, Wang Y. APP, APLP2 and LRP1 interact with PCSK9 but are not required for PCSK9-mediated degradation of the LDLR in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017; 1862: 883-889.
  31. Storck SE, Meister S, Nahrath J, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid-beta(1-42) across the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation.* 2016; 126: 123-136.
  32. Mulder M, Jansen PJ, Janssen BJ, et al. Low-density lipoprotein receptor-knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2004; 16: 212-219.
  33. Mulder M, Koopmans G, Wassink G, et al. LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. *Neurosci Res.* 2007; 59: 251-256.
  34. Wollmer MA. Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801: 762-773.
  35. Kang DE, Saitoh T, Chen X, et al. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997; 49: 56-61.
  36. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, et al. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *The Journal of clinical investigation.* 2000; 106: 1159-1166.
  37. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation.* 2000; 106: 1489-1499.
  38. Silverberg GD, Messier AA, Miller MC, et al. Amyloid efflux transporter expression at the

- blood-brain barrier declines in normal aging. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2010; 69: 1034-1043.
39. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2009; 8: 16-30.
  40. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007; 27: 909-918.
  41. Deane R, Sagare A, Hamm K, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 4002-4013.
  42. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, et al. ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: E1807-1816.
  43. Sagare A, Deane R, Bell RD, et al. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med*. 2007; 13: 1029-1031.
  44. Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, et al. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*. 2006; 112: 405-415.
  45. Ruzali WA, Kehoe PG, Love S. LRP1 expression in cerebral cortex, choroid plexus and meningeal blood vessels: relationship to cerebral amyloid angiopathy and APOE status. *Neuroscience letters*. 2012; 525: 123-128.
  46. Arelin K, Kinoshita A, Whelan CM, et al. LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. *Brain research Molecular brain research*. 2002; 104: 38-46.
  47. Ferri N, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and metabolic syndrome: insights on insulin resistance, inflammation, and atherogenic dyslipidemia. *Endocrine*. 2016.
  48. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis*. 2012; 220: 381-386.
  49. Poirier S, Mayer G, Poupon V, et al. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem*. 2009; 284: 28856-28864.
  50. Zimetti F, Caffarra P, Ronda N, et al. Increased PCSK9 Cerebrospinal Fluid Concentrations in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017; 55: 315-320.
  51. Lendon CL, Talbot CJ, Craddock NJ, et al. Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neuroscience letters*. 1997; 222: 187-190.
  52. Zou F, Gopalraj RK, Lok J, et al. Sex-dependent association of a common low-density lipoprotein receptor polymorphism with RNA splicing efficiency in the brain and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 929-935.
  53. Kim J, Castellano JM, Jiang H, et al. Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron*. 2009; 64:632-644.
  54. Helbecque N, Amouyel P. Very low density lipoprotein receptor in Alzheimer disease. *Microscopy research and technique*. 2000; 50: 273-277.
  55. Llorca J, Rodriguez-Rodriguez E, Dierssen-Sotos T, et al. Meta-analysis of genetic variability in the beta-amyloid production, aggregation and degradation metabolic pathways and the risk of Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica*. 2008; 117: 1-14.
  56. Taguchi K, Yamagata HD, Zhong W, et al. Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Annals of neurology*. 2005; 57: 585-588.
  57. Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, et al. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003; 23: 2665-2674.
  58. Coraci IS, Husemann J, Berman JW, et al. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *The American journal of pathology*. 2002; 160: 101-112.
  59. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, et al. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem*. 2002; 277: 47373-47379.
  60. Ding Z, Liu S, Wang X, et al. PCSK9 regulates expression of scavenger receptors and ox-LDL uptake in macrophages. *Cardiovasc Res*. 2018; 114: 1145-1153.
  61. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology*. 2010; 11: 155-161.

62. Ricci C, Ruscica M, Camera M, et al. PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages. *Sci Rep.* 2018; 8: 2267.
63. Adorni MP, Cipollari E, Favari E et al. Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. *Atherosclerosis.* 2017; 256: 1-6.
64. Wollmer MA, Streffer JR, Lutjohann D, et al. ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003; 24: 421-426.
65. Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Llorca J, et al. Association of genetic variants of ABCA1 with Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007; 144B: 964-968.
66. Beecham GW, Vardarajan B, Blue E, et al. Rare genetic variation implicated in non-Hispanic white families with Alzheimer disease. *Neurol Genet.* 2018; 4: e286.
67. Katzov H, Chalmers K, Palmgren J, et al. Genetic variants of ABCA1 modify Alzheimer disease risk and quantitative traits related to beta-amyloid metabolism. *Human mutation.* 2004; 23: 358-367.
68. Nordestgaard LT, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. Loss-of-function mutation in ABCA1 and risk of Alzheimer's disease and cerebrovascular disease. *Alzheimers Dement.* 2015; 11: 1430-1438.
69. Jiang M, Lv L, Wang H, et al. Meta-analysis on association between the ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) and Alzheimer's disease. *Gene.* 2012; 510: 147-153.
70. Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem.* 2005; 280: 43224-43235.
71. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M et al. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2005; 280: 43236-43242.
72. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation.* 2008; 118: 671-682.
73. Hirsch-Reinshagen V, Chan JY, Wilkinson A, et al. Physiologically regulated transgenic ABCA1 does not reduce amyloid burden or amyloid-beta peptide levels in vivo. *J Lipid Res.* 2007; 48: 914-923.
74. Hirsch-Reinshagen V, Maia LF, Burgess BL, et al. The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2005; 280: 43243-43256.
75. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem.* 2004; 279: 40987-40993.
76. Marchi C, Adorni MP, Caffarra P, et al. ABCA1- and ABCG1-mediated cholesterol efflux capacity of cerebrospinal fluid is impaired in Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* 2019; 60: 1449-1456.
77. Yassine HN, Feng Q, Chiang J, et al. ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux Capacity to Cerebrospinal Fluid Is Reduced in Patients With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5.
78. Tavori H, Giunzioni I, Linton MF, Fazio S. Loss of plasma proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) after lipoprotein apheresis. *Circ Res.* 2013; 113: 1290-1295.
79. Tavori H, Christian D, Minnier J et al. PCSK9 Association With Lipoprotein(a). *Circ Res.* 2016; 119: 29-35.
80. Ferri N, Marchiano S, Tibolla G, et al. PCSK9 knock-out mice are protected from neointimal formation in response to perivascular carotid collar placement. *Atherosclerosis.* 2016; 253: 214-224.
81. Ruscica M, Simonelli S, Botta M, et al. Plasma PCSK9 levels and lipoprotein distribution are preserved in carriers of genetic HDL disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018; 1863: 991-997.
82. Reynolds CA, Hong MG, Eriksson UK, et al. Analysis of lipid pathway genes indicates association of sequence variation near SREBF1/TOM1L2/ATPAF2 with dementia risk. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 2068-2078.
83. Shibata N, Ohnuma T, Higashi S, et al. No genetic association between PCSK9 polymorphisms and Alzheimer's disease and plasma cholesterol level in Japanese patients. *Psychiatr Genet.* 2005; 15: 239.
84. Benn M, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A. Low LDL cholesterol, PCSK9 and HMGCR genetic variation, and risk of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: Mendelian randomisation study. *BMJ.* 2017; 357: j1648.
85. Mefford MT, Rosenson RS, Cushman M, et al. PCSK9 Variants, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Neurocognitive Impairment: Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study (REGARDS). *Circulation.* 2018; 137: 1260-1269.
86. Paquette M, Saavedra YGL, Poirier J, et al. Loss-of-Function PCSK9 Mutations Are Not Associat-

- ed With Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2018; 31: 90-96.
87. Picard C, Poirier A, Belanger S, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in Alzheimer's disease: A genetic and proteomic multi-cohort study. *PLoS One* 2019; 14: e0220254.
  88. Chen YQ, Troutt JS, Konrad RJ. PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day. *Lipids.* 2014; 49: 445-455.
  89. Persson L, Cao G, Stahle L, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 2666-2672.
  90. Courtemanche H, Bigot E, Pichelin M, et al. PCSK9 Concentrations in Cerebrospinal Fluid Are Not Specifically Increased in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2018; 62:1519-1525
  91. Ridker PM, Revkin J, Amarenco P, et al. Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1527-1539.
  92. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1489-1499.
  93. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1713-1722.
  94. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1500-1509.
  95. Food and Drug Administration Briefing Document. (2015). The endocrinologic and metabolic drugs advisory committee meeting. Repatha (evolocumab) injections. Available online at: <https://wayback.archiveit.org/7993/20170405215129/><https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/EndocrinologicandMetabolicDrugsAdvisoryCommittee/UCM450072.pdf>.
  96. Food and Drug Administration Briefing Document. (2015). The endocrinologic and metabolic drugs advisory committee meeting. Pralutent (alirocumab) injection. Available online at: <https://wayback.archiveit.org/7993/20170405215212/><https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/EndocrinologicandMetabolicDrugsAdvisoryCommittee/UCM449865.pdf>.
  97. Giugliano RP, Mach F, Zavitz K, et al. Design and rationale of the EBBINGHAUS trial: A phase 3, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to assess the effect of evolocumab on cognitive function in patients with clinically evident cardiovascular disease and receiving statin background lipid-lowering therapy-A cognitive study of patients enrolled in the FOURIER trial. *Clin Cardiol.* 2017; 40: 59-65.
  98. Giugliano RP, Sabatine MS, Ott BR. Cognitive Function in a Randomized Trial of Evolocumab. *N Engl J Med.* 2017; 377:1997.
  99. Bajaj NS, Patel N, Kalra R et al. Neurological effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors: direct comparisons. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2018; 4: 132-141.
  100. Harvey PD, Sabbagh MN, Harrison JE et al. No evidence of neurocognitive adverse events associated with alirocumab treatment in 3340 patients from 14 randomized Phase 2 and 3 controlled trials: a meta-analysis of individual patient data. *Eur Heart J.* 2018; 39: 374-381.
  101. Olsson AG, Angelin B, Assmann G et al. Can LDL cholesterol be too low? Possible risks of extremely low levels. *J Intern Med.* 2017; 281: 534-553.
  102. Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *AAPS J.* 2010; 12: 33-43.
  103. Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, et al. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Mol Neurobiol.* 2019; 56: 1883-1896.
  104. Stoekenbroek RM, Lambert G, Cariou B, Hovingh GK. Inhibiting PCSK9 - biology beyond LDL control. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 15: 52-62.

**ATEROSCLEROSI CAROTIDEA**

# **PLACCA CAROTIDEA E MALATTIA CEREBROVASCOLARE**

## **Carotid plaque and cerebrovascular disease**

**FRANCESCO MORONI,<sup>1</sup> ENRICO AMMIRATI<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento Cardiotoracovascolare, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano;

<sup>2</sup>De Gasperis Cardio Center, Transplant Center, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

**SUMMARY**

The finding of carotid atherosclerotic plaques is common in the general population, with a prevalence that increases with age. In addition to being a marker of increased cardiovascular risk, carotid plaque is a well-known etiopathogenetic factor in the development of ischemic stroke on atherosclerotic basis. In the last few years, the presence of carotid atherosclerosis has been linked to the development of subclinical brain disease, in particular to hyperintense brain matter lesions evaluated by brain MRI, better known by the English name of White Matter Hyperintensities (WMH). These lesions have emerged as factors predisposing to the development of cognitive decay, neurodegenerative diseases and ischemic stroke. Although the aetiology of these brain alterations has not yet been clearly defined, it is believed that local vascular and microvascular alterations underlie them. The aim of the present review is to discuss the complex relationship between carotid atherosclerotic pathology and cerebrovascular disease, with a particular focus on WMH in patients with carotid plaque in light of recent studies.

**Key words:** atherosclerosis, carotid plaque, Ischemic stroke, white matter hyperintensities.

**Introduzione**

Il coinvolgimento atherosclerotico della carotide è comune nella popolazione generale altrimenti sana, soprattutto nelle fasce di età più avanzate. Recenti studi epidemiologici hanno indicato una prevalenza di placca carotidea determinante stenosi moderata, ovvero pari al 50-70% secondo criteri di velocità Doppler, nel 5% delle donne e nel 12% degli uomini asintomatici dal punto di vista neurologico sopra gli 80 anni (1).

Per contro, la presenza di stenosi carotidea critica, ovvero superiore al 70%, è riportata nell'1% delle donne anziane e nel 3% degli uomini anziani (1).

La prevalenza totale delle placche carotidee, indipendente dalla presenza e dal grado di stenosi carotidea associata, tuttavia appare essere molto più frequente, con alcuni lavori epidemiologici che la riportano fino al

*Indirizzo per la corrispondenza*

Francesco Moroni  
Ospedale San Raffaele,  
Via Olgettina 60, 20132 Milano.  
E-mail: moroni.francesco@hsr.it

Enrico Ammirati  
ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda,  
Piazza dell'Ospedale Maggiore, 3, 20162 Milano  
E-mail: enrico.ammirati@ospedaleniguarda.it

40% degli adulti sopra i 45 anni (2). La presenza di aterosclerosi carotidea è rilevante per il rischio di manifestazioni cliniche ad elevata morbidità e mortalità. In primo luogo, essendo il processo aterosclerotico un processo di tipo degenerativo a carico dell'intero albero arterioso, il riscontro di malattia conlamatata a livello carotideo consente di identificare il paziente come globalmente ad elevato rischio cardiovascolare, per manifestazioni anche in altri distretti (3). In secondo luogo, la presenza di placca aterosclerotica carotidea è un noto fattore causativo nello sviluppo di ictus cerebri ischemico (4). Da ultimo, la presenza di aterosclerosi carotidea è stata messa in relazione con lo sviluppo di lesioni cerebrali di carattere subclinico, che vengono comunemente identificate in modo incidentale in immagini di tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica (RM) cerebrale effettuate spesso per altri motivi rispetto alla valutazione dell'encefalo in paziente con placca carotidea.

### **Aterosclerosi carotidea e ictus ischemico**

Si definisce per ictus cerebri la comparsa acuta di deficit neurologici focali persistenti per più di 24 ore o associati ad evidenza alla diagnostica per immagini di danno parenchimale cerebrale, piuttosto che il decesso non giustificabile se non come correlato a malattia cerebrovascolare (4). Tale manifestazione può essere secondaria ad emorragia intraparenchimale cerebrale, ictus emorragico, oppure a ischemia acuta della sostanza cerebrale, tendenzialmente per occlusione di uno dei rami di vascolarizzazione terminale del parenchima cerebrale (4). Oltre l'87% degli ictus sono di natura ischemica. L'incidenza annua dell'ictus si associa a significativa

variabilità geografica, con valori che spaziano da 60 su 100.000 abitanti in Kuwait a 504 su 100.000 abitanti in Lituania (5). Anche in termini di sopravvivenza sono riportati dati estremamente eterogenei: la mortalità annua attribuita a ictus ischemico per esempio, è stimata di 25 su 100.000 in Francia, mentre è pari a 264 su 100.000 in Afghanistan. Globalmente, circa il 30% dei pazienti va incontro ad exitus per complicanze correlabili al primo episodio di ictus ischemico (5). In coloro che sopravvivono comunque le conseguenze sono frequentemente altamente invalidanti, con oltre il 50% costretto a limitazioni permanenti nella propria autonomia (6). Si stima in effetti che ad oggi l'ictus emorragico sia globalmente la terza causa di disabilità al mondo (7). La placca aterosclerotica carotidea è un noto fattore causativo di ictus ischemico cerebrale che vede la fibrillazione atriale come causa principale. Si stima che circa il 20% del totale degli ictus ischemici siano attribuibili alla presenza di placca aterosclerotica carotidea, con un rischio circa 4 volte più elevato negli uomini (8). Dal punto di vista patofisiologico, si ritiene che la placca carotidea possa essere alla base di fenomeni di embolismo arterio-arterioso, con il rilascio di materiale aterotrombotico nel circolo cerebrale (9). L'incidenza di ictus sembra essere correlato al grado della stenosi carotidea. In particolare negli individui con stenosi carotidea moderata il tasso annuale di primo ictus si attesta tra lo 0,35% e l'1,3%, mentre nei soggetti con stenosi significativa, determinante una riduzione del lume vascolare maggiore del 70%, l'incidenza annuale di ictus ischemico è stimata intorno allo 0,5%-5% (10). Tradizionalmente è quindi stato raccomandato un trattamento preventivo aggressivo principalmente farmacologico nel primo gruppo, fino ad arrivare ad un approccio chirurgico nel secondo gruppo.

Placche carotidee determinanti stenosi <50% sono comunemente state considerate alla stregua di un fattore di rischio cardiovascolare, prive di significato patogenetico diretto nello sviluppo di ictus. Tuttavia, nuovi dati si stanno accumulando sul ruolo causativo diretto di placche di piccole dimensioni nell'ictus. In una sottoanalisi dello studio NAVIGATE ESUS, studio che ha confrontato rivaroxaban e acido acetilsalicilico nei pazienti con ictus criptogenetico ha mostrato un'associazione tra l'ictus qualificante l'ingresso nello studio e la presenza ipsilaterale di placca carotidea <50% (11). In particolare, una recente indagine su circa 24.000 soggetti seguiti per 8 anni ha mostrato una relazione logaritmica lineare diretta tra l'incidenza di ictus ischemico e il carico aterosclerotico totale, valutato come numero di placche totali a livello delle carotidi bilateralemente (12). La relazione è tanto più stretta tanto più la placca è riscontrata in età giovanile (12). In questo studio inoltre è stata osservata un'associazione tra placca carotidea e ictus di tipo lacunare, che tradizionalmente viene considerato di natura microvascolare (12). Il legame tra l'ictus lacunare e la placca carotidea non è ben chiaro, ma considerando il comune riscontro di fenomeni microembolici ipsilaterali rispetto alla placca carotidea (13), si può ipotizzare che l'occlusione microvascolare da microembolismo giochi un ruolo. In quest'ottica, la presenza di una placca predisposta alla rottura e al rilascio di materiale embolico in circolo potrebbe essere rilevante tanto quanto il grado di stenosi da essa determinata. In particolare, negli ultimi anni studi di patobiologia dell'aterosclerosi hanno identificato caratteristiche di vulnerabilità della placca aterosclerotica che predispongono allo sviluppo di complicanze cardiovascolari acute (14). Tali caratteristiche frequentemente possono essere identificate

mediante tecniche di diagnostica per immagine cardiovascolare non invasivo, consentendo un'accurata valutazione morfofunzionale della singola placca. In particolare, è stato dimostrato da studi istopatologici che le placche più prone alla rottura sono quelle con un nucleo lipidico-necrotico più ampio, un cappuccio fibroso che contiene il nucleo lipidico più sottile, con un'elevata infiltrazione da parte di cellule infiammatorie e la presenza di neovascularizzazione di placca, che predispone all'emorragia intraplacca e conseguente rottura (15, 16). La combinazione di diverse modalità di imaging vascolare nel distretto carotideo è in grado di dimostrare in vivo tutte le caratteristiche su citate. In particolare, l'RM è in grado di definire con discreta risoluzione spaziale il nucleo (o *core*) necrotico centrale, che è visualizzato come ipointenso nelle sequenze T2 pesate (17). Le sequenze T1 pesate per contro consentono di vedere il cappuccio fibroso, che appare come una linea ipointensa che separa il nucleo dal lume vascolare, e le emorragie intraplacca (18). La valutazione con angio-TC consente la caratterizzazione della composizione della placca mediante la valutazione quantitativa della densità ai raggi X della placca stessa in unità Hounsfield (HU). In particolare, le placche ricche in tessuto fibroso e calcio, tipicamente con fenotipo più stabile, tendono ad avere una densità elevata, mentre quelle più ricche di lipidi e quindi con un core necrotico più sviluppato, instabili, hanno una densità più bassa (19). La risoluzione spaziale elevata dell'angio-TC inoltre consente di valutare in modo puntuale la morfologia della superficie della placca stessa, consentendo di identificare ulcere ed erosioni, caratteristiche ad elevato rischio (20). La tomografia ad emissione di protoni (PET) è in grado, soprattutto se combinata con l'imaging anatomico ad alta

risoluzione fornito dall'angio-TC, di caratterizzare in maniera molto elegante i processi di biologia molecolare attivi all'interno della placca carotidea. In particolare, differenti composti chimici marcati con traccianti radioattivi beta-emettitori possono accumulare selettivamente in placche instabili rispetto alle placche non biologicamente attive. L'analogo del glucosio marcato con fluoro beta-emettitore, fluorodesossiglucosio (FDG), si accumula selettivamente nei tessuti ad elevata attività metabolica. Nello studio delle placche carotidee, è stato dimostrato che l'accumulo focale intraplacca si associa ad un'elevata infiltrazione locale di cellule immunitarie, caratteristica tipica delle placche instabili (21). Altri marcatori più specifici per la presenza di macrofagi attivati all'interno della placca sono risultati essere <sup>11</sup>C-PK11195, ligando selettivo per la proteina Translocator Protein, 18kDa, espresso ad elevata densità sulla superficie dei macrofagi attivati (22), e <sup>18</sup>F-fluorocolina, analogo radiomarcato della colina, precursore dei fosfolipidi di membrana, captato dalle cellule ad elevata attività replicativa come i macrofagi delle placche instabili (23). Un'ulteriore caratteristica valutabile in PET è quella della deposizione attiva di microcristalli di calcio all'interno della placca, una caratteristica di rimaneggiamento della placca che si associa ad instabilità, mediante il tracciante <sup>18</sup>F-NaF (24). L'ecografia bidimensionale consente di valutare in maniera qualitativa la composizione della placca, andando a valutare l'ecogenicità e la composizione tissutale della placca stessa. In particolare placche ipoecogene o a ecogenicità mista appaiono essere più instabili, mentre placche più ipereogene risultano essere più stabili (25, 26). L'utilizzo di mezzi di contrasto ecografico, costituiti da microbolle di gas inerte a distribuzione strettamente intravascolare, con-

sente, combinato alla elevata risoluzione spaziale e temporale della metodica ecografica, una valutazione accurata della presenza di microvasi all'interno delle placche aterosclerotiche (27). L'armamentario di tecniche non invasive per la caratterizzazione delle placche aterosclerotiche carotidee è di fatto estremamente ampio. Tuttavia, la maggior parte di queste tecniche non ha ad oggi una validazione prospettica, e non se ne conosce il potenziale ruolo nel guidare le scelte terapeutiche per la prevenzione dell'ictus ischemico. Ci auspiciamo che nel futuro nuovi dati consentano di dimostrare l'utilità clinica della caratterizzazione imaging del fenotipo di placca associato a dati clinico-laboratoristici nella gestione dei pazienti con aterosclerosi carotidea.

### **Aterosclerosi carotidea e danno cerebrale subclinico**

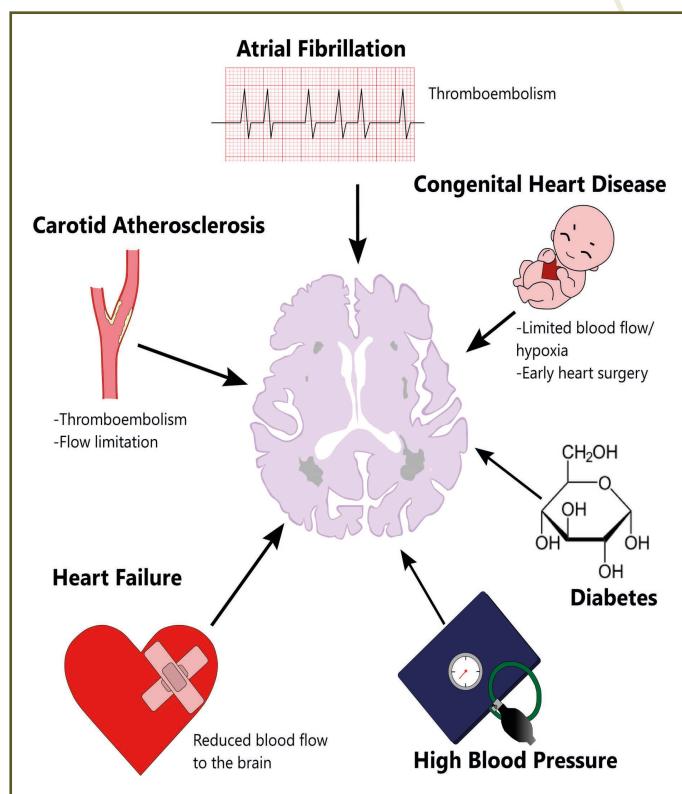
La presenza di aterosclerosi carotidea, anche non emodinamicamente significativa, è stata messa in relazione a un rischio incrementato di danno cerebrale subclinico, finanche allo sviluppo di atrofia cerebrale e decadimento cognitivo (28).

### ***Il caso delle iperintensità della materia bianca***

Le iperintensità della materia bianca, più comunemente note con il termine inglese white matter hyperintensities (WMH) sono definite come aree di iperintensità di segnale nelle sequenze T2 pesate in RM sparse nella materia bianca profonda o in regione periventricolare (29). Vengono riscontrate comunemente in soggetti asintomatici ed hanno una prevalenza che incrementa con l'età. Si stima che l'11-21% dei soggetti peraltro sani di età attorno ai 65 anni e il 64-94% dei soggetti con circa 80 anni di età pre-

sentino WMH (30). Nonostante siano del tutto asintomatiche, le WMH sono state associate a ridotta autonomia nelle attività quotidiane ed alterazioni del tono dell'umore e dell'equilibrio (31). Ulteriori studi hanno dimostrato un'associazione tra WMH e un rischio incrementato di ictus cerebri, demenza e di mortalità globale (32). Le WMHs si sono riscontrati associate a differenti condizioni come riportato in *Figura 1*.

Pochi studi ad oggi si sono cimentati nella caratterizzazione istopatologica delle WMH. Attualmente queste lesioni vengono considerate un'entità patologica alquanto disomogenea, con aspetto diverso a seconda dello stadio. I primi lavori hanno descritto foci di demielinizzazione e perdita assonale, con cavitazione e ridotta densità gliale nella materia bianca (33, 34). Successivamente sono state descritte forme caratterizzate da edema cronico, con disfunzione primaria della barriera ematoencefalica (35). Anche la patogenesi di queste lesioni è ad oggi ancora da definire. Il riscontro istologico di arteriole tortuose e la valutazione dei flussi cerebrali hanno inizialmente fatto focalizzare l'attenzione su una genesi ischemica e vascolare di queste alterazioni (36). La presenza di alterata *compliance* arteriosa in particolare ha mostrato essere un fattore determinante nella progressione di queste lesioni a 20 anni di follow up (37). Tali ipotesi sono state validate da studi immunoistochimici e di espressione genica tissutale (38). Le WMH potrebbero quindi rappresentare dei nuovi marcatori di rischio cerebrovascolare nei soggetti con placca carotide, come se potessero aiutare a identificare i soggetti con placca *vulnerable*. Infatti, le WMH sono emerse come dei fattori di rischio per l'insorgenza di ictus ischemico e sono state associate al decadimento cognitivo su base vasco-



**Figura 1** - Riassunto delle possibili cause delle white matter hyperintensities.

Con permesso dall'editore da Moroni et al. (44).

lare. Qualora venisse meglio dimostrato che le WMH costituiscono dei marcatori di ischemia cerebrale in stretta relazione con l'insorgenza di ictus ischemico o decadimento cognitivo potrebbero essere utilizzate anche come *endpoint* surrogati in studi per dimostrare l'efficacia di alcuni trattamenti nel prevenire appunto l'insorgenza delle suddette patologie. Dati successivi su ampie popolazioni sembrano tuttavia suggerire un ruolo altrettanto rilevante del sistema immunitario nello sviluppo di WMH (39).

La presenza di placche aterosclerotiche carotidi potrebbe contribuire alla genesi delle WMH con molteplici meccanismi. Da un lato, la presenza di placche

può modulare in senso negativo il flusso ematico cerebrale, mentre dall'altro le placche carotidee indipendentemente dal grado di stenosi possono agire da sorgente di microemboli (13). La relazione tra placca carotidea e WMH è tuttavia ancora oggetto di intenso dibattito. In una metaanalisi pubblicata dal nostro gruppo comprendente 5306 soggetti, la presenza di placca aterosclerotica carotidea risultava significativamente associata alla presenza di WMH (Odds Ratio - OR - 1.42) (40). La potenziale patogenesi ateroembolica è supportata da alcuni piccoli studi di correlazione tra la presenza di placca instabile e di WMH ipsilateralmente (41). Per contro, altri studi non sono riusciti a dimostrare un legame tra la presenza di placca aterosclerotica carotidea e WMH (42). In taluni casi, l'accento è stato posto più che altro sulla presenza nei pazienti con WMH di molteplici fattori di rischio cardiovascolare, come per esempio diabete mellito e ipertensione arteriosa (43). Questi fattori di rischio contribuirebbero alla genesi ischemica delle WMH compromettendo la funzione microvascolare cerebrale (44).

#### *Sviluppo di nuove WMH e placca carotidea: lo studio IMPLAC*

In un recente studio prospettico condotto dal nostro gruppo, pubblicato sulla rivista *Atherosclerosis* (Imaging della PLAcca Carotidea - IMPLAC, registrato su ClinicalTrials.gov come NCT03333330 e su EudraCT come 2012-000648-83) in soggetti asintomatici con placca carotidea di entità moderata e senza indicazione ad intervento di endoarterectomia è stato valutato quanti soggetti ad un follow up mediano di 595 giorni (range interquartile 553-641) modificassero il numero delle WMHs alla RM cerebrale (45).

I soggetti nello studio hanno eseguito una valutazione del loro profilo di rischio

clinico, di storia cardiologica, della terapia in atto, degli esami del sangue e una caratterizzazione della placca carotidea mediante 3 distinte tecniche: ecocolor-Doppler dei tronchi sovra-aortici standard, ecocontrastografia con utilizzo del mezzo di contrasto zolfo esafluouro (Sonovue prodotto da Bracco) e angio-TC dei vasi arteriosi del collo.

È stata inoltre eseguita una caratterizzazione di linfociti e dei monociti circolanti nel sangue di questi individui alla ricerca di biomarcatori cellulari in grado di predire variazioni a livello cerebrovascolare. Gli stessi soggetti in un arco di circa 3 settimane sono stati sottoposti anche ad una RM encefalo mirata a documentare la presenza di infarti cerebrali silenti, la presenza e la quantificazione numerica e di volume totale delle WMH e il valore normalizzato dei volumi cerebrali, totali, della sostanza bianca e della sostanza grigia. Dopo il periodo suddetto i pazienti hanno eseguito una seconda RM encefalo per rivalutare la comparsa di infarti cerebrali silenti, la progressione delle WMH e la variazione dei volumi cerebrali. In totale si è disposto di 51 pazienti con RM encefalo al basale e al follow up, che hanno costituito la popolazione delle analisi principali. I pazienti avevano una media di 69 anni di età e nel 45% erano donne. Tutti avevano una placca carotidea valutata con stima con tecnica Doppler inferiore al 70% di stenosi. Tra questi circa un terzo dei pazienti aveva una placca tra il 50 e il 70% sempre definita mediante la tecnica Doppler mentre i restanti avevano una placca inferiore al 50%. Il dato principale è stato che il 49% degli individui (n=25) avevano una nuova WMH alla seconda RM encefalo. Questi soggetti chiamati nello studio *progressors* sviluppavano mediamente 5 nuove WMH, pari a circa 134 mm<sup>3</sup> di volume di nuove lesioni. I restanti

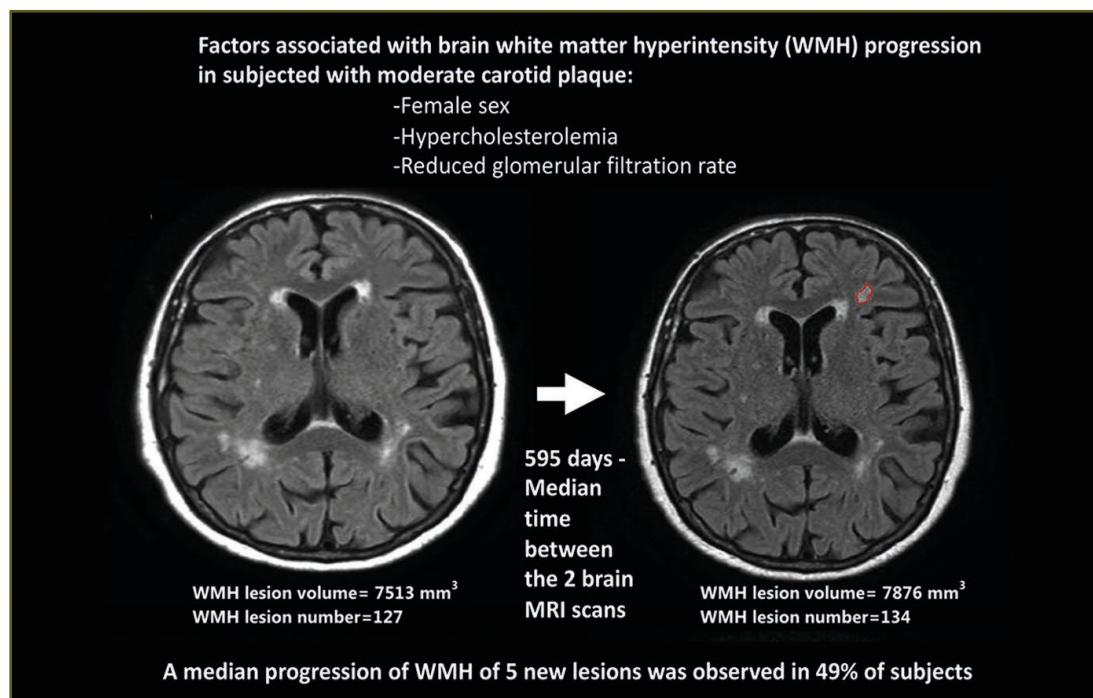
26 soggetti, pari al 51% degli individui non avevano nessuna progressione, come detto ad un follow up relativamente breve pari a circa 20 mesi. Nessun soggetto ha riportato un infarto cerebrale silente.

Nessun dato che poteva emergere dalla caratterizzazione della placca carotidea con metodiche di imaging è emerso associato alla progressione delle WMH. In particolare, l'identificazione della vascularizzazione di placca evidenziabile con l'ecocontrasto, che era uno dei candidati ad identificare quei pazienti con placca potenzialmente *instabili* e quindi a maggior rischio di sviluppare nuove lesioni cerebrali silenti, non si è associato alla comparsa di nuove WMH e nemmeno al basale si è associato con un numero maggiore di WMH.

Anche i dati di caratterizzazione mediante angio-TC quali il rimodellamento positivo di placca, la ricerca di microcalcificazioni, e la presenza di ulcere di placca non hanno identificato dei predittori di progressione delle WMH.

Per quanto riguardava i dati dei biomarcatori cellulari linfocitari e monocitari si è osservato un eguale risultato negativo. I predittori di progressione delle WMHs che si sono osservati prevalenti nei soggetti definiti *progressors* sono stati il sesso femminile, la storia di ipercolesterolemia e la riduzione della funzione renale (*Figura 2*).

Va detto che tra i criteri di esclusione, per non esporre potenziale danno renale da mezzo di contrasto iodato erano stati esclusi i soggetti con insufficienza renale



**Figura 2** - Rappresentazione di un paziente con progressione delle lesioni cerebrali silenti (white matter hyperintensities, WMH) con placca carotidea intermedia dopo 595 giorni di follow up.

Vengono inoltre riportati i fattori emersi come indipendentemente associati alla progressione delle WMH emersi in questo studio prospettico che sono il sesso femminile, l'ipercolesterolemia e il ridotto filtrato glomerulare. Con permesso dall'editore da Ammirati et al. (45).

cronica di grado 3 o superiore. Sulla base del nostro studio, i marcatori di progressione di WMH sono facilmente identificabili anche in ambulatorio senza particolari esami, a parte l'essere già a conoscenza della presenza di placca carotidea di entità moderata.

Quello che non sappiamo è se questa progressione di 5 lesioni sia clinicamente significativa, e se la progressione ha un andamento lineare tale per cui gli stessi fattori di rischio identificati a circa 20 mesi di follow up siano validi anche per follow up di 5 o 10 anni. Anche se all'analisi multivariata non è più emerso come un fattore associato alla comparsa di nuove WMH il carico basale di WMH registrato alla prima RM, questo fattore era emerso all'analisi univariata. Questo fa prevedere che i soggetti con un carico maggiore di lesioni in un certo periodo possano svilupparne di più; anche se non conosciamo quali siano dei modificatori della comparsa della WMH. È possibili che farmaci che correggono l'ipertensione arteriosa ad esempio possano avere un ruolo protettivo, ma il nostro studio non aveva la potenza per indagare questo interessante aspetto, anche per il fatto che l'ipertensione arteriosa era un fattore di rischio altamente prevalente nei soggetti in esame (78%) e praticamente tutti fossero in trattamento.

### Conclusioni

La placca carotidea è comune nella popolazione generale, ed è un noto fattore causativo nello sviluppo di ictus ischemico. Dati recenti hanno dimostrato come la potenzialità patogena della placca non sia esclusivamente determinata dal grado di stenosi come comunemente accettato

nella attuale pratica clinica. È pertanto opportuno cercare di caratterizzare al meglio la presenza di placca instabile nella stratificazione del rischio di ictus ischemico. La presenza di placca carotidea è stata legata allo sviluppo di danno cerebrale subclinico, in particolare le WMH, ma al momento non ci sono sufficienti dati a supporto di un ruolo patogenetico diretto.

Ulteriori studi saranno necessari per chiarire il complesso rapporto tra aterosclerosi carotidea e danno cerebrale subclinico. Da un recente studio prospettico è emerso come una progressione delle WMH, come detto un possibile marcatore di soggetti a maggior rischio di ictus cerebri, si associa al sesso femminile, all'ipercolesterolemia e alla ridotta funzione renale nei soggetti con placca carotidea. Tale dato va validato in studi di popolazione di maggiore dimensione.

Tale informazione però potrebbe avere una ricaduta clinica, nel considerare questi pazienti a maggior rischio cerebro-vascolare. Tali soggetti potrebbero andare incontro a un monitoraggio con una cadenza più frequente o a un trattamento dei fattori di rischio cardiovascolare più intenso. In ogni caso, ulteriori studi prospettici dovranno valutare se trattamenti preventivi siano in grado di ridurre le WMH, come ad esempio trattamenti anti-ipertensivi o in grado di ridurre i livelli di colesterolo.

### Finanziamenti

Il dott. Enrico Ammirati ha ricevuto un finanziamento "Giovane Ricercatore 2009 Grant" dal Ministero Italiano della Salute (codice progetto GR-2009-1608780) per condurre studi su questo argomento specifico.

## RIASSUNTO

Il riscontro di placche aterosclerotiche carotidee è comune nella popolazione generale, con una prevalenza che incrementa con l'età. Oltre ad essere un marcatore di rischio cardiovascolare incrementato, la placca carotidea è un noto fattore eziopatogenetico nello sviluppo di ictus cerebri ischemico su base atero-embolica. Negli ultimi anni, la presenza di aterosclerosi carotidea è stata legata allo sviluppo di malattia cerebrale subclinica, in particolare alle lesioni della materia bianca encefaliche iperintense valutate mediante risonanza magnetica cerebrale, meglio note con il nome inglese di White Matter Hyperintensities (WMH). Tali lesioni sono emerse come fattori predisponenti allo sviluppo di decadimento cognitivo, malattie neurodegenerative e ictus cerebri di natura ischemica. Sebbene non sia ancora stata definita chiaramente l'eziologia di tali alterazioni cerebrali, si ritiene che alla loro base siano presenti alterazioni vascolari e microvascolari locali. Lo scopo della presente rassegna è quello di discutere la complessa relazione tra patologia aterosclerotica carotidea e malattia cerebrovascolare, con un focus particolare sulle WMH nei pazienti con placca carotidea alla luce di recenti studi.

**Parole chiave:** *aterosclerosi, placca carotidea, ictus cerebri, white matter hyperintensities.*

## Bibliografia

1. de Weerd M, Greving JP, Hedblad B, Lorenz MW, Mathiesen EB, O'Leary DH, et al. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta-analysis. *Stroke.* 2010; 41: 1294-1297.
2. Zhan C, Shi M, Yang Y, Pang H, Fei S, Bai L, et al. Prevalence and Risk Factors of Carotid Plaque Among Middle-aged and Elderly Adults in Rural Tianjin, China. *Sci Rep.* 2016; 6: 23870.
3. W. LM, S. MH, L. BM, Maria R, Matthias S. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness. *Circulation [Internet].* 2007; 115: 459-467. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875>.
4. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. *Stroke.* Lancet (London, England). 2008; 371: 1612-1623.
5. Krishnamurthi R V, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Heal.* 2013; 1: e259-81.
6. Hankey GJ, Warlow CP. Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet (London, England).* 1999; 354: 1457-1463.
7. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England).* 2012; 380: 2197-2223.
8. Petty GW, Brown RDJ, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. *Stroke.* 1999; 30: 2513-2516.
9. Rothwell PM, Gibson R, Warlow CP. Interrelation between plaque surface morphology and degree of stenosis on carotid angiograms and the risk of ischemic stroke in patients with symptomatic carotid stenosis. On behalf of the European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Stroke.* 2000; 31: 615-621.
10. den Hartog AG, Achterberg S, Moll FL, Kappelle LJ, Visseren FLJ, van der Graaf Y, et al. Asymptomatic carotid artery stenosis and the risk of ischemic stroke according to subtype in patients with clinical manifest arterial disease. *Stroke.* 2013; 44: 1002-1007.
11. Ntaios G, Swaminathan B, Berkowitz SD, Gagliardi RJ, Lang W, Siegler JE, et al. Efficacy and Safety of Rivaroxaban Versus Aspirin in Embolic Stroke of Undetermined Source and Carotid Atherosclerosis. *Stroke.* 2019; 50: 2477-2485.
12. Parish S, Arnold M, Clarke R, Du H, Wan E, Kurmi O, et al. Assessment of the Role of Carotid Atherosclerosis in the Association Between Major Cardiovascular Risk Factors and Ischemic Stroke Subtypes. *JAMA Netw Open [Internet].* 2019; 2: e194873-e194873. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.4873>.
13. Markus HS, King A, Shipley M, Topakian R, Cullinane M, Reihill S, et al. Asymptomatic embolisation for prediction of stroke in the Asymptomatic Carotid Emboli Study (ACES): a prospective observational study. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 663-671.
14. Camici PG, Rimoldi OE, Gaemperli O, Libby P.

- Non-invasive anatomic and functional imaging of vascular inflammation and unstable plaque. *Eur Heart J.* 2012; 33: 1309-1317.
15. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2316-2325.
  16. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J.* 2013; 34: 719-728.
  17. Mitsumori LM, Hatsukami TS, Ferguson MS, Kerwin WS, Cai J, Yuan C. In vivo accuracy of multisquence MR imaging for identifying unstable fibrous caps in advanced human carotid plaques. *J Magn Reson Imaging.* 2003; 17: 410-420.
  18. Yuan C, Mitsumori LM, Ferguson MS, Polissar NL, Echelard D, Ortiz G, et al. In vivo accuracy of multispectral magnetic resonance imaging for identifying lipid-rich necrotic cores and intraplaque hemorrhage in advanced human carotid plaques. *Circulation.* 2001; 104: 2051-2056.
  19. Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, McKinsey JF, Schwartz LB, Katz D, et al. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg.* 2004; 40: 262-269.
  20. Walker LJ, Ismail A, McMeekin W, Lambert D, Mendelow AD, Birchall D. Computed tomography angiography for the evaluation of carotid atherosclerotic plaque: correlation with histopathology of endarterectomy specimens. *Stroke.* 2002; 33: 977-981.
  21. Rudd JHF, Narula J, Strauss HW, Virmani R, Machac J, Klimas M, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation by fluorodeoxyglucose with positron emission tomography: ready for prime time? *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55: 2527-2535.
  22. Gaemperli O, Shalhoub J, Owen DRJ, Lamare F, Johansson S, Fouladi N, et al. Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with <sup>11</sup>C-PK11195 positron emission tomography/computed tomography. *Eur Heart J.* 2012; 33: 1902-1910.
  23. Voo S, Kwee RM, Sluimer JC, Schreuder FHBM, Wiers R, Bauwens M, et al. Imaging Intraplaque Inflammation in Carotid Atherosclerosis With <sup>18</sup>F-Fluorocholine Positron Emission Tomography-Computed Tomography: Prospective Study on Vulnerable Atheroma With Immunohistochemical Validation. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2016; 9.
  24. Oliveira-Santos M de, Castelo-Branco M, Silva R, Gomes A, Chichorro N, Abrunhosa A, et al. Atherosclerotic plaque metabolism in high cardiovascular risk subjects - A subclinical atherosclerosis imaging study with <sup>(18)</sup>F-NaF PET-CT. *Atherosclerosis.* 2017; 260: 41-46.
  25. Polak JF, Shemanski L, O'Leary DH, Lefkowitz D, Price TR, Savage PJ, et al. Hypoechoic plaque at US of the carotid artery: an independent risk factor for incident stroke in adults aged 65 years or older. *Cardiovascular Health Study. Radiology.* 1998; 208: 649-654.
  26. Sterpetti AV, Schultz RD, Feldhaus RJ, Davenport KL, Richardson M, Farina C, et al. Ultrasonographic features of carotid plaque and the risk of subsequent neurologic deficits. *Surgery.* 1988; 104: 652-660.
  27. Coli S, Magnoni M, Sangiorgi G, Marrocco-Trischitta MM, Melisurgo G, Mauriello A, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging of intraplaque neovascularization in carotid arteries: correlation with histology and plaque echogenicity. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52: 223-230.
  28. Gardener H, Wright CB, Rundek T, Sacco RL. Brain health and shared risk factors for dementia and stroke. *Nat Rev Neurol.* 2015; 11: 651-657.
  29. Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, Cordonnier C, Fazekas F, Frayne R, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2013; 12: 822-838.
  30. Ylikoski A, Erkinjuntti T, Raininko R, Sarna S, Sulkava R, Tilvis R. White matter hyperintensities on MRI in the neurologically nondiseased elderly. Analysis of cohorts of consecutive subjects aged 55 to 85 years living at home. *Stroke.* 1995; 26: 1171-1177.
  31. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 689-701.
  32. Debette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010; 341: c3666.
  33. Fazekas F, Kleinert R, Offenbacher H, Schmidt R, Kleinert G, Payer F, et al. Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology.* 1993; 43: 1683-9.
  34. Munoz DG, Hastak SM, Harper B, Lee D, Hachinski VC. Pathologic correlates of increased signals of the centrum ovale on magnetic resonance imaging. *Arch Neurol.* 1993; 50: 492-497.
  35. Black S, Gao F, Bilbao J. Understanding white matter disease: imaging-pathological correlations in vascular cognitive impairment. *Stroke.* 2009; 40(3 Suppl): S48-S52.

36. Fernando MS, O'Brien JT, Perry RH, English P, Forster G, McMeekin W, et al. Comparison of the pathology of cerebral white matter with post-mortem magnetic resonance imaging (MRI) in the elderly brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004; 30: 385-395.
37. de Havenon A, Wong K-H, Elkhetali A, McNally JS, Majersik JJ, Rost NS. Carotid Artery Stiffness Accurately Predicts White Matter Hyperintensity Volume 20 Years Later: A Secondary Analysis of the Atherosclerosis Risk in the Community Study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2019; 40: 1369-1373.
38. Simpson JE, Wharton SB, Cooper J, Gelsthorpe C, Baxter L, Forster G, et al. Alterations of the blood-brain barrier in cerebral white matter lesions in the ageing brain. *Neurosci Lett*. 2010; 486: 246-251.
39. Lin Q, Huang W-Q, Ma Q-L, Lu C-X, Tong S-J, Ye J-H, et al. Incidence and risk factors of leukoaraiosis from 4683 hospitalized patients: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96: e7682.
40. Moroni F, Ammirati E, Magnoni M, D'Ascenzo F, Anselmino M, Anzalone N, et al. Carotid atherosclerosis, silent ischemic brain damage and brain atrophy: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2016; 223: 681-687.
41. Altaf N, Daniels L, Morgan PS, Lowe J, Gladman J, MacSweeney ST, et al. Cerebral white matter hyperintense lesions are associated with unstable carotid plaques. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006; 31: 8-13.
42. Baradaran H, Mtui EE, Richardson JE, Delgado D, Gupta A. Hemispheric Differences in Leukoaraiosis in Patients with Carotid Artery Stenosis: A Systematic Review. *Clin Neuroradiol*. 2017; 27: 7-13.
43. Yano Y, Bakris GL, Inokuchi T, Ohba Y, Tamaki N, Nagata M, et al. Association of cognitive dysfunction with cardiovascular disease events in elderly hypertensive patients. *J Hypertens*. 2014; 32: 423-431.
44. Moroni F, Ammirati E, Rocca MA, Filippi M, Magnoni M, Camici PG. Cardiovascular disease and brain health: Focus on white matter hyperintensities. *IJC Hear Vasc*. 2018; 19: 63-69.
45. Ammirati E, Moroni F, Magnoni M, Rocca MA, Anzalone N, Cacciaguerra L, et al. Progression of brain white matter hyperintensities in asymptomatic patients with carotid atherosclerotic plaques and no indication for revascularization. *Atherosclerosis*. 2019; 287: 171-178.

**NUTRACEUTICA**

# **LA NUTRACEUTICA NEL BAMBINO DISLIPIDEMICO**

## **Nutraceutics in the dyslipidemic child**

**GIULIA MASSINI<sup>1</sup>, RAFFAELE BUGANZA<sup>1,2</sup>, LUISA DE SANCTIS<sup>1,3</sup>,  
ORNELLA GUARDAMAGNA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Ospedale Infantile Regina Margherita, Università di Torino;

<sup>2</sup>Scuola di specializzazione in Pediatria, Università di Torino;

<sup>3</sup>SSD Endocrinologia Pediatrica, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino

**SUMMARY**

The use of nutraceuticals is increasing through modified foods as well as other formulations. They represent suitable dietary supplements useful to improve lipid profile when diet alone does not reach the expected result. Attention should be paid to the nutraceutical choice and a follow-up is required to confirm results and to avoid adverse effects. Pediatric age then requires a further attention as children at cardiovascular risk need to undergo any suitable strategy to improve their outcome but growth needs must be considered. The present review is the synthesis of controlled studies conducted on children and adolescents concerning nutraceuticals on the market including Phytosterols, Fibers, Red Yeast Rice, Probiotics, Polyunsaturated Fatty Acids Omega-3/6 series, Soy derivatives and Nut with the aim to provide an update useful in the pediatric practice.

**Keywords:** *Nutraceuticals, Dyslipidemia, Children, Hypercholesterolemia, Phytosterols, Fiber, Omega3/6 PUFA, Monacolin K, Probiotics, Soy Protein, Dried Fruit.*

**Introduzione**

Le dislipidemie rappresentano un importante fattore di rischio cardiovascolare. Un aumento del colesterolo sierico totale (CT) e del colesterolo LDL (LDL-C), bassi livelli di colesterolo HDL (HDL-C) e/o valori elevati di trigliceridi (TG) influiscono ne-

gativamente su cuore e vasi sin dall'età pediatrica (1). Bambini e adolescenti affetti da dislipidemia primitiva o secondaria dovrebbero essere sottoposti ad un trattamento che ne migliori il profilo lipidico allo scopo di rispettare gli obiettivi stabiliti dalle linee guida dell'American Academy of Pediatrics (AAP) (2). I livelli sierici di LDL-C sono considerati accettabili se  $\leq 130$  mg/dl e sicuri se  $\leq 110$  mg/dl (3). La terapia, inizialmente basata su un corretto regime alimentare e, ove indicato, sull'impiego di farmaci, si avvale anche dell'utilizzo di sostanze nutraceutiche, che rappresentano un'opzione talora utile nella pratica clinica dell'adulto. L'Espe-

*Indirizzo per la corrispondenza*

Ornella Guardamagna  
Dipartimento di Scienze  
della Sanità Pubblica e Pediatriche  
Piazza Polonia, 94 - 10126 Torino  
E-mail : ornella.guardamagna@unito.it

rienza dell'impiego di nutraceutici in pediatria è tuttavia limitata poiché scarsi sono gli studi randomizzati e controllati (RCT) e per lo più limitati a casistiche ristrette. La maggior parte di questi studi prevedono principalmente la somministrazione di fibra e fitosteroli/fitostanoli, mentre sporadici sono i trials che includono estratti di riso rosso fermentato, proteine della soia, probiotici, acidi grassi polinsaturi Omega-3 e Omega-6 (PUFAs) e frutta secca. Questa rassegna, sintesi delle pubblicazioni inerenti la selezione di studi randomizzati e controllati presenti sulla banca dati PubMed, si pone l'obiettivo di analizzare benefici e limiti dei nutraceutici in bambini e adolescenti iperlipidemici, allo scopo di verificarne il possibile impiego nella pratica clinica.

## Fibra

La fibra alimentare è una componente di alimenti di natura vegetale che comprende carboidrati complessi indigeribili quali polisaccaridi non amidacei (cellulosa, emicellulosa, gomme, pectine, crusca d'avena e di frumento), oligosaccaridi (inulina, frutto-oligosaccaridi) e lignina (sostanza non glucidica legata alla fibra). L'efficacia della fibra sul metabolismo lipidico, quale parte di un'alimentazione corretta, è stata dimostrata dalla riduzione dei livelli di CT (5-15%) e di LDL-C (9-22%) (4), pertanto l'efficacia è stata riconosciuta dalla European Food Safety Authority (5).

L'effetto ipolipemizzante dei diversi tipi di fibra dipende dalle proprietà chimico-fisiche e dalla viscosità di ognuna. La fibra alimentare insolubile e non fermentescibile (lignina) provoca un aumento della massa fecale ad effetto lassativo. Le fibre solubili, non viscose e fermentescibili (inulina, destrina, oligosaccaridi) favoriscono la sintesi di acidi grassi a catena corta quali acetato, butirrato e propionato; quest'ultimo asso-

ciato all'inibizione della sintesi del colesterolo (6, 7). Fibre solubili, viscose e fermentescibili ( $\beta$ -glucano, gomma di Guar, pectina, glucomannano) e non-fermentescibili (psyllium, emicellulosa) rallentano lo svuotamento gastrico e riducono l'assorbimento dei nutrienti. In particolare, nell'intestino tenue il processo di gelificazione sequestra i grassi alimentari, ostacola l'assorbimento del colesterolo e il riassorbimento degli acidi biliari, aumentandone così l'escrezione nelle feci: ne consegue la riduzione dei livelli circolanti di chilomicroni e colesterolo.

Psyllium, Glucomannano, Avena, Pectina e Gomma Guar sono disponibili in commercio addizionati agli alimenti, in capsule o in polvere aromatizzata. Lo Psyllium si ottiene dalla buccia del seme di Plantago Ovata e aggiunto ai cereali non ne altera il gusto o la consistenza, garantendo così una buona *compliance* (8). L'Avena, fibra alimentare solubile e viscosa (9) ottenuta dalla lavorazione dell'Avena Sativa, è un cereale caratterizzato da  $\beta$ -glucani, polisaccaridi lineari costituiti da molecole di glucosio unite insieme mediante legami glicosidici  $\beta$ (1-3) e  $\beta$ (1-4). La gomma di carrube, polvere bianca inodore e insapore, viene estratta dall'endosperma del fagiolo e si tratta di una fibra alimentare meno viscosa e più appetibile rispetto alla Gomma Guar, ma simile nel contenuto di proteine e galattomannani. In Grecia è stata utilizzata in diversi studi per il suo effetto lassativo tuttavia può causare ostruzione intestinale (10). Il Glucomannano, ricavato dal tubero *Amorphophallus Konjac*, è la fibra a più alto peso molecolare e più viscosa tra quelle note, con un contenuto di acqua otto volte superiore a quello dell'Avena (11) e determina una riduzione dei livelli di LDL-C superiore a quella ottenuta da Psyllium, Crusca (12), Avena e Orzo (13).

L'assunzione della fibra nei bambini è un tema dibattuto e le raccomandazioni variano a seconda dei paesi e delle linee

guida utilizzate. Riguardo alla quantità da somministrare la Food and Drug Administration stima i livelli necessari di assunzione di fibra in relazione all'apporto calorico della dieta (12g/1000 Kcal), mentre l'AAP si basa su peso ed età (14). Nella pratica clinica si applica prevalentemente la formula che corrisponde, in g/die, alla somma dell'età (nei bambini di età >3 anni) più 5 (15). Negli ultimi decenni si è osservato un peggioramento delle abitudini alimentari, la tendenza ad assumere più calorie del necessario, a seguire un'alimentazione sbilanciata per insufficiente apporto di frutta e

verdura, elevata assunzione di grassi saturi e prodotti industriali. Tali condizioni favoriscono l'insorgenza di dislipidemia, spesso correlata a obesità, ipertensione e diabete. La Dieta Mediterranea o un'alimentazione ricca di vegetali viceversa garantirebbero una corretta assunzione di fibra ma le linee guida dietetiche sono frequentemente disattese (16).

#### Evidenze scientifiche

Lo studio pediatrico più numeroso condotto sulla popolazione generale (n. 5873 giapponesi, età 10-11 anni) ha evidenziato

**Tabella I - Caratteristiche degli studi randomizzati e controllati riguardanti l'utilizzo di fibra in soggetti pediatrici dislipidemici.**

Nutraceutico	Tipo di studio	Casiistica	Scopo dello studio	Dose e durata dell'intervento	Eventi avversi	Aderenza	Effetti	Ref.
Psyllium	RCT	n. 36 bambini Età: 3-17 anni Criteri di inclusione: FH	Riduzione di CT e LDL-C dopo integrazione con psyllium	Età ≤7 anni: 5 g/die Età ≥7 anni: 10 g/die Durata: 8,0 ± 1,1 mesi	Nessuno	Buona	↓ TC: 18% ↓ LDL-C: 23% HDL-C e TG invariati	Glassman M et al., AJDC 1990
	DB-Co-RCT	n. 20 bambini Età: 5-17 anni Criteri di inclusione: LDL-C ≥110 mg/dl	Effetti dello psyllium e profilo lipidico in bambini IperCT	Counselling Dietetico Durata: 3 mesi Intervento: 6 g/die cereali, con psyllium o placebo Durata: 4-5 settimane Wash out: 2-settimane	Nessuno	80%	↑ TG nel gruppo controllo rispetto a gruppo di intervento	Dennison BA et al., J Pediatr 1993
	SB- RCT	n. 50 bambini Età: 2-11 anni Criteri di inclusione: LDL-C ≥110 mg/dL	Efficacia dello psyllium e riduzione di CT, LDL-C	CHILD I: tutti i gruppi Intervento: cereali contenenti 3.2 g di psyllium Durata: 12 settimane	Nessuno	Buona	↓ TC: - 9.6% ↓ LDL-C: -15.7% ↑ HDL-C: +9.96% ↓ TC/HDL: -17.9% ↓ LDL/HDL: -21.1%	Williams CL et al., J Am Coll Nutr 1995
	DB-Co-RCT	n. 32 bambini Età: 6-18 anni Criteri di inclusione: LDL-C ≥90° percentile per sesso ed età	Effetto ipolipemizzante di cereali addizionati a psyllium o a placebo dose di psyllium 6.4 g	8-settimane di dieta 58 g di cereali addizionati a psyllium o a placebo dose di psyllium 6.4 g Durata: 6 settimane	Disturbi gastro-intestinali 1 caso	n. 7 drop-out	↓ TC: -5% ↓ LDL-C: -6,8% HDL-C e TG invariati	Davidson MH et al., Am J Clin Nutr 1996
	DB-RCT	n. 51 bambini Età: 6-19 anni Criteri di inclusione: TC ≥175 mg/dl	Effetti dello psyllium su LDL-C in bambini e adolescenti brasiliani dislipidemici	CHILD II: 6 settimane Gruppo di intervento: 7.0 g/die psyllium Gruppo di controllo: 7.0 g/die cellulosa Durata: 8 settimane	Nessuno	n. 2 drop-out	↓ TC: -7.7% ↓ LDL-C: -10.7% HDL-C e LDL-C/ HDL-C invariati	Ribas SA et al., Br J Nutr 2015

&gt;&gt;&gt;

Nutraceutico	Tipo di studio	Casistica	Scopo dello studio	Dose e durata dell'intervento	Eventi avversi	Aderenza	Effetti	Ref.
Glucomannano	RCT	n. 51 bambini Criteri di inclusione: CT $\geq$ 90° percentile per sesso ed età familiarità per Ipercolesterolemia e CVD fino alla 2° generazione	Efficacia del Glucomannano sul profilo biochimico	Dieta CHILD I Glucomannano: $\leq$ 6 anni 2 g/day $\geq$ 6 anni 3 g/day Durata: 8 settimane	Nessuno	n. 11 drop-out	$\downarrow$ TC (F: -24%; M: -9%) $\downarrow$ LDL-C (F: -30%; M: -9%)	Martino F et al., NMCD 2005
	db-co-RCT	n. 36 FH bambini Età: 6-15 anni Criteri di inclusione: Valori basali di CT $\geq$ 90° perc.per sesso ed età	Efficacia e tollerabilità della supplementazione con glucomannano	Dieta CHILD I Durata: 4 settimane 2 cps/die di Glucomannano o placebo Durata: 8 settimane Wash-out: 4 settimane	Nessuno	92% e 90% rispettivamente per il gruppo di intervento e quello placebo	$\downarrow$ TC: 5.1% $\downarrow$ LDL-C: 7.3 % $\downarrow$ non-HDL-C: 7.2% TG, HDL-C, ApoA-I ApoB invariati	Guardamagna O et al., Nutrition 2013
Gomma di carrube	CO-RCT	n. 21 Soggetti n. 11 FCH n. 10 Sani Età: 10-18 anni	Effetto ipolipemizzante della gomma di carrube	Bambini: 10-20 g/day Durata: 8 settimane	Nessuno	Buona compliance	FCH $\downarrow$ TC: 10-17 % $\downarrow$ LDL-C: 11-19% Soggetti sani $\downarrow$ TC: 6-11% $\downarrow$ LDL-C: 6-10% p=0.001 tra gruppi	Zavoral JH et al., Am J Clin Nutr 1983
Pectina	RCT	n. 53 bambini LDL-C $\geq$ 135 mg/dl Età: 4-18 anni	Effetti della supplementazione di pectina sul profilo lipidico	dieta + supplementazione 50% pane di grano duro + 50% of pectina, 2-3 tavolette/die (50 mg/kg/die) Durata: 3 mesi	disturbi intestinali n. 2 casi	n. 2 drop-out	$\downarrow$ TC: -15% $\downarrow$ LDL-C: -17% $\downarrow$ TG: -18% $\downarrow$ ApoB: -14% HDL-C, ApoA-1 invariati	Sanchez-Bayle M et al., Clin Ped 2001
Glucomannano + policosanoli o cROMO polnicotinato	DB-RCT	n. 132 bambini Età: 3-16 anni Criteri di inclusione: TC $\geq$ 170 mg/dL, 1 genitore con CT $\geq$ 240 mg/dL o familiarità per CVD nella prima o seconda generazione	Valutazione degli effetti di glucomannano in combinazione con CP o PC	1. Gruppo controllo: amido 2. Gruppo GM+CP: GM 500 mg + CP 0.2 mg; 3. Gruppo CP: CP 0.2 mg + amido 500 mg; 4. Gruppo GM+PC: GM 500 mg + policosanoli 1.2 mg; 5. Gruppo PC: policosanoli 1.2 mg + amido 500 mg; 6. Gruppo GM: GM 500 mg + amido 500 mg Bambini $\leq$ 6 anni: 4cps/die Bambini $\geq$ 6 anni: 6cps/die Durata: 8 settimane	Nessuno	n. 12 drop-out	GM+CP: $\downarrow$ LDL-C: -16% HDL-C, TG invariati GM+PC: $\downarrow$ LDL-C: -10% HDL-C, TG invariati Gruppo PC: nessun effetto ipolipemizzante	Martino F et al., Atherosclerosis 2013

Legenda: ↑: aumento, ↓: diminuzione, HDL-C: Colesterolo HDL, LDL-C: Colesterolo LDL, TG: trigliceridi, CT: colesterolo totale, ApoB: Apolipoproteina B, ApoA1: Apolipoproteina A1, CT: trial controllato, RCT: trial randomizzato controllato, DB: doppio cieco, SB: singolo cieco, CO: crossover, FH: ipercolesterolemia familiare (riferito a eterozigote), IperCT: ipercolesterolemia, FCH: iperlipidemia familiare combinata, GM: Glucomannano, PC: Policosanoli, CP: cromo-polnicotinato,;

che il consumo di fibra alimentare è inversamente correlato a CT, sovrappeso e obesità, confermando i dati ottenuti dai trials condotti sugli adulti (17).

Efficacia e tollerabilità di Psyllium, Glucomannano, Avena e Gomma Guar sono stati esaminate in trial condotti in bambini e adolescenti dislipidemici principalmente negli anni '90. La riduzione dei livelli sierici di CT e LDL-C è variabile sino al 30% per entrambi i parametri, benché talora non vi sia stato alcun effetto (10, 18-26) (*Tabella 1*). I vari approcci prevedevano un regime alimentare controllato secondo i parametri CHILD I (assunzione giornaliera di grassi <30%, acidi grassi saturi ≤10%, colesterolo <300mg) o, più restrittivi, CHILD II (acidi grassi saturi 7%, colesterolo <200 mg), e la supplementazione con fibra contenuta in alimenti arricchiti o in capsule (3).

L'efficacia dello Psyllium è stata dimostrata nella maggior parte degli studi (18, 23, 27, 28) tranne in uno (25). In un trial randomizzato controllato (RCT) della durata di 12 settimane, condotto su 50 bambini con ipercolesterolemia moderata e in terapia dietetica CHILD I, si è osservata la riduzione dell'8.9% dei livelli plasmatici di LDL-C con Psyllium (3.2g/die), rispetto al gruppo controllo in trattamento dietetico CHILD I (27). Una riduzione più significativa di CT (18%) e di LDL-C (23%) è stata dimostrata in 36 bambini con iperlipemia combinata familiare (FCH) dopo supplementazione della dieta CHILD I con Psyllium (2,5-10 g/die in relazione dell'età) (23).

L'associazione di un regime dietetico non troppo restrittivo, come il CHILD I, eventualmente associato a fibra è risultato di maggior successo riscontrando miglior *compliance* rispetto al regime dietetico STEP II (29). Nel 2010, l'European Food Safety Authority (EFSA) ha approvato "l'Health Claim" relativo all'assunzione di Konjac Glucomannano, verificato che il

suo apporto ridurrebbe CT oltre a peso corporeo e glicemia postprandiale (30).

Il Glucomannano è stato testato con successo su 36 bambini affetti da ipercolesterolemia familiare (FH) per 24 settimane, in uno studio controllato con placebo, in doppio cieco e crossover. Prima dell'integrazione con Glucomannano (1-1.5 g/die in funzione del peso del probando) questa coorte ha seguito per un mese la dieta CHILD I. In seguito a tale trattamento i livelli plasmatici di CT, LDL-C e non-HDL-C hanno subito un decremento statisticamente significativo del 5,1%, 7,3% e del 7,2%, rispettivamente (31). Questi risultati sono stati più marcati nelle femmine, mentre nei maschi solo il non-HDL colesterolo è diminuito significativamente, in accordo con risultati precedenti (20). L'efficacia del Glucomannano è stata oggetto di due metanalisi: nella prima, indirizzata a 531 bambini obesi, gli autori non riferiscono variazione significativa di LDL-C, bensì della trigliceridemia (32). La seconda ha stimato una riduzione di LDL-C simile in adulti e bambini e non ha rilevato eventuali influenze di dose, durata del follow-up, valori basali di CT o della formulazione di somministrazione del Glucomannano sui livelli sierici di LDL-C (33).

Pochi studi hanno indagato l'effetto della Crusca d'Avena sul profilo lipidico e attualmente non ci sono raccomandazioni relative all'assunzione di Crusca d'Avena come integratore alimentare nell'età pediatrica (6). Altri studi hanno valutato l'efficacia dell'integrazione con farina di Semi di Carrube: in particolare, uno studio RCT cross-over, della durata di 16 settimane, che ha incluso 11 bambini FCH, 10 controlli e 17 adulti, ha osservato come l'assunzione di 8-30 g/die di farina di Semi di Carrube riduce dell'11%-19% di LDL-C (10).

Un marker di rischio cardiovascolare è l'Apolipoproteina B (ApoB), la cui valutazione è importante soprattutto nei soggetti che, nonostante valori normali o lievemente

te incrementati di LDL-C, mostrano un elevato rischio cardiovascolare (33). I risultati disponibili dimostrano che i livelli di ApoB non sono influenzati dall'integrazione di Glucomannano (31), dato confermato in una recente metanalisi che ha esaminato 12 studi clinici e coinvolto 370 soggetti, inclusa la popolazione pediatrica, valutando il rapporto ApoB/non-HDL-C e Glucomannano (33). Unico studio a favore del miglioramento di ApoB riguarda la Crusca di Avena (38 g/die, durata 4 settimane) utile nel ridurre ApoB ( $p=0.05$ ) in 49 bambini ipercolesterolemici rispetto al gruppo controllo, tuttavia senza alcuna variazione nei valori del profilo lipidico (21).

#### *Eventi avversi*

Per quanto riguarda gli effetti avversi derivanti dalla supplementazione di Fibra i sintomi più frequentemente segnalati sono diarrea e dolori addominali. Durante le sperimentazioni con Psyllium e Glucomannano la maggior parte dei bambini ha mostrato una buona *compliance* dovuta all'elevata palatabilità dell'integratore e solo occasionalmente sono stati segnalati disturbi gastrointestinali (28, 31) o allergie correlate a Psyllium (18); nonostante ciò i dati relativi alla sicurezza per lunghi periodi di assunzione sono tuttora limitati. La supplementazione con Glucomannano non riduce l'assorbimento di oligoelementi quali ferro, calcio, rame e zinco, fondamentali per la crescita.

Gli studi considerati mostrano effetti differenti, probabilmente legati all'entità dell'intervento dietetico, al disegno dello studio e al metodo di randomizzazione, nonché alle analisi di laboratorio e soprattutto al numero di soggetti reclutati. La riduzione di LDL-C può variare dal 7% al 10% in funzione della fibra assunta, in particolare di solubilità e viscosità (32). Ogni grammo di Glucomannano riduce LDL-C di circa 0,12 mmol/L (33), più del doppio

rispetto ai  $\beta$ -Glucani di Avena e Orzo (34), suggerendo che quantità inferiori di Glucomannano rispetto a  $\beta$ -Glucani di Avena e Orzo possono produrre lo stesso risultato.

In conclusione, l'assunzione di fibra deve principalmente derivare da un corretto apporto di frutta e verdura tuttavia in caso di persistenza di livelli elevati di CT ed LDL-C la supplementazione con fibra solubile può comunque migliorare il profilo lipidico, senza rilevanti eventi avversi sulla salute.

#### **Fitosteroli/Fitostanoli**

Steroli e stanoli sono composti bioattivi presenti nelle membrane cellulari delle piante. Non essendo sintetizzabili dall'uomo, possono essere introdotti solo attraverso alimenti, quali legumi, frutta fresca e secca, verdura, olio, semi e cereali, in differente quantità (200-400 mg/die). La struttura policiclica è simile a quella del colesterolo, ma diverso il loro metabolismo: l'assorbimento del colesterolo varia dal 20% all'80%, quello degli steroli dallo 0,4% al 5%, e quello degli stanoli dallo 0,02% allo 0,3%, per cui i valori ematici dei fitosteroli sono ridotti rispetto a quelli del colesterolo.

Dal 2001 le linee guida NCEP hanno incluso alimenti arricchiti in steroli vegetali quale strategia alimentare per ridurre i livelli di LDL-C. I fitosteroli competono con colesterolo e bile nella formazione di micelle miste e, a livello degli enterociti, nel legame con la proteina di trasporto Niemann-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1). Tale condizione è favorita dalle proprietà idrofobiche dei fitosteroli, maggiori rispetto a quelle del colesterolo. La presenza di fitosteroli nel lume intestinale aumenta l'espressione di NPC1L1 e inattiva l'acil-CoA-colesterolo-aciltransferasi, limitando l'ingresso del colesterolo nel circolo linfatico e il suo trasporto verso il fegato. La competizione tra fitosteroli e colesterolo riduce l'assorbimento del

colesterolo mentre i fitosteroli, presenti negli enterociti, vengono rapidamente escreti nel lume intestinale ad opera della proteina di trasporto ABCG5/ABCG8. Questo processo ha un duplice effetto: mantiene le concentrazioni plasmatiche di fitosteroli a livelli molto bassi e rende nuovamente disponibili queste molecole nell'intestino per competere con il colesterolo. Circa il 50% del colesterolo, ma meno del 5% degli steroli vegetali, viene assorbito (35). La diminuzione dell'ingresso del colesterolo intestinale e del trasporto di chilomicroni al fegato riduce i livelli di lipoproteine a densità intermedia oltre che LDL-C (36).

Steroli e Stanoli sono disponibili in commercio addizionati a pane, cereali, condimenti per l'insalata, margarina, latte

o yogurt aromatizzati, aumentandone così la palatabilità. Il latte rappresenta la miglior matrice alimentare per la somministrazione di fitosteroli anche perché due tazze assicurano a bambini e adolescenti rispettivamente il 150% e il 60% dei fabbisogni di calcio. Sebbene gli Stanoli siano superiori nel ridurre i livelli di colesterolo rispetto agli Steroli, la maggior parte degli studi ha utilizzato Steroli a dosi variabili (1,6-2 g/die).

#### Evidenze scientifiche

I dati sull'utilizzo di fitosteroli nella popolazione pediatrica sono scarsi, a differenza dei numerosi studi condotti sugli adulti ma le pur limitate evidenze dimostrano che l'assunzione di steroli vegetali riduce i li-

**Tabella 2 - Caratteristiche degli studi randomizzati e controllati riguardanti l'utilizzo di fitosteroli/stanoli in soggetti pediatrici dislipidemici**

Tipo di studio	Casistica	Scopo dello studio	Dose e durata dell'intervento	Eventi avversi	Aderenza	Effetti	Ref.
DB-CO-RCT	n. 30 Bambini Età: 6-9 anni  Criteri di inclusione: TC ≥170 mg/dL, LDL-C ≥110 mg/dL	Valutazione effetti ipolipemizzanti di steroli vegetali	Gruppo intervento: latte +1.2 g/die di steroli vegetali.  Gruppo controllo: latte scremato  Durata: 8 settimane	Nausea 1 caso	n. 5 drop-out	Gruppo di intervento: ↓ TC: -4.5% ↓ LDL-C: -11.1%  Gruppo controllo: ↓ TC: 5.9% ↓ LDL-C: -10.2%	Ribas SA et al., NMCD 2017
CT	n. 64 bambini n. 25 LDL-C ≥130 mg/dl n. 34 LDL-C ≤130 mg/dl Età: 4.5-15.9 anni	Effetti di steroli vegetali sui livelli di sdLDL-C	Dieta CHILD II Intervento: yogurt (2 g/die steroli vegetali)  Durata: 6-12 mesi	Nessuno	n. 5 drop-out	Gruppo di intervento: ↓ sdLDL-C: -16.6% ↓ LDL-C: -13% HDL-C, TG, Lp(a) invariati	Garoufi A et al., IJP 2014
RCT	n. 52 bambini n. 32 FH n. 13 FCH n. 13 iperCT lieve Età: 8-16 anni  Criteri di inclusione: CT e TG ≥90° percentile per sesso ed età	Efficacia e tollerabilità della supplementazione con steroli	Yogurt addizionati con steroli vegetali (100 ml, 1.6-2.0 g/die di steroli)  Durata 12 settimane	disturbo gastro-intestinale 1 caso	n. 6 drop-out	Riduzione di LDL-C: FH 10,7%; FCH 14,2%; iperCT lieve 16%  Riduzione di CT e ApoB Livelli invariati di TG, HDL-C e ApoA1 Latosterolo invariato Sitosterolo aumentato	Guardamagna O et al., Acta Diabetol 2011
DB-RCT	n. 42 bambini Età: 7-12 anni  Criteri di inclusione: FH	Effetto ipolipemizzante degli stanoli e della funzionalità endoteliale	500 ml di yogurt magro +2.0 g stanoli oppure 500 ml yogurt magro (placebo)  Durata: 4 settimane	Nessuno	n. 1 drop-out	↓ TC: -7.5% ↓ LDL-C: -9.2% HDL-C e TG invariati FMD invariato	Jakulj L et al., J Pediatr 2006

&gt;&gt;&gt;

CO-RCT	n. 37 bambini Età: 7-13 anni Criteri di inclusione: FH "definita" o "possibile"	Effetti di Stanoli su valori plasmatici di lipidi, steroli e carotenoidi	dieta ipolipidica 1.2 g stanoli Durata 26 settimane	Nessuno	Buona compliance	↓ TC: 9.1% ↓ LDL-C: 11.4% ↑ latosterolo sierico 31, ↑ campesterolo 96 ↑ sitostanolo: 48% ↓ α-carotene 17.4% ↓ β-carotene: 10.9%	Amundsen AL et al., Eur J Clin Nutr 2004
DB-CO-RCT	TOT: n. 38 bambini Età: 7-12 anni Criteri di inclusione: diagnosi "definita" o "possibile" di FH	Effetti di Stanoli sul profilo lipidico, carotenoidi, vitamine liposolubili	Dieta CHILD I + 1.6 g stanoli o placebo Durata: 8 settimane	Nessuno	Compliance 90.9% nel gruppo controllo e 91.7% nel gruppo di intervento	↓ LDL-C 10.2% ↓ TC and ApoB 7.4% HDL-C, TG and ApoA invariati ↓ Licopene sierico 8.1% ↑ Retinolo 15.6% ↑ α-tocoferolo 7.1%	Amundsen AL et al., Am J Clin Nutr 2002
DB-placebo-Co-RCT	n. 81 bambini Età: 6 anni Criteri di inclusione: reclutati dallo studio STRIP, popolazione generale	Effetto dell'assunzione di stanoli sulla sintesi e assorbimento di colesterolo nei diversi sessi e sul fenotipo ApoE	Intervento: margarina addizionata con stanoli (20 g/die) o placebo. Durata: 3 mesi wash-out: 6 settimane	Nessuno	Buona compliance	Gruppo stanoli Ragazzi: ↓ TC -6% ↓ LDL-C -9% Ragazze: ↓ TC -4% ↓ LDL-C -6% Nessuna differenza correlata al fenotipo apoE4	Tammi A et al., Acta Paediatr 2002
DB-placebo-Co-RCT	n. 61 Età: 5-12 anni Criteri di inclusione: FH	Effetti di steroli sul profilo lipidico e sulla funzione vascolare	Dieta CHILD I Intervento: 15 g steroli vegetali (2.3 g) o 15 g placebo Durata: 4 settimane	Nessuno	Buona compliance	↓ TC 11% ↓ LDL-C 14% FMD invariata	de Jongh S et al., J Inherit Metab Dis 2003
DB-CO-RCT	n. 23 bambini Età: 2-9 anni Criteri di inclusione: TC $\geq$ 194 mg/dL, TG $\leq$ 176 mg/dL	Effetto della sommministrazione di steroli o stanoli sul rapporto steroli non colesterolo/ colesterolo in lipidi sierici e RBC	2.0 g/die stanoli 2.0 g/ steroli Durata: 5 settimane wash-out 5 settimane	Nessuno	Buona compliance	Stanoli: ↓ TC - 9% ↓ LDL-C -12% Steroli: ↓ TC -6% ↓ LDL-C -9% HDL-C e TG invariati GR nessun effetto	Ketomaki AM et al. J Pediatr 2003
DB-RCT	n. 15 bambini Età: 2-15 anni Criteri di inclusione: FH	Effetti ipolipemizzanti e variazioni steroli sierici dopo assunzione di stanoli	dieta ipolipidica + 24 g di margarina con o senza Stanoli ( $2.76 \pm 0.15$ g/die) Durata: 6 settimane	Nessuno	Buona compliance	↓ TC -10.6% ↓ IDL -25.9% ↓ LDL-C -15% ↑ HDL/LDL +27% ↑ Δ-colestano 9%, ↑ Δ-latosterolo 42% ↑ Δ-desmosterolo 29%	Gylling H et al., J Lipid Res 1995

Legenda: ↑: aumento, ↓: diminuzione, HDL-C: Colesterolo HDL, LDL-C: Colesterolo LDL, TG: trigliceridi, CT: colesterolo totale, ApoB: Apolipoproteina B, ApoA1: Apolipoproteina A1, IDL: lipoproteina a densità intermedia, sLDL-C: LDL-C piccole e dense, CT: trial controllato, RCT: trial randomizzato controllato, DB: doppio cieco, SB: singolo cieco, CO: crossover, FH: ipercolesterolemia familiare (riferito a eterozigote), IperCT: ipercolesterolemia, FCH: iperlipidemia familiare combinata; FMD: vasodilatazione flusso-mediatia

velli di CT in bambini con ipercolesterolemia lieve (37) ed in bambini FH (36, 38-40) mentre risulta inefficace sulle concentrazioni di TG e di HDL-C (41) (*Tabella 2*).

Il trattamento con Steroli (1,2-2,0 g/die, durata 2-12 mesi), in bambini FH già sottoposti a dieta CHILD I o CHILD II riduce i livelli di LDL-C di circa 10% (38-40) e l'incremento della dose a 2,3 g/die favorisce un calo ulteriore di LDL-C (14%). Risultati analoghi si sono ottenuti con la somministrazione di margarina addizionata con Stanoli (1,6 g/die, durata 5-6 settimane) e migliorati dall'incremento a 3 g/die di Stanoli (36). In seguito a supplementazione con fitosteroli è stato osservato il calo di ApoB (7-10%) (38-39). L'efficacia degli steroli vegetali in bambini non FH con lieve ipercolesterolemia (valori medi TC  $\geq$  197 mg/dl e LDL  $\geq$  125 mg/dl; 1,2 g/die in due dosi), anche in regime alimentare CHILD II, è stata confermata dalla riduzione di CT (7-11%) e di LDL-C (9-14%) (37), dato confermato dallo studio STRIP. Quest'ultimo, condotto su bambini di 6 anni con profilo lipidico lievemente aumentato, ha riscontrato un abbassamento dei valori sierici di LDL-C e CT rispettivamente del 5.4% e del 7.5% in seguito a supplementazione con fitosteroli. Contrariamente a quanto descritto, in due studi della durata di 8 e 52 settimane la supplementazione con steroli vegetali non ha migliorato il profilo lipidico. La variabilità dei risultati potrebbe essere correlata alla differente matrice alimentare addizionata, alla frequenza e al dosaggio assunto giornalmente (42). Il calo dei valori sierici di CT e LDL-C in seguito ad assunzione di steroli/stanoli sembrerebbe essere indipendente dai valori basali, simile negli adulti e nei bambini e di entità massima dopo due settimane di supplementazione. Un beneficio aggiuntivo, derivante dall'assunzione di 2g/die di steroli vegetali in bambini e adolescenti con dislipidemia, è dato dal calo significativo delle LDL piccole

e dense (sdLDL-C), lipoproteine che caratterizzano il fenotipo B associato a sindrome metabolica e indice di rischio cardiovascolare (39). Lo studio della funzione endoteliale, marker surrogato di rischio cardiovascolare, esaminata mediante vasodilatazione flusso-mediata, non ha dato esito favorevole.

### *Eventi avversi*

La somministrazione di fitosteroli/stanoli nella popolazione pediatrica è ben tollerata e non sono stati segnalati eventi avversi nel breve e medio termine (38). Considerazioni riguardano le possibili variazioni riguardanti carotenoidi e vitamine liposolubili: la riduzione di licopene (8.1%, p=0.015),  $\alpha$ - (17.4%, p=0.008) e  $\beta$ -carotene (10.9%, p=0.018) rilevate nel breve periodo non sono state confermate dopo 6 mesi di trattamento con stanoli (1.2 g/die) (43). Lo studio STRIP ha dimostrato che la somministrazione di 1.5g di fitostanoli in bambini con lieve ipercolesterolemia ha determinato la riduzione del rapporto sierico  $\beta$ -carotene/LDL-C (19%, p=0.003) mentre è rimasto invariato il rapporto  $\alpha$ -tocoferolo/LDL-C. Infine, dato l'esiguo numero di studi effettuati sull'assorbimento delle vitamine liposolubili si ritiene utile aumentare il consumo di frutta e verdura per evitare la carenza di carotenoidi.

La sicurezza a lungo termine del trattamento con fitosteroli, al contrario, è stata messa in discussione in quanto i livelli di steroli vegetali aumentano l'incidenza di aterosclerosi e, come dimostrato negli studi PROCAM (44) e MONICA/KORA (45) correlano positivamente con la prevalenza di eventi cardiovascolari. I livelli ematici di campesterolo e di sitosterolo, indici di assorbimento degli steroli, aumentano dopo supplementazione con fitosteroli, tuttavia non eccedono l'1% degli steroli sierici totali e sono inferiori in percentuale dell'8% rispetto a quelli osservati in soggetti affetti dalla forma omozigote di sitosterolemia (43).

Dati contrastanti riguardano la sintesi epatica di latosterolo, i cui livelli sierici non variano dopo 12 settimane di somministrazione di fitosteroli (40) sebbene sia stato segnalato un incremento del 259% dopo sei mesi di follow-up (43). Ne consegue pertanto che, dati i dubbi riguardanti l'omeostasi degli steroli vegetali, è utile verificare gli effetti di trial nel lungo periodo (46).

### Altri nutraceutici

L'efficacia di sostanze nutraceutiche quali riso rosso fermentato (RYR), probiotici, acidi grassi polinsaturi a lunga catena (PUFA) Omega-3 e Omega-6 e proteine della soia, è stata testata in bambini dislipidemici risultando un'opzione possibile per migliorare il profilo lipidico (*Tabella 3*).

### Riso rosso fermentato

Il RYR, ottenuto dalla fermentazione del riso, è stato largamente impiegato per

molti secoli in Cina come additivo per aromatizzare gli alimenti. Il preparato nutraceutico si ottiene dall'attività fermentativa del lievito *Monascus purpureus* Went ed è disponibile in commercio in capsula. RYR contiene la Monacolina K, molecola bioattiva con effetto simile alla lovastatina in quanto inibisce l'attività enzimatica del 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA reduttasi, dunque della sintesi del colesterolo. L'effetto ipolipemizzante della Monacolina K è stato ampiamente dimostrato negli adulti e recenti metanalisi ne confermano la sicurezza e anche in soggetti intolleranti alle statine (47).

L'unico studio condotto sulla popolazione pediatrica riguarda soggetti FH e FCH ad elevato rischio cardiovascolare in regime dietetico CHILD II. Durante il trial non si sono manifestati eventi avversi e al termine delle otto settimane di trattamento si è osservata una diminuzione statisticamente significativa di CT, LDL-C e ApoB rispetti-

**Tabella 3 - Caratteristiche degli studi randomizzati e controllati riguardanti l'utilizzo di nutraceutici in soggetti pediatrici dislipidemici.**

Nutraceutico	Tipo di studio	Casiistica	Scopo dello studio	Dose e durata dell'intervento	Eventi avversi	Aderenza	Effetti	Ref.
Riso rosso fermentato + policosanol	DB- CO-RCT	n. 80 bambini Età: 8-16 anni FH: n. 24 FCH: n. 16 IperCT moderata: n. 40	Valutazione efficacia sul profilo lipidico, tollerabilità e sicurezza della supplementazione di riso rosso fermentato + policosanol	Dieta CHILD I Riso Rosso fermentato 200 mg/die (monacolina 3 mg) + policosanol 10 mg/ placebo Durata: 8 settimane Wash-out: 4 settimane	Gruppo Attivo: n. 3 casi cefalea, diarrea, dispesia ↑ modesto di CPK n. 2 casi Placebo: sintomi influenzali n. 2 casi	Buona compliance	↓CT: 18.5% ↓LDL-C: 25.1% ↓ ApoB: 25.3% HDL-C, ApoA1 invariate	Guardamagna O et al., NMCD 2011
Probiotici	DB- CO-RCT	n. 38 bambini IperCT Età: 6.3-15.1 anni Criteri di inclusione: TC ≥90° percentile per sesso ed età	Efficacia sul profilo lipidico e tollerabilità di probiotici contenenti 3 ceppi <i>Bifidobacterium</i>	Dieta CHILD I 1cps/die di probiotici (1x109 cfu) o placebo Wash-out: 4 settimane Probiotici: <i>B. animalis</i> subspecie <i>lactis</i> , <i>B. bifidum</i> e <i>B. longum</i> subspecie <i>longum</i> in formula liofilizzata Durata totale: 32 settimane	Dolori addominali n. 3 casi	89% probiotici 91% placebo n. 2 drop-out	↓CT: 3.4% ↓LDL-C: -3.8% ↓TG: 1.9% ↑HDL-C: 1.7%	Guardamagna O et al., Nutrition 2014

&gt;&gt;&gt;

Proteine della soia	RCT	n. 23 bambini Età: 4-18 anni Criteri di inclusione: FH	Valutazione dell'effetto sulle lipoproteine di un'integrazione con proteine della soia	Fase 1: dieta Durata: 3 mesi Fase 2: dieta + proteine della soia 0-25 g/kg in sostituzione a proteine animali. Durata: 3 mesi	Nessuno	allergia proteine soia n. 2 casi n. 7 drop-out	Fase1: ↓ CT: -12.3% ↓ LDL-C: -11.8% ↓ ApoB: -10.6% Fase2: ↓ CT: -7.7% ↓ LDL-C: -6.4% ↓ ApoB: -12.6% HDL-C, ApoA1 e Lp(a) invariati in Fase 1 e 2	Weghuber D et al., Br J Nutr, 2008
	CO-RCT	n. 23 bambini Età media: 9.3±4.5 anni Criteri di inclusione: FH o ipercolesterolemia poligenica	Valutazione dell'efficacia sul profilo lipidico di una dieta ipolipemizzante addizionata o meno a proteine della soia	Gruppo 1: dieta ipolipidica, a basso contenuto di colesterolo contenente proteine della soia; Gruppo 2 dieta ipolipidica, a basso contenuto di colesterolo Durata: 8 settimane Wash-out: 8 settimane	Nessuno	Non indicata	Proteine della soia: Gruppo 1 e 2: ↓ CT: 16-18% ↓ LDL-C: 22-25% Dieta Gruppo 1 e 2 ↓ CT: 8-12% ↓ LDL-C: 7-13%	Widhalm K et al., J Pediatrics, 1993
	CO-RCT	n. 10 bambini Età 6-12 anni Criteri di inclusione: FH	Effetti dell'assunzione di proteine della soia e proteine della soia addizionate a latte vaccino sul profilo lipoproteico	Dieta preliminare Gruppo 1: proteine della soia Gruppo 2: proteine della soia addizionate a latte vaccino Durata: 4 settimane	Nessuno	Non indicata	Nessuna variazione di CT, LDL-C, ↓ TG and ↓ VLDL-C ↑ HDL-C	Laurin D. et al., Am J Clin Nutr 1991
Pufa	RCT	n. 36 bambini Età: 6-16 anni Criteri di inclusione: iperlipemia primitiva + compliance alle indicazioni alimentari	Efetti dell'olio di canapa sulla composizione in FAs dei fosfolipidi di membrana di GR e sul profilo lipidico	Dieta CHILD I in gruppo placebo e intervento Olio di canapa: 3 g/die (1.4 g of LA and 0.7 g/die of ALA) Durata: 8 settimane	Nessuno	Non indicata	↓ GR SFA: 5.02% ↓ GR MUFA: 2.12% ↑ PUFA n-3: 1.57% ↑ PUFAs n-6: 5.39% ↑ Omega 3 Index: 1.18% ↓ LDL-C nel gruppo intervento 14.2%, ↓ LDL-C nel gruppo controllo 4.94%	del Bo' C, Food Res Int. 2019

Nocciole	SB-RCT	n. 66 bambini Età m.: 11.6 anni Criteri inclusione: TC e/o TG ≥90° perc. sesso età	Effetto delle nocciole sul profilo lipidico, e composizione FAs dei fosfolipidi dei GR	Gruppo intervento: Dieta CHILD I + nocciole 15-20 g/die Gruppo controllo: Dieta CHILD I Durata: 8 settimane	Nessuno	n. 6 drop-out	↓ LDL-C: -6.5% ↑ HDL/LDL: +8% gruppo controllo invariato	Deon V et al., Clinical Nutrition, 2018
	SB-RCT	n. 66 bambini Età m.: 11.6 anni Criteri inclusione: TC e/o TG ≥90° perc. sesso, età	Effetto delle nocciole sullo stress ossidativo	Dieta CHILD I + nocciole 15-20 g/die Gruppo controllo: Dieta CHILD I Durata: 8 settimane	Nessuno	n. 6 drop-out	↓ danno endogeno DNA con nocciole Nessuna variazione Ox-LDL	Guaraldi F et al., J Nutr Biochem, 2018
	SB-RCT	Età: 7-17 anni Criteri inclusione dislipidemia in Normopeso	Effetti delle nocciole sui livelli di SCFAs e microbiota intestinale	Intervento: nocciole (0.43 g/kg fino ad un massimo di 30 g) Durata: 8 settimane	Nessuno	Non indicata	Modulazione dei livelli intestinali di SCFAs. Variazioni limitate nella composizione del microbiota fecale	Gargari G et al., FEMS Microbiol Ecol, 2018

LEGENDA: ↑: aumento, ↓: diminuzione, HDL-C: Colesterolo HDL, LDL-C: Colesterolo LDL, TG: trigliceridi, CT: colesterolo totale, ApoB: Apolipoproteina B, ApoA1: Apolipoproteina A1, CT: trial controllato, RCT: trial randomizzato controllato, DB: doppio cieco, SB: singolo cieco, CO: crossover, FH: ipercolesterolemia familiare (riferito a eterozigote), IperCT: ipercolesterolemia, FCH: iperlipidemia familiare combinata, FAs: Acidi grassi, LA: acido linoleico, ALA: acido α-linolenico, GR: globuli rossi, SFAs: acidi grassi saturi; MUFA: acidi grassi monoinsaturi; PUFA: acidi grassi polinsaturi

vamente del -18,5%, -25,1% e -25,3%, mentre HDL-C è rimasto invariato. I risultati sono stati interessanti per *compliance*, tollerabilità ed efficacia e, sorprendentemente, la dose giornaliera somministrata di Monacolina K (3 mg) ha dato un risultato paragonabile a quello di pravastatina 10 mg/die, suggerendo un possibile effetto sinergico di composti bioattivi presenti nell'estratto naturale (48). Va tuttavia sottolineato che trattandosi di un prodotto chimicamente analogo alla lovastatina, ne presenta anche i potenziali effetti avversi e richiede pertanto il monitoraggio clinico e biochimico applicabile alle statine per evitare complicatezze già note in letteratura. Importante è inoltre la qualità di questo integratore che deve essere privo di citrina, micotossina nefrotossica, genotossica e cancerogena prodotta da *Monascus purpureus* Went.

In conclusione, RYR rappresenta una possibile alternativa terapeutica in bambini ipercolesterolemici ad elevato rischio cardiovascolare in ottemperanza alle linee Guida indicate per il trattamento con statine e sotto controllo medico.

### Probiotici

La FAO e l'OMS definiscono i probiotici come "microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite". L'effetto ipolipemizzante, dato dall'inibizione dell'assorbimento intestinale di colesterolo, opera dei batteri lattici, e dell'idrolisi dei sali biliari con conseguente riduzione di LDL-C e ApoB è stato ampiamente dimostrato. Inoltre alcuni ceppi di *Bifidobacterium* migliorerebbero il profilo lipidico trasformando l'acido

linoleico (LA) in acido linoleico coniugato. L'assunzione di differenti ceppi batterici probiotici in adulti ipercolesterolemici sani ha mostrato una riduzione di CT, LDL-C e ApoB, quando somministrati come yogurt arricchiti con *Lactobacillus acidofilus*, *L. casei*, *L. reuteri* e *Bifidobacterium longum*. Due metanalisi, condotte su adulti ipercolesterolemici, hanno confermato i benefici derivanti da somministrazione di *Lactobacillus acidofilus* (yogurt/capsule) su CT, LDL-C e sui marcatori di infiammazione. Nella popolazione pediatrica (CT  $\geq 90^{\circ}$  percentile per sesso ed età) è stato condotto uno studio cross-over, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo. La somministrazione di una miscela di tre ceppi selezionati di *Bifidobacterium* ha evidenziato un miglioramento del profilo lipidico: TC: -3,4%; LDL-C: -3,8%, TG: -1,9% e HDL-C: -1,7% (49). *Compliance* e la tollerabilità sono state buone e per quanto riguarda la sicurezza le specie *B. animalis*, *B. bifidum* e *B. breve* sono attualmente incluse nell'elenco QPS dell'European Food Safety Authority (EFSA).

### Acidi grassi poliunsaturi

La qualità dei grassi alimentari influisce sulle concentrazioni sieriche del profilo lipoproteico e gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA), in particolare le serie Omega-3 e Omega-6, modulano i marker di rischio cardiovascolare quali TG, LDL-C, molecole infiammatorie e di adesione cellulare. Poiché l'assunzione alimentare di PUFA è spesso insufficiente nei bambini, la somministrazione giornaliera di latte addizionato con PUFA e a basso contenuto di acidi grassi saturi a 107 bambini sani ha ridotto le concentrazioni E-selectina e ICAM-1, marcatori di adesione cellulare e di attivazione endoteliale. L'olio di canapa (HSO) poiché ricco di acidi grassi essenziali della serie Omega-3 e Omega-6, rispettivamente acido  $\alpha$ -linolenico (ALA) e LA, in un

rapporto (1:2:1:3), è un integratore alimentare ottimale. HSO è stato testato su animali e adulti e in un recente RCT su 36 bambini iperlipemici cui sono stati somministrati 3 g/die di HSO. Lo studio ha dimostrato l'aumento del contenuto di PUFA n-3 e n-6 nella membrana cellulare dei globuli rossi e un miglioramento dell'indice di rischio cardiovascolare Omega-3. Si è osservata altresì una riduzione significativa dei livelli sierici medi di LDL-C (14%) nel gruppo trattato effetto non evidenziato nel gruppo controllo (50).

### Soia e derivati

Gli effetti delle proteine della soia e dei suoi derivati, ampiamente studiati, sono correlati al contenuto di isoflavoni, molecole che promuovono l'espressione dei recettori LDL a livello epatico e per questa ragione sono considerate potenzialmente utili in soggetti affetti da ipercolesterolemia. Negli adulti è stata dimostrata la riduzione di CT e LDL-C (4-6%) dopo il consumo di 25 g/die di proteine della soia ma ancora una volta gli studi pediatrici sono sporadici. La riduzione di CT, LDL-C e ApoB (7,7%, 6,4%, 12,6% rispettivamente) è stata dimostrata in 16 bambini FH, già in terapia dietetica CHILD I da tre mesi, in seguito a somministrazione di latte di soia (0,25-0,5 g/kg) (51), mentre la sostituzione di proteine della soia con quelle di latte vaccino non hanno dato esito favorevole a carico di CT e LDL-C bensì di TG (52).

### Frutta secca

La frutta secca è un gruppo alimentare costituito da mandorle, noci, nocciole, noci macadamia, pistacchi e arachidi.

Gli effetti cardioprotettivi e i benefici derivanti dall'assunzione di frutta secca a guscio sono stati ampiamente dimostrati in molti studi epidemiologici, in particolare gli effet-

ti associati alle nocciole, ricche in composti bioattivi come MUFA e PUFA, fitosteroli, antiossidanti, vitamine (es. tocoferoli), fibre e polifenoli, i quali, oltre ad avere proprietà antiossidanti, migliorerebbero il profilo lipidico interferendo sull'assorbimento intestinale di colesterolo e sulla sintesi di TG. In tre studi indirizzati a bambini iperlipidemici sono stati esaminati gli effetti delle nocciole sul profilo lipidico, sulle proprietà antiossidanti e sul microbioma: i risultati confermano l'efficacia di un consumo giornaliero (0,43 g/kg di peso corporeo); nella riduzione di LDL-C, aumento del rapporto HDL-C/LDL-C e del rapporto MUFA/SFA nelle membrane cellulari dei globuli rossi (53), la riduzione del danno ossidativo sul DNA (54) e la modulazione dell'ecosistema microbico intestinale (55).

### Considerazioni finali

Sebbene gli studi randomizzati e controllati sull'utilizzo di nutraceutici nei bambini siano scarsi, e per lo più condotti su casistiche ristrette, vanno sottolineati i benefici osservati nel breve e medio periodo in bambini dislipidemici riguardanti principalmente la supplementazione con Fitosteroli e Fibra, efficaci nel ridurre CT e LDL-C plasmatici. I Fitosteroli determinerebbero anche un miglioramento delle ApoB, mentre per la Fibra i risultati sono incerti.

Sia Fitosteroli che Fibra risultano ben tollerati, privi di effetti avversi significativi e la *compliance* è generalmente elevata. I sintomi più frequentemente riferiti in seguito ad assunzione di fibra sono dolori addominali e diarrea. La somministrazione di Fitosteroli può causare la riduzione dell'assorbimento intestinale di vitamine liposolubili, in particolare dei carotenoidi, in caso di integrazione prolungata.

In coerenza con i dati disponibili in letteratura le linee guida pediatriche supportano l'utilizzo dei fitosteroli in soggetti dislipidemici così come la European Atherosclerosis Society che ha stabilito nel 2014 che gli alimenti funzionali addizionati con steroli/stanoli vegetali dovrebbero essere considerati nella pratica clinica anche in bambini con FH (56).

In conclusione i nutraceutici ed in particolare Fitosteroli e Fibra possono essere considerati un complemento efficace della terapia dietetica. Importante è tuttavia sottolineare che una sostanza nutraceutica non deve mai essere considerata un'alternativa alla dieta, primo e fondamentale approccio alla dislipidemia, né a farmaci ipolipemizzanti, quando previsti dalle linee guida e che ogni intervento deve comunque essere proposto e monitorato dal curante.

Gli Autori dichiarano l'assenza di conflitti di interesse.

### RIASSUNTO

L'impiego di sostanze ad azione nutraceutica, siano esse presenti nel cibo o somministrate in altre formulazioni è sempre più diffuso nell'approccio terapeutico alla dislipidemia. La supplementazione della dieta quando questa sia insufficiente a migliorare il profilo lipidico e a raggiungere i risultati previsti, richiede attenzione nella scelta del nutraceutico ed un attento monitoraggio clinico utile a confermarne l'efficacia nonché ad escludere eventuali eventi avversi. L'età evolutiva richiede una particolare attenzione sia per la necessità di ottimizzare la prevenzione cardiovascolare, soprattutto nei soggetti a rischio cardiovascolare, che per le esigenze di crescita. La presente rassegna è la sintesi di studi controllati condotti su bambini e adolescenti iperlipemici e riguardanti i principali nutraceutici presenti in commercio quali Fitosteroli, Fibra, Riso Rosso fermentato, Probiotici, Acidi grassi polinsaturi serie Omega-3/6, Soia e derivati, frutta secca ed ha lo scopo di fornire un aggiornamento utile alla pratica clinica pediatrica.

**Parole chiave:** Nutraceutica, Dislipidemia, Bambini, Ipercolesterolemia, Fitosteroli, Fibra, Omega-3-6, PUFA, Monacolina K, Probiotici, Proteine della Soia, Frutta secca.

## Bibliografia

1. Guardamagna O, Baracco V, Abello F, et al. Identification and management of dyslipidemic children. *Minerva Pediatr.* 2009; 61, 391-398.
2. American Academy of Pediatrics Committee on nutrition. Cholesterol in childhood. *Pediatrics.* 1998; 101: 141-147.
3. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents, National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics.* 2011; 128(Suppl 5): S213e56.
4. Giacco R, Clemente G, Cipriano D, Luongo D, Viscovo D, Patti L, et al. Effects of the regular consumption of wholemeal wheat foods on cardiovascular risk factors in healthy people. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010; 20: 186-194.
5. European Food Safety Authority: Scientific opinion on dietary reference values for carbohydrates and dietary fiber. *EFSA J.* 2010; 8: 1462.
6. Jane M, McKay J, Pal S. Effects of daily consumption of psyllium, oat bran and polyGlyco-pX on obesity-related disease risk factors: A critical review. *Nutrition.* 2019; 57: 84-91.
7. Gunness P, Gidley MJ. Mechanisms underlying the cholesterol lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Function.* 2010; 1: 149-155.
8. Singh B. Psyllium as therapeutic and drug delivery agent. *Int J Pharm.* 2007; 334: 1-14.
9. Butt MS, Tahir-Nadeem M, Khan MKI, Shabir R, and Butt MS. Oat: unique among the cereals. *Eurn J Nutr.* 2008; 47: 68-97.
10. Zavoral J H, Hannan P, Fields D J, Hanson M N, Frantz I D, Kuba K, Elmer P, Jacobs D. R. The hypolipidemic effect of locust bean gum food products in familial hypercholesterolemic adults and children. *The American Journal of Clinical Nutrition.* August. 1983; 38: 285-294.
11. Gonzalez Canga A, Fernandez Martinez N, Sahagun AM, Garcia Vieitez JJ, Diez Liebana MJ, Calle Pardo AP, et al. Glucomannan: properties and therapeutic applications. *Nutr Hosp.* 2004; 19: 45-50.
12. Vuksan V, Jenkins AL, Rogovik AL, Fairgrieve CD, Jovanovski E, Leiter LA. Viscosity rather than quantity of dietary fibre predicts cholesterol-lowering effect in healthy individuals. *Br J Nutr.* 2011; 106: 1349-1352.
13. Ho HVT, Sievenpiper JL, Zurbau A, Mejia SB, Jovanovski E, Au-Yeung F, Jenkins AL, Vuksan V. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of the effect of barley b-glucan on LDL-C, non-HDL-C and apoB for cardiovascular disease risk reduction (i-iv). *Eur J Clin Nutr.* 2016; 70: 1239-1245.
14. Kranz S, Brauchla M, Slavin JL, Miller KB. What do we know about dietary fiber intake in children and health? The effects of fiber intake on constipation, obesity, and diabetes in children. *Adv Nutr.* 2012; 3: 47-53.
15. Daniels SR, Greer FR and the Committee on Nutrition. Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics.* 2008; 122: 198-208.
16. Institute of Medicine Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment. Washington, 2000, DC: National Academy Press. 306.
17. Shinozaki K, Okuda M, Sasaki S, Kunitsugu I, Shigeta M. Dietary fiber consumption decreases the risks of overweight and hypercholesterolemia in Japanese children. *Ann Nutr Metab.* 2015; 67: 58-64.
18. Davidson MH, Dugan LD, Burns JH, Sugimoto D, Story K, Drennan K. A psyllium-enriched cereal for the treatment of hypercholesterolemia in children: a controlled, double-blind, crossover study. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63: 96-102.
19. Sanchez-Bayle M, Gonzalez-Requejo A, Asensio-Anton J, Ruiz-Jarabo C, Fernandez-Ruiz ML, Baeza J. The effect of fiber supplementation on lipid profile in children with hypercholesterolemia. *Clin Pediatr (Phila).* 2001; 40: 291-294.
20. Martino F, Martino E, Morrone F, Carnevali E, Forcone R, Niglio T. Effect of dietary supplementation with glucomannan on plasma total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005; 15: 174-180.
21. Gold K, Wong N, Tong A, Bassin S, Iftner C, Nguyen T, et al. Serum apolipoprotein and lipid profile effects of an oat-bran-supplemented, low-fat diet in children with elevated serum cholesterol. *Ann NY Acad Sci.* 1991; 623: 429-431.
22. Williams CL, Bollella MC, Strobino BA, Boccia L, Campanaro L. Plant stanol ester and bran fiber in childhood: effects on lipids, stool weight and stool frequency in preschool children. *J Am Coll Nutr.* 1999; 18: 572-581.
23. Glassman M, Spark A, Berezin S, Schwartz S, Medow M, Newman LJ. Treatment of type IIa hyperlipidemia in childhood by a simplified American Heart Association diet and fiber supplementation. *Am J Dis Child.* 1990; 144: 193-197.
24. Taneja A, Bhat CM, Arora A, Kaur AP. Effect of incorporation of isabgol husk in a low fibre diet on faecal excretion and serum levels of lipids in adolescent girls. *Eur J Clin Nutr.* 1989; 43: 197-202.

25. Dennison BA, Levine DM. Randomized, double-blind, placebo-controlled, two-period cross-over clinical trial of psyllium fiber in children with hypercholesterolemia. *J Pediatr.* 1993; 123: 24-29.
26. Williams CL, Spark A, Haley N, Axelrad C, Strobino B. Effectiveness of a psyllium-enriched Step I diet in hypercholesterolemic children. *Circulation.* 1991; 84: II-6.
27. Williams CL, Bollella M, Spark A, Puder D. Soluble Fiber Enhances the Hypercholesterolemic Effect of the Step I Diet in Childhood. *Journal of the American College of Nutrition.* 1995; 3: 251-257.
28. Ribas SA, Cunha D.B., Sichieri R. and Santana da Silva L.C. Effects of psyllium on LDL-Cholesterol concentrations in Brazilian children and adolescents: a randomised, placebo-controlled, parallel clinical trial. *British Journal of Nutrition.* 2015; 113, 134-141.
29. The DISC Collaborative Research Group: The efficacy and safety of lowering dietary intake of total fat, saturated fat, and cholesterol in children with elevated LDL-C: the Dietary Intervention Study in Children (DISC). *JAMA.* 1995; 273: 1429-1435.
30. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to konjac mannan (glucomannan) and reduction of body weight (ID 854, 1556, 3725), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 1559), maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 835, 3724), maintenance of nor- mal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 3217), maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 3100, 3217), maintenance of normal bowel function (ID 834, 1557, 3901) and decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 1558) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* 2010; 8: 1798.
31. Guardamagna O, Abello F, Cagliero P, Vissioli F. Could dyslipidemic children benefit from glucomannan intake? *Nutrition.* 2013; 29: 1060-1065.
32. Sood N, Baker WL, Coleman CI. Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight, and blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88: 1167-1175.
33. Ho HVT, Jovanovski E, Zurbau A, Blanco Mejia S, Sievenpiper JL, Au-Yeung F, Jenkins AL, Duvenjak L, Leiter L, Vuksan V. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of the effect of konjac glucomannan, a viscous soluble fiber, on LDL cholesterol and the new lipid targets non-HDL cholesterol and apo-lipoprotein B. *Am J Clin Nutr.* 2017; 105: 1239-1247.
34. Ho HVT, Sievenpiper JL, Zurbau A, Mejia SB, Jovanovski E, Au-Yeung F, Jenkins AL, Vuksan V. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of the effect of barley b-glucan on LDL-C, non-HDL-C and apoB for cardiovascular disease risk reduction (i-iv). *Eur J Clin Nutr.* 2016; 70: 1239-1245.
35. Tammi A, Rönnemaa T, Gylling H, Rask-Nissilä L, Viikari J, Tuominen J, et al. Plant stanol ester margarine lowers serum total and low-density lipoprotein cholesterol concentrations of healthy children: the STRIP project. *J Pediatr.* 2000; 136: 503-510.
36. Gylling H, Siimes MA, Miettinen TA. Sitostanol ester margarine in dietary treatment of children with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 1995; 36: 1807-1812.
37. Ribas SA, Sichieri R, Moreira ASB, Souza DO, Cabral CTF, Gianinni DT, Cunha DB. Phytosterol-enriched milk lowers LDL-Cholesterol levels in Brazilian children and adolescents: Double-blind, cross-over trial. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases.* 2017; 27: 971-977.
38. Amundsen AL, Ose L, Nenseter MS, Ntanios FY. Plant sterol ester-enriched spread lowers plasma total and LDL cholesterol in children with familial hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 338-344.
39. Garoufi A, Vorre S, Soldatou A, Tsentidis C, Kossiva L, Drakatos A.s, Marmarinos and Gourgiotis A D. Plant sterols-enriched diet decreases small, dense LDL-Cholesterol levels in children with hypercholesterolemia: a prospective study. *Italian Journal of Pediatrics.* 2014, 40: 42.
40. Guardamagna O, Abello F, Baracco V, Federici G, Bertucci P, Mozzì A, Mannucci L, Gnasso A, Cortese C. Primary hyperlipidemias in children: effect of plant sterol supplementation on plasma lipids and markers of cholesterol synthesis and absorption. *Acta Diabetol.* 2011; 48: 127-133.
41. Demonty I, Ras RT, Van der Knaap HCM, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, et al. The effect of plant sterols on serum triglyceride concentrations is dependent on baseline concentrations: a pooled analysis of 12 randomised controlled trials. *Eur J Nutr.* 2013; 52: 153e60.
42. AbuMweis SS, Barake R, Jones PJH. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res.* 2008; 52:1-17.
43. Amundsen ÅL, F Ntanios, N van der Put, L Ose. Long-term compliance and changes in plasma lipids, plant sterols and carotenoids in children

- and parents with FH consuming plant sterol ester-enriched spread. European Journal of Clinical Nutrition. 2004; 58: 1612-1620. doi:10.1038/sj.ejcn.1602015.
44. Assmann G, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F, Schulte H. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PRO-CAM) study. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006; 16: 13e21.
  45. Thiery J, Ceglarek U, Fiedler GM, Leichtle A, Baumann S, Teupser D, Lang O, Baumert J, Meisinger M, Loewell H, Doering A. Elevated campesterol serum levels—a significant predictor of incident myocardial infarction: results of the population-based MONICA/KORA follow-up study 1994-2005. Circulation. 2006; 114: II-884.
  46. Ketomäki A M, Gylling H, Antikainen M, Siimes M A, Miettinen T A. Red cell and plasma plant sterols are related during consumption of plant stanol and sterol ester spreads in children with hypercholesterolemia. The Journal of Pediatrics. 2003; 142: 524-531.
  47. Pirro M, Vetrani C, Bianchi C, Mannarino MR, Bernini F, Rivelles AA. Joint position statement on "Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia" of the Italian Society of Diabetology (SID) and of the Italian Society for the Study of Arteriosclerosis (SISA). Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 2017; 27: 2-17.
  48. Guardamagna O., Abello, F. Baracco, V. Stasiowska, B. and Martino, F. The treatment of hypercholesterolemic children: Efficacy and safety of a combination of red yeast rice extract and policosanol. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 2011; 21: 424-429.
  49. Guardamagna O, Amaretti A, Puddu PE, Raimondi S, Abello F, Cagliero P, Rossi M. Bifidobacteria supplementation: effects on plasma lipid profiles in dyslipidemic children. Nutrition. 2014; 30: 831-836.
  50. De Bo' C, Deon V, Abello F, Massini G, Porrini M, Riso P, Guardamagna O. Eight-week hempseed oil intervention improves the fatty acid composition of erythrocyte phospholipids and the omega-3 index, but does not affect the lipid profile in children and adolescents with primary hyperlipidemia. Food Res Int. 2019; 119: 469-476.
  51. Weghuber D, Widhalm K. Effect of 3-month treatment of children and adolescents with familial and polygenic hypercholesterolaemia with a soya-substituted diet. Br J Nutr. 2008; 99: 281-286.
  52. Laurin D, Jacques H, Moorjani S, Steinke FH, Gagne C, Brun D & Lupien PJ. Effects of a soy-protein beverage on plasma lipoproteins in children with familial hypercholesterolemia. Am J Clin Nutr. 1991; 54: 98-103.
  53. Deon V, Del Bo' C, Guaraldi F, Abello F, Belviso S, Porrini M, Riso P, Guardamagna O. Effect of hazelnut on serum lipid profile and fatty acid composition of erythrocyte phospholipids in children and adolescents with primary hyperlipidemia: A randomized controlled trial. Clinical Nutrition. 2018; 37: 1193e1201.
  54. Guaraldi F, Deon V, Del Bo' C, Vendrame S, Porrini M, Riso P, Guardamagna O. Effect of short-term hazelnut consumption on DNA damage and oxidized LDL in children and adolescents with primary hyperlipidemia: a randomized controlled trial. Journal of Nutritional Biochemistry. 2018; 57: 206-211.
  55. Gargari G, Deon V, Taverniti V, Gardana C, Denina M, Riso P, Guardamagna O and Guglielmetti S. Evidence of dysbiosis in the intestinal microbial ecosystem of children and adolescents with primary hyperlipidemia and the potential role of regular hazelnut intake. FEMS Microbiology Ecology. 2018; 94 fiy045.
  56. Gylling H, Plat J, Turley S, Ginsberg HN, Ellegård L, Jessup W, Jones PJ, Lütjohann D, Maez W, Masana L, Silbernagel G, Staels B, Borén J, Catapano AL, De Backer G, Deanfield J, Descomps OS, Kovanen PT, Riccardi G, Tokgözoglu L, Chapman MJ; European Atherosclerosis Society Consensus Panel on Phytosterols. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. Atherosclerosis. 2014; 232: 346-360.

**FARMACI**

# EFFETTI COLLATERALI INCONSUETI O DUBBI DELLA TERAPIA CON STATINE

## Unusual or doubtful adverse effects of HMG-CoA reductase inhibitors

**DANIELA TORTOLA<sup>1</sup>, ANGELA COLANGIULO<sup>1</sup>, GIOVANNI B. VIGNA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara;

<sup>2</sup>Dipartimento Medico, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara

**SUMMARY**

HMG-CoA reductase inhibitors, also known as ‘statins’, represent one of the most commonly prescribed medications in the world; they proved to reduce cardiovascular disease-related morbidity and mortality. Despite their benefit, statin therapy is often discontinued due to possible adverse drug reactions (ADR), and this may associate with an increased risk of cardiovascular events. The most commonly reported ADR are muscle symptoms, elevated liver function tests and gastrointestinal discomfort. Allergic reactions, cognitive disorders, and other symptoms or signs concerning different organs or systems may be similarly important even if overlooked or neglected. Purpose of this review is to resume current data evaluating the scientific background linking ADR to statin therapy, with major focus on the less common or unappreciated ones.

**Keywords:** *HMG-CoA reductase inhibitors, adverse drug effects, atherosclerosis.*

**Introduzione**

Gli inhibitori dell’enzima HMG-CoA reductasi, più noti come statine, sono farmaci che hanno rivoluzionato il trattamento dell’ipercolesterolemia, riducendo incidenza e mortalità correlate all’aterosclerosi (1). Rappresentano una delle categorie

farmacologiche più prescritte nel mondo, e sono assunti attualmente da circa il 20-25% della popolazione di età superiore a 40 anni (2). Spesso, tuttavia, l’aderenza terapeutica a tali farmaci risulta non ottimale, anche a causa di preoccupazioni che pazienti ed operatori sanitari nutrono (talora impropriamente) circa il loro profilo di sicurezza (3). A questo proposito è stato recentemente proposto che un effetto ‘nocebo’, causato dalle attese negative relative a tali sostanze, possa almeno in parte spiegare l’elevata prevalenza di disturbi riscontrata negli studi osservazionali rispet-

*Indirizzo per la corrispondenza*

Giovanni B. Vigna  
U.O. Medicina Interna Universitaria  
Azienda Ospedaliera di Ferrara - Polo di Cona  
E-mail: vgg@unife.it

to ai trial clinici randomizzati (RCT, Randomized Controlled Trials) (4). Tale effetto, contrapposto semanticamente all'effetto placebo, sarebbe originato dalla vasta eco mediatica che all'inizio degli anni 2000 ebbero alcuni rari ma gravi effetti collaterali muscolari di cerivastatina (molecola poi ritirata dal commercio) (5) e viene tuttora ampliato e nutrito da informazioni generiche che i pazienti trattati raccolgono da internet o da passa-parola poco affidabili (6).

I trial clinici randomizzati non rappresentano certamente l'ambito migliore entro cui valutare la tollerabilità di un farmaco, soprattutto in relazione agli eventi avversi (*adverse drug reaction*, ADR) che si verificano raramente, che si manifestano dopo un periodo d'uso più prolungato o che riguardano una quota parte di popolazione più suscettibile, frequentemente esclusa dai grandi RCT (nel caso delle statine, ad esempio, pazienti anziani, polifarmacotrattati o con ridotta funzionalità epatica, con storia di patologia muscoloscheletrica, ecc.) (7).

I dati pubblicati riportano in generale, un ottimo profilo di sicurezza delle statine, con un rischio di ADR gravi inferiore all' 1-2% (8). Gli eventi più comunemente osservati sono il danno muscolare, l'aumento asintomatico di alcuni enzimi (transaminasi epatiche, creatin chinasi) e vari disturbi gastrointestinali generici e mal definiti (quali dispesia, nausea, costipazione, ecc.). Tuttavia sono state descritte altre manifestazioni che per la loro genericità, occasionalità o per essere di non facile rilievo/definizione/attribuzione, presentano aspetti che necessitano di approfondimento e caratterizzazione. È il caso, ad esempio, delle reazioni allergiche, dei disordini cognitivi o della sfera psichica, delle alterazioni della libido, della cataratta o anche della potenziale teratogenicità che proprio l'ampio utilizzo di tali sostanze

rende opportuno analizzare e che saranno di seguito delineati, dedicando preliminarmente alcune osservazioni essenziali alla miopia.

### **Mialgie, miosite e altri disordini muscolari**

Le prime segnalazioni sistematiche di intolleranza muscolare a questi farmaci sono state riportate a partire dalla fine degli anni novanta (5). Con riferimento alla recente classificazione proposta dalla Società Europea dell'Aterosclerosi, si possono riconoscere le seguenti condizioni associate alla terapia ipolipemizzante (9):

- Mialgia: sensazione di "discomfort muscolare" in presenza di livelli normali dell'enzima creatinofosfochinasi (CPK), o a suoi incrementi contenuti (inferiori a 4 volte il limite massimo di norma, LMN). Comprende i dolori muscolari, la sensazione di indolenzimento o di rigidità muscolare e la presenza di crampi;
- Dolore muscolare con incremento CPK tra il 4 e le 10 volte il LMN: da indagare previa sospensione della terapia per la possibilità di patologia muscolare sottostante;
- Miopia o miosite: sensazione di debolezza o dolore muscolare, associata ad incremento del CPK>10 volte il LMN. Richiede spesso l'esecuzione di biopsia muscolare e/o risonanza magnetica per meglio caratterizzare tale condizione;
- Rabdomiolisi clinica: mioglobinuria e/o insufficienza renale acuta provocata da distruzione delle cellule muscolari con rilascio dei componenti intracellulari in circolo e valori di CPK >40 volte il LMN.

Sebbene l'esatto meccanismo della miotoxicità non sia del tutto chiarito, si ritiene che l'inibizione dell'enzima HMG-CoA reduttasi provochi, oltre ad una diminuita sintesi di colesterolo, anche la riduzione

di metaboliti a valle, coinvolti nel mantenimento di funzioni vitali nelle cellule muscolari (sintesi di proteine prenilate e di coenzima Q10, attivazione dei canali del cloro nella membrana muscolare, incremento del calcio intracellulare, ecc.) (10).

Sono stati identificati alcuni fattori predisponenti (*Tabella 1*) quali l'assunzione di alcool, l'intenso esercizio fisico, la concomitante terapia con ormoni steroidei o con farmaci che, come atorvastatina, lovastatina, simvastatina, sono metabolizzati dal citocromo P450-3A4 (fibrati, macrolidi, warfarin, inibitori della proteasi di HIV, ecc.) oppure dal citocromo P450-2C9 come fluvastatina (ciclosporina, amiodarone, antiepilettici, ecc.) (10).

In una metanalisi sono stati esaminati 14 RCT di prevenzione primaria (46.262 pazienti) e 15 RCT di prevenzione secondaria (37.618 pazienti) condotti con inibitori dell'HMG-CoA reduttasi, evidenziando una differenza non significativa in termini di comparsa di sintomi muscolari nel gruppo in terapia con statine rispetto al gruppo placebo (11). D'altra parte lo

studio PRIMO (Prediction du Risque Musculaire en Observationnel), indagine osservazionale condotta in Francia su 7.924 pazienti dislipidemici in trattamento con statine ad alto dosaggio da almeno 3 mesi, ha rivelato un tasso di incidenza di miopia (definita come sensazione di pesantezza, rigidità o debolezza, di tipo continuo, prevalente a livello di gambe e delle caviglie) di 10,5%. La sintomatologia compariva generalmente entro un mese dall'inizio della terapia e risultava frequentemente associata a storia personale o familiare di sintomi muscolari o crampi (con o senza precedente terapia ipolipemizzante), ad ipotiroidismo non trattato o a precedenti livelli elevati di CPK (12).

Oltre alla possibile comparsa di mialgie, i dati osservazionali permettono di stimare che un significativo incremento di CPK (oltre le 5 volte il LMN) occorre nel 2% dei pazienti in terapia, mentre la prevalenza di rabdomiolisi può essere stimata in 2 casi ogni 100.000 pazienti trattati.

È importante osservare come le manifestazioni muscolari non fatali sono in

**Tabella I - Fattori di Rischio per miotossicità.**

Dose impiegata
Come per tutti i farmaci, gli effetti indesiderati delle statine sono correlati alla dose impiegata e sono stati riscontrati soprattutto in occasione del cosiddetto trattamento "intensivo", condotto con alte dosi di statine lipofile (atorvastatina e simvastatina).
Fattori esogeni
Alcoolismo, utilizzo di droghe (cocaina, anfetamine, eroina) ed eccessivo sforzo fisico possono determinare la comparsa di mialgie ed aumento nei livelli ematici degli enzimi muscolari in corso di terapia con statine, così come un eccessivo uso di succhi di pompelmo, arancia rossa o mirtillo.
Fattori endogeni
Età avanzata, sesso femminile, basso peso corporeo, origine asiatica sono tutti elementi che possono favorire la comparsa di effetti collaterali durante la terapia con statine, soprattutto in presenza di malattie sistemiche (infezioni acute, diabete mellito, insufficienza renale ed epatica), disfunzioni tiroidee (ipotiroidismo) e malattie muscolari metaboliche congenite (malattia di McArdle, deficit di carnitina, miopatie congenite).
Interazioni farmacologiche
Oltre il 50% degli effetti collaterali più gravi è correlato ad interazioni con altri farmaci e si verifica soprattutto in caso di impiego di sostanze metabolizzate a livello del citocromo P450. L'uso di farmaci che possono interagire con le statine deve pertanto essere considerato con attenzione.

genere reversibili, e che ciò si verifica entro 2-4 settimane dalla sospensione del trattamento. Talora, tuttavia, la miopatia associata a statine può rappresentare l'elemento in grado di rendere manifesto un sottostante disordine muscolo-scheletrico o una patologia infiammatoria: nei casi di persistenza di dolore e/o importante elevazione dei livelli di CPK anche a distanza dalla sospensione della terapia, è indicato dunque sottoporre il paziente ad indagini aggiuntive (quali, ad es., elettromiografia, biopsia muscolare, ecc.) (7). Del tutto inconsueto, e di evenienza particolarmente rara (circa 2-3 casi per 100.000 soggetti trattati per anno), risulta un altro disturbo muscolare in stretto rapporto all'utilizzo di statine: la miopatia necrotizzante immuno mediata (MNIM) (13, 14). Oltre il 60% dei soggetti affetti riferisce un trattamento con statine; essa è caratterizzata dalla presenza di miopatia prossimale simmetrica ingravescente con elevati livelli di CPK (range 1.000-50.000 UI/L), da segni di miopatia all'elettromiografia, da necrosi o segni di degenerazione/rigenerazione alla biopsia muscolare e, a livello circolante, da autoanticorpi diretti verso l'enzima HMG-CoA reduttasi. Questi ultimi rappresentano un marker discretamente sensibile (sono presenti in circa il 50% dei casi) ed altamente specifico per tale condizione (risultando pressoché assenti nella popolazione generale e solo molto raramente in rapporto ad altre miopatie infiammatorie). È verosimile che le statine, determinando una sovra-regolazione del gene HMGCR, e dunque inducendo una aumentata sintesi di HMG-CoA reduttasi, possano fungere da innesco nei confronti del sistema immunitario di pazienti geneticamente predisposti. In presenza di MNIM la sospensione del trattamento non si associa a remissione del quadro clinico, ed è stato ipotizzato che le fibre muscolari rigeneranti (in risposta

al danno) iperesprimano sia HMGCR che geni codificanti per le molecole MHC di classe I (per verosimile stress del reticolo endoplasmico cellulare) con ciò favorendo la produzione di citochine e chemochine coinvolte nel disordine immunitario. Nel sospetto di tale patologia, può essere opportuno dosare gli anticorpi anti HMG-CoA reduttasi (test ELISA), sottoporre il paziente ad elettromiografia e biopsia muscolare ed infine intraprendere una terapia specifica immunosoppressiva.

### **Statine e sintomi gastroenterici**

È frequente il riscontro, anche in soggetti asintomatici, di anomalie dei test biochimici di funzionalità epatica. L'assenza di altre cause che possano spiegare un incremento delle transaminasi (aspartico e alanino amino transferasi, AST/ALT), può far supporre un effetto secondario ad una terapia in atto, espressione talora di danno epatico acuto (15).

Le statine determinano non raramente un incremento dei livelli di transaminasi. Nella già citata metanalisi di Finegold et al., un incremento di AST/ALT è stata l'unica ADR significativa riportata nei trial di prevenzione primaria e secondaria, ed è risultata più frequente nei pazienti in terapia con alte dosi di statine (AST/ALT superiori a 3 vv. il LMN nello 0,3% dei soggetti che assumevano statine a bassa intensità rispetto a 1% di coloro che assumevano statine ad alta intensità,  $p<0,001$ ) (11). Tuttavia le statine attualmente in commercio risultano associate ad un rischio molto basso di epatite/colestasi e solo aneddoticamente ad insufficienza epatica. Questi farmaci possono essere prescritti, se indicato, a soggetti affetti da steatosi epatica, ai pazienti sottoposti a trapianto epatico (in relazione alla prognosi) ed ai pazienti con epatite autoimmune, considerando

che i rari casi di tossicità epatica segnalati in corso di terapia con statine, risultano in rapporto ad un effetto idiosincrasico piuttosto che ad un reale meccanismo farmaco relato.

Non sono attualmente disponibili dati attendibili relativi ad una relazione causale tra comuni sintomi gastro-intestinali (diarrea, dispepsia, dolore addominale e stipsi) e terapia con statine. Studi su larga scala hanno riportato un'incidenza di stipsi e dolore addominale nel 2-3% dei soggetti trattati, ma risulta difficile attribuire con certezza questa sintomatologia aspecifica a tali farmaci, causa l'elevata prevalenza di disturbi analoghi nella popolazione generale e l'elevata prevalenza di variabili confondenti (concomitanti terapie ipolipemizzanti, indicazioni dietetiche, ecc.) (16-18).

Alcuni report clinici hanno descritto casi sporadici di pancreatite acuta indotta da statine: si tratta di una evenienza molto rara e non è possibile definirne il meccanismo patogenetico, sebbene taluni Autori abbiano ipotizzato interazioni farmacologiche alla base del suo sviluppo (19-22).

### Allergie e intolleranze in corso di terapia con statine

Quantunque non si conosca la reale incidenza di reazioni avverse Ig-E mediate in corso di terapia con statine, si ritiene che rash cutanei e reazioni allergiche in senso lato abbiano un'incidenza pari a circa il 7%, con anafilassi riportata in meno dell'1% dei casi (23, 24): sono stati descritti casi di eosinofilia, sindrome di Stevens-Johnson, lupus eritematoso iatrogeno, orticaria cronica, polmonite da ipersensibilità, vasculite, ecc. (25-27). Gli epitopi statinici sembrano essere farmaco-specifici, classe-specifici (idrofilia vs lipofilia) e correlati al tipo di statina (naturale vs sintetica) (28). Le reazioni di tipo non IgE mediate, invece,

sembrerebbero essere più frequenti nei pazienti con particolari polimorfismi genetici del CYP2D6 (29) e risultare correlati alla lipofilia del singolo farmaco (28).

Nei pazienti con allergia documentata, e necessità di trattamento farmacologico, può essere proponibile una procedura di desensibilizzazione con una statina non ancora testata. Khan et al. hanno riportato il caso di un uomo di 37 anni con cardiopatia ischemica e shock anafilattico a seguito di assunzione di atorvastatina e simvastatina. Data la persistenza di ipercolesterolemia malgrado una complessa terapia ipolipemizzante (niacina, ezetimibe, colestevoril e fenofibrato), veniva proposta una procedura di desensibilizzazione a rosuvastatina. Sotto monitoraggio intensivistico il paziente assumeva per os soluzioni diluite del farmaco a dosi crescenti ogni 30 min; a causa della comparsa di prurito, a seguito della prima somministrazione (0,1 mg), veniva trattato con steroide ed antistamico, per proseguire successivamente asintomatico fino alla dose di 10 mg (25). Questo caso conferma l'ipotesi che le reazioni IgE medicate possano essere altamente specifiche per singolo farmaco, non essendo tuttavia ancora chiari quali siano i determinanti antigenici coinvolti.

### Statin e sistema nervoso centrale

#### *Disordini cognitivi e cefalea*

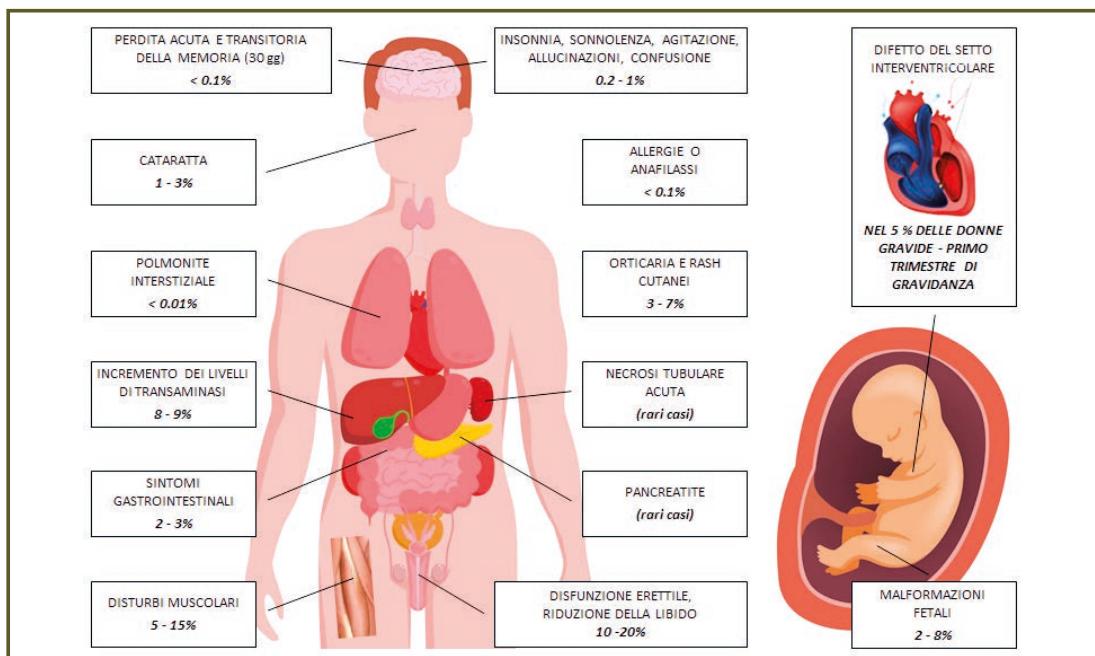
Nel 2012 la Food and Drug Administration (FDA), agenzia statunitense del farmaco, ha richiamato l'attenzione medica sui disordini cognitivi di grado lieve e transitori in corso di terapia con inibitori dell'HMG CoA reduttasi. I report delle ADR post marketing avevano infatti prospettato un'abnorme incidenza di perdita di memoria mal definita, o confusione mentale, reversibili alla sospensione del trattamento, e con particolare interessamento della

popolazione di oltre 50 anni di età (30), e ciò nonostante i presupposti che inducevano a ritenere le statine farmaci in grado di prevenire la demenza vascolare.

Una serie di casi raccolta nel corso di poco meno di 5 anni permetteva di identificare 60 pazienti in terapia con statine che presentavano deficit mnesici: il 50% di questi soggetti aveva notato una riduzione della performance cognitiva entro due mesi dall'inizio della terapia; 14 di 25 riferivano un miglioramento alla sospensione. Lo studio, che comprendeva individui già a rischio di disfunzione cognitiva, non riscontrava associazioni specifiche tra deficit funzionale, particolari molecole (lipofile o idrofile), dose, età o farmaci assunti concomitantemente (31).

Un altro studio retrospettivo di coorte, pubblicato nel 2015 ed effettuato analizzando il database dei medici di medicina generale del Regno Unito, ha confrontato

l'incidenza di deficit mnesici transitori improvvisi nei pazienti con recente assunzione di statine rispetto ad un gruppo controllo e quindi rispetto a pazienti in terapia con altri farmaci ipolipemizzanti (colestiramina, colesevelam, gemfibrozil, fenofibrato, niacina, ecc.). Nel confronto è emerso un aumento del rischio di disordini cognitivi pari a circa 4 volte nei 30 giorni successivi all'inizio della terapia con statine *vs* controlli, e il dato veniva confermato, seppur in misura ridotta, anche nei pazienti in terapia con altri ipolipemizzanti, rispetto a quelli non in trattamento (32); le statine lipofile apparivano maggiormente associate al disordine cognitivo, ed era evidenziata una significativa relazione dose risposta (OR 1,59 statine ad elevata *vs.* bassa efficacia, 1,34 statine a moderata *vs.* bassa efficacia,  $p < .001$  per trend lineare). Come indicato dagli autori, l'osservazione che sia le statine che gli altri farmaci ipolipemizzanti



**Figura I** - Effetti avversi attribuiti alla terapia con statine e loro prevalenza sul totale dei soggetti trattati. Dati di letteratura discordanti non consentono di definire con esattezza alcune percentuali, che in molti casi risultano simili o coincidenti con quelle di soggetti non in trattamento (vedi testo).

erano risultati associati a deficit mnesici, comportava due possibili conclusioni:

- a) che tutti questi farmaci, indipendentemente dal meccanismo di azione, possono causarli;
- b) che l'associazione sia il risultato di un bias, e questo potrebbe essere determinato da una maggiore attenzione da parte del medico curante ai soggetti con tale sintomatologia e che ricevano terapie di questo tipo.

Data l'eterogeneità dei vari ipolipemizzanti, quest'ultima appare l'ipotesi più probabile.

Relativamente all'insorgenza del m. Alzheimer, che vede nella deposizione delle placche  $\beta$ -amiloidi uno dei principali eventi patogenetici, gli elevati livelli di colesterolo sembrerebbero sia favorire la malattia, che prevenirla (32, 33), mentre l'analisi degli end point secondari di vari RCT condotti con statine (PROSPER, HPS, JUPITER, ...) non ha evidenziato differenze significative nel declino delle funzioni cognitive tra il gruppo dei soggetti trattati e quello placebo, a fronte dei differenti test neuropsicologici utilizzati (34-37).

Due metanalisi di studi condotti in pazienti affetti da m. Alzheimer hanno mostrato un effetto sostanzialmente neutro delle statine sulle funzioni cognitive (38). Sulla base dei dati disponibili, le prove a sostegno di un effetto causale sono deboli o inconsistenti: in una *review* narrativa Rojas-Fernandez conclude che i possibili disordini cognitivi associati al trattamento con ipolipemizzanti sono rari, potenzialmente reversibili e che non possono essere paragonati ai benefici ottenibili in ambito cardiovascolare (39, 40). La National Lipid Association rimarca tuttavia come l'impatto su prognosi e qualità di vita della possibile comparsa di deficit mnesici o di demenza, a fronte dell'invecchiamento

della popolazione generale e specificamente dei pazienti in trattamento con statine, richieda che qualunque segnalazione attinente debba essere attentamente vagliata, con visite specialistiche e test appropriati (30). Se permanesse il dubbio di un effetto causale, andrebbe ponderata la decisione di sospendere la terapia ipolipemizzante tramite un'analisi del rapporto rischio/beneficio e della prognosi 'quoad valetudinem' del singolo paziente (30).

È opportuno infine menzionare un'altra possibile complicanza neurologica, fastidiosa e invalidante: la cefalea. Veniva riportata come possibile effetto avverso già in alcune indagini degli anni '90 (41). Tale associazione non è stata però confermata da studi successivi che, al contrario, hanno avvalorato l'ipotesi di un potenziale effetto benefico: è stato infatti suggerito che le statine, migliorando la funzione endoteliale, la "stiffness" arteriosa ed il tono vascolare, possano ridurre la frequenza degli attacchi di emicrania (42). Non è tuttavia possibile escludere che alcune molecole, specie quelle dotate di maggior liposolubilità (simvastatina, atorvastatina, lovastatina), possano favorire in soggetti predisposti una recrudescenza di tale condizione.

#### *Disturbi del sonno e della sfera psichica*

Dati provenienti da registri nazionali hanno attribuito alla terapia con statine alterazioni comportamentali (grave irritabilità, impulsi omicidi, minacce agli altri, ideazioni suicidarie, depressione e violenza, paranoia, alienazione, comportamento antisociale) e disturbi del sonno (risvegli frequenti, durata del sonno più breve, risveglio mattutino, incubi, sonnambulismo, pavor nocturnus) (43). Alla base di questi sintomi sono stati proposti vari meccanismi, in particolar modo correlati ad una possibile alterazione della produzione di mielina a carico del sistema nervoso cen-

trale. Gli studi condotti per valutare specifici *endpoint* neuropsichiatrici hanno prodotto risultati contrastanti. In merito ai disordini comportamentali, uno studio condotto su 409 pazienti con recente innesto di defibrillatore cardiaco impiantabile, ha evidenziato un'associazione borderline tra terapia con inibitori dell'HMG-CoA reduttasi e l'insorgenza di depressione (44); al contrario uno studio osservazionale retrospettivo, che ha incluso più di 46.000 pazienti, non ha mostrato incremento di disordini psichiatrici (schizofrenia, depressione maggiore, psicosi, ecc.) in soggetti trattati con statine (45).

Un'indagine italiana osservazionale, basata su report spontanei di ADR organizzati in database (Gruppo interregionale di Farmacovigilanza, GIF), ha riscontrato una bassa percentuale di segnalazioni in ambito di "eventi psichiatrici" (insonnia, sonnolenza, agitazione, confusione e allucinazioni), pari al 3,75% di tutte le ADR relative agli inibitori dell'HMG-CoA reduttasi, e allo 0,17% sul totale delle segnalazioni per tutti i farmaci. Solamente l'insonnia appariva più frequentemente in rapporto all'utilizzo di statine che non agli altri farmaci inclusi nel database (Odds ratio 3,3) (43), e fra queste in particolare ai composti più lipofili (e dunque con un potenziale tropismo per il Sistema Nervoso Centrale). Una metanalisi più recente basata su alcuni RCT specifici (in cui i disturbi del sonno dei soggetti trattati venivano valutati mediante polisonnografia) ha documentato come le statine non mostrino effetti significativi sulla durata totale e sulla qualità del sonno, ma riducano piuttosto il tempo di veglia ed il numero dei risvegli notturni (46).

### **Statine e rene**

Alcuni case-report hanno segnalato la comparsa di necrosi tubulare acuta in pa-

zienti in terapia con rosuvastatina ad alte dosi. In una rivalutazione dell'intero programma di RCT con tale farmaco, su oltre 40.000 soggetti trattati, è stato riportato un possibile danno o insufficienza renale in 536 partecipanti pari all'1,3% del totale, percentuale sovrapponibile alla corrispondente del gruppo placebo (Rischio Relativo 1,03) (47). Successive metanalisi hanno viceversa sottolineato alcuni possibili benefici derivanti dall'utilizzo di questa classe di farmaci: incremento della velocità di filtrazione glomerulare in pazienti con insufficienza renale cronica, riduzione di albuminuria nei pazienti diabetici o prevenzione della nefropatia da mezzo di contrasto (48-50). Le statine sono risultate sicure nei pazienti nefro-trapiantati o in trattamento emodialitico. Per tal motivo nei soggetti senza nefropatia avanzata preesistente, non è indicata la valutazione routinaria degli indici di funzionalità renale in corso di terapia (51).

### **Statine e disfunzione erettile/ riduzione della libido**

La disfunzione erettile presenta una genesi multifattoriale. I pazienti arteriopatici lamentano frequentemente tale condizione, spesso non responsiva ai trattamenti usuali (es. inibitori fosfodiesterasi tipo 5). Per quanto potenzialmente interessante, dato il ruolo rappresentato dal colesterolo come precursore ormonale, le ricerche in quest'ambito sono relativamente scarse ed i risultati difficilmente interpretabili. In vitro e nell'animale da esperimento le statine si sono dimostrate capaci di interferire con la sintesi di ormoni sessuali (in particolare progestinici, ma anche testosterone) sia nelle cellule di Leydig isolatamente (52) che negli organi endocrini (53); tuttavia meccanismi di feed-back locali (autocrino-paracrini) o che coinvolgono

l'encefalo (e la secrezione di ormone luteinizzante) sembrerebbero causare una up-regulation di tutti gli enzimi coinvolti nel processo steroidogenetico, determinando un parziale compenso. In 8 pazienti trattati con ipocolesterolemizzanti De Graaf e coll. hanno riscontrato una riduzione della libido, evidenziando una contestuale e reversibile riduzione dei livelli di testosterone, quando dosato (54): anche in questo caso gli autori hanno ipotizzato una sua ridotta sintesi da parte delle cellule di Leydig testicolari (a partire dal colesterolo cellulare o da quello delle LDL circolanti) determinata dalla inibizione dell'enzima HMG-CoA reduttasi o dalla inibizione della 17 chetoreductasi, necessaria per la conversione di deidroepiandrosterone e androstenedione rispettivamente in androstanediolo e testosterone.

Al contrario due metanalisi, pubblicate nel 2014, hanno evidenziato un miglioramento clinico in pazienti con disfunzione erettile trattati con statine e valutati tramite l'International Index of Erectile Function, un breve questionario capace di sondare 5 domini della sessualità (desiderio, funzione erettile, funzione orgasmica, soddisfazione del rapporto e soddisfazione generale) (55, 56). Molto più sfumate le alterazioni nella donna, tuttavia mai sufficientemente valutate (57). In generale gli effetti della terapia ipolipemizzante sulla libido potrebbero anche risultare rilevanti (ed interessare percentuali significative dei soggetti trattati) (58), ma non si può escludere che i casi segnalati siano in rapporto all'aterosclerosi determinata dall'ipercolesterolemia su aorta (da cui si dipartono le aa. testicolari e ovariche) o arterie iliache (che danno origine alle aa. pudende e peniene), e non ai farmaci utilizzati per contrastarla.

Poche altre indagini hanno misurato in modo seriale livelli plasmatici di testosterone libero o totale nei soggetti trattati e han-

no osservato incostantemente livelli ridotti; risulterebbero tuttavia necessari RCT di ampie dimensioni, ben progettati e di alta qualità, per meglio chiarire gli effetti potenziali che questi farmaci esercitano su fertilità, riproduzione e disfunzioni sessuali.

### Statine e occhio

Nel 1990, R. J. Gerson descrisse lo sviluppo di opacità sottocapsulari lenticolari in cani sottoposti a somministrazione di elevate dosaggi di statine; secondo l'autore, l'accumulo del farmaco nella regione corticale esterna del cristallino (area in cui la sintesi del colesterolo è di particolare importanza per la funzione della lente) avrebbe comportato lo sviluppo di zone di alterata trasparenza (59). Il rischio di insorgenza di cataratta fu pertanto una tra le prime ADR da statine ad essere valutate, ma nell'uomo i risultati apparvero da subito meno convincenti. Nel 2017 è stata pubblicata un'ampia rivalutazione su tale argomento, con risultati opposti tra i 12 studi osservazionali (6 di coorte e 6 caso-controllo), che mostravano un incremento del 10% di rischio di cataratta (al limite della significatività statistica) e i 5 RCT (rischio ridotto in maniera non significativa del 10%). Gli autori, rimarcando l'ampia eterogeneità degli studi considerati, sottolineavano l'incertezza suddescritta, ritenendo più probabile l'assenza di una correlazione e sottolineando l'opportunità di non precludere al soggetto con malattia cardiovascolare il trattamento con statine, di comprovata efficacia, a fronte del timore di un effetto dubbio ma eventualmente trattabile (60).

### Statine e polmone

Un caso di polmonite interstiziale associata a statine è stato descritto per la prima volta nel 1995 (61); in seguito sono

state pubblicate altre casistiche analoghe. Un ampio studio clinico ha documentato l'associazione tra trattamento con statine e patologia polmonare interstiziale (62); una recente pubblicazione da parte di autori giapponesi ha definito l'incidenza di polmonite interstiziale indotta da statine tra lo 0,0009% e lo 0,6% per anno. Dopo suddivisione in un gruppo senza malattie polmonari ed un secondo con storia di malattia polmonare, venivano riconosciuti quali fattori di rischio per tale condizione, età (avanzata) e sesso (femminile) nel primo gruppo e diabete o assunzione di atorvastatina nel secondo (63). Il meccanismo patogenetico è stato ricondotto ad una inibizione fosfolipasica, ad una interferenza con l'energetica mitocondriale muscolare o ad un effetto immunomediato da radicali liberi dell'ossigeno (con attivazione cellulare e rilascio di mediatori proinfiammatori) (64, 65).

### Statine e tumori

L'associazione tra statine e patologia oncologica ha creato in passato non pochi allarmismi. Nello studio CARE, in un ambito di prevenzione secondaria, fu osservato che tra le 576 donne arruolate si verificava un eccesso di neoplasie mammarie nel braccio pravastatina *vs* quello placebo (1 *vs* 12, p<0,001) (66); il dato non venne poi replicato in altri trial. Attualmente le evidenze prevalenti sono opposte, indicando un verosimile effetto protettivo sullo sviluppo di neoplasie, mediato da meccanismi proapoptotici, anti-angiogenici ed immunomodulatori che sono stati ricondotti al pleiotropismo proprio di questa classe di farmaci. Molti studi osservazioni hanno infatti riscontrato una significativa riduzione di cancro al seno, carcinoma colo-rettale, ovarico, pancreatico, polmonare e for-

me linfomatose. Anche la mortalità per neoplasie sembrerebbe ridotta: ad esempio un'indagine condotta in Danimarca sull'intera popolazione adulta tra il 1995 e il 2009, ha documentato che i soggetti trattati con statine (prima di una diagnosi di neoplasia) mostravano una mortalità per tutte le cause, e specificamente per cancro, inferiore del 15% rispetto ai non-utilizzatori (67).

### Statine e gravidanza

Questo argomento, per la sua importanza e complessità meriterebbe una trattazione a sé stante, e ci limitiamo qui ad accennare solamente i paventati effetti teratogeni in corso di terapia. Ancora una volta questo timore nasce da studi condotti nell'animale, alcuni dei quali addirittura precedenti la commercializzazione delle prime statine (68, 69). Nonostante le scarse evidenze raccolte in rapporto all'infrequente uso di questi farmaci nelle pazienti gravide (e ciò a causa degli *alert* posti da linee guida e autorità regolatorie) (4, 70), l'esame di 16 studi (di cui un solo RCT) ha permesso di riscontrare una prevalenza simile di anomalie congenite nei feti delle donne esposte a statine nel corso del primo trimestre di gravidanza rispetto alla popolazione generale (71).

Tra le donne trattate affette da ipercolesterolemia familiare, in cui gli elevati livelli di colesterolo possono di per sé determinare effetti teratogeni (oppure nascita di neonati prematuri o di basso peso), non pare osservarsi alcun incremento di malformazioni. Botha et al. hanno descritto 25 casi di gravidanze in donne con ipercolesterolemia familiare omozigote, di cui 18 esposte al trattamento con statine immediatamente prima e/o durante la gravidanza: nell'84% dei casi la gravidanza si è svolta in assenza di com-

plicanze, con tassi di nascite premature e di aborti nell'ordine dell'8% (sovrapponibile alla popolazione generale) (72). Recentemente, tuttavia, Lee et al. hanno riscontrato un'aumentata incidenza di anomalie congenite cardiache, ed in particolare di difetto del setto interventricolare, nei feti di donne in terapia con statine nel corso della gravidanza (5% rispetto all'1,4% di donne non esposte) (73). In assenza di dati definitivi di sicurezza, la terapia con statine è controindicata in gravidanza: Food and Drug Administration (FDA) e European Society of Atherosclerosis (EAS) ne sconsigliano l'utilizzo nel periodo immediatamente precedente il concepimento (8-12 settimane), nel corso della gravidanza o durante l'allattamento, e suggeriscono in caso di ipercolesterolemia familiare di grado severo, terapia con sequestranti degli acidi biliari (non assorbiti) e/o lipidoaferesi (4, 69).

## Conclusioni

Dall'analisi della letteratura emerge in generale un buon profilo di sicurezza della terapia con statine. Le ADR muscolari si riscontrano frequentemente nei soggetti in terapia (5-15%, con prevalenza delle forme lievi e moderate), così come

## Glossario

- ADR:** Adverse Drug Reactions
- CPK:** Creatinfosfochinasi
- HMGCR:** gene per l'enzima Idrossimetilglutaril-CoenzimaA reduttasi (o HMG-CoA reduttasi)
- LMN:** Limite Massimo di Norma
- MHC:** Major Histocompatibility Complex
- MMSE:** Mini Mental State Examination
- MNIM:** Miopatia Necrotizzante Immuno Mediata
- RCT:** Trial clinici randomizzati

l'incremento delle transaminasi (8-9%) e le reazioni allergiche (7%, di cui l'anafilassi è riportata in meno dell'1% dei casi). Non è facile calcolare l'incidenza di altre ADR meno comuni o riportate con riluttanza, a causa di dati discordanti o di studi che non prevedono controlli: l'analisi finale è infatti inficiata dall'assenza di indagini ben strutturate destinate a tale valutazione, ed è all'opposto possibile che le statine giochino un ruolo favorevole, addirittura terapeutico, in ambiti che prima erano ritenuti potenzialmente a rischio. Non disponendo di dati conclusivi, si dovrebbe valutare con attenzione il rapporto rischio/beneficio di ogni singolo caso come guida all'avvio e mantenimento della terapia ipolipemizzante, vagliando con atteggiamento critico i sintomi riferiti dal paziente.

## RIASSUNTO

Gli inibitori della HMG-CoA reduttasi, noti anche come "statine", rappresentano uno dei farmaci più comunemente prescritti al mondo; hanno dimostrato di ridurre la morbilità e la mortalità correlate alle malattie cardiovascolari. Nonostante i loro benefici, la terapia con statine spesso si interrompe per possibili reazioni avverse da farmaco (ADR), e questo può associarsi ad un aumentato rischio di eventi cardiovascolari. Le ADR più comunemente riportate sono sintomi muscolari, aumento dei test di citolisi epatica e disagio gastrointestinale. Le reazioni allergiche, i disturbi cognitivi e altri sintomi o segni relativi a diversi organi o sistemi possono essere altrettanto importanti anche se trascurati o ignorati. Lo scopo di questa *review* è di valutare il *background* scientifico che collega le ADR alla terapia con statine, con particolare attenzione a quelle meno comuni o non valorizzate.

**Parole chiave:** *Inibitori della HMG-CoA reduttasi, effetti collaterali, aterosclerosi.*

## Bibliografia

1. Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2003; 326: 1423-1427.
2. Gu Q, Paulose RR, Burt VL, Kit BK. Prescription cholesterol-lowering medication use in adults aged 40 and over: United States, 2003-2012. *NCHS Data Brief*. 2014; 177: 1-8.
3. McKenney J M. Introduction. *Am J Cardiol*. 2006; 97: 1-2.
4. Mach F, Baigent C, Catapano AL et al. ESC Scientific Document Group, 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS), European Heart Journal 2019; pii: ehz455. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455. [Epub ahead of print]
5. Farmer JA. Learning from the cerivastatin experience. *The Lancet*. 2001; 358: 1383-1385.
6. Tobert JA, Newman CB. The nocebo effect in the context of statin intolerance. *J Clin Lipidol*. 2016; 10: 739-747.
7. Thompson PD, Clarkson PM, Rosenson RS. An Assessment of Statin Safety by Muscle Experts. *Am J Cardiol*. 2006; 97: 8.
8. Bernini F, Poli A, Paoletti R. Safety of HMG-CoA reductase inhibitors: focus on atorvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001; 15: 211-218.
9. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A et al. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J*. 2015; 36: 1012-1022.
10. Vaklavas C, Chatzizisis YS, Ziakas A et al. Molecular basis of statin-associated myopathy. *Atherosclerosis*. 2009; 202: 18-28.
11. Finegold JA, Manisty CH, Goldacre B et al. What proportion of symptomatic side effects in patients taking statins are genuinely caused by the drug? Systematic review of randomized placebo-controlled trials to aid individual patient choice. *Eur J Prev Cardiol*. 2014; 21: 464-474.
12. Bruckert E, Hayem G, Dejager S et al. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients-the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005; 19: 403-414.
13. Musset L, Allenbach Y, Benveniste O et al. Anti-HMGCR antibodies as a biomarker for immune-mediated necrotizing myopathies: A history of statins and experience from a large international multi-center study. *Autoimmun Rev*. 2016; 15: 983-993.
14. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L et al. Autoantibodies against 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase (HMGCR) in Patients with Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *Arthritis Rheum*. 2011; 63: 713-721.
15. Bays H, Cohen DE, Chalasani N et al. The National Lipid Association's Statin Safety Task Force. An assessment by the Statin Liver Safety Task Force:2014 update. *J Clin Lipidol*. 2014; 8: 47-57.
16. Bocanegra SJ, Bocanegra TS, Walker JF et al. Long-term safety and efficacy profile of simvastatin. *Am J Cardiol*. 1991; 68: 1127-1131.
17. Black DM, Bakker-Arkema RG, Nawrocki JW. An overview of the clinical safety profile of atorvastatin (lipitor), a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arch Intern Med*. 1998; 158: 577-584.
18. Kasliwal R, Wilton LV, Cornelius V et al. Safety profile of rosuvastatin: results of a prescription-eventmonitoring study of 11,680 patients. *Drug Saf*. 2007; 30: 157-170.
19. Miltiadous G, Anthopoulos A, Elisaf M. Acute pancreatitis possibly associated with combined salicylate and atorvastatin therapy. *JOP. J Pancreas (Online)*. 2003; 4: 20-21.
20. Wong PW, Dillard TA, Kroenke K. Multiple organ toxicity from addition of erythromycin to long term lovastatin therapy. *South Med J*. 1998; 91: 202-205.
21. Abdul-Ghaffar NU, El-Sonbaty MR. Pancreatitis and rhabdomyolysis associated with lovastatin/gemfibrozil therapy. *J Clin Gastroenterol*. 1995; 21: 340-341.
22. McDonald KB, Garber BG, Perreault MM. Pancreatitis associated with simvastatin plus fenofibrate. *Ann Pharmacother*. 2002; 36: 275-279.
23. Liebhaber MI, Wright RS, Gelberg HJ et al. Polymyalgia, hypersensitivity pneumonitis and other reactions in patients receiving HMG-CoA reductase inhibitors: a report of ten cases. *Chest*. 1999; 115: 886-889.
24. Zocor (simvastatin) [prescribing information]. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co Inc. 2015.
25. Khan AS, Stewart DK, Brunzell JD et al. Successful desensitization to rosuvastatin in a patient with a history of anaphylaxis to multiple statins. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131: 234-235.
26. Bellini V, Assalve D, Lisi P. Urticarial vasculitis from simvastatin: what is the alternative drug? *Dermatitis*. 2010; 21: 223-224.
27. Khan S. Chronic urticaria and use of statins. *Asia Pac Allergy*. 2012; 2: 227-229.

28. Singh N, Tamariz J, Chamorro G, Medina-Franco JL. Inhibitors of HMGCoA reductase: current and future prospects. *Mini Rev Med Chem.* 2009; 9: 1272-1283.
29. Vermes A, Vermes I. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 enzymes: effect on efficacy and tolerability of HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004; 4: 247-255.
30. Marcus ZA, Vande Griend JP, Linnebur SA. FDA drug safety communications: a narrative review and clinical considerations for older adults. *Am J Geriatr Pharmacother.* 2012; 10: 264-271.
31. Wagstaff LR, Mitton MW, Arvik BM, Doraishwamy PM. Statin-associated memory loss: analysis of 60 case reports and review of the literature. *Pharmacotherapy.* 2003; 23: 871-880.
32. Strom BL, Schinnar R, Karlawish J et al. Statin Therapy and Risk of Acute Memory Impairment. *JAMA Intern Med.* 2015; 175: 1399-405.
33. Benarroch EE. Brain cholesterol metabolism and neurologic disease. *Neurology.* 2008; 71: 1368-1373.
34. Trompet S, van Vliet P, de Craen AJ et al. Pravastatin and cognitive function in the elderly. Results of the PROSPER study. *J Neurol.* 2010; 257: 85-90.
35. Collins R, Armitage J, Parish S et al. Heart Protection Study Collaborative Group. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet.* 2004; 363: 757-767.
36. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *N Engl J Med.* 2008; 359: 2195-2207.
37. McGuinness B, Craig D, Bullock R et al. Statins for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 7: CD007514.
38. Pandey RD, Gupta PP, Jha D, Kumar S. Role of statins in Alzheimer's disease: a retrospective meta-analysis for commonly investigated clinical parameters in RCTs. *Int J Neurosci.* 2013; 123: 521-525.
39. Rojas-Fernandez CH, Cameron JC. Is statin-associated cognitive impairment clinically relevant? A narrative review and clinical recommendations. *Ann Pharmacother.* 2012; 46: 549-557.
40. Rojas-Fernandez CH, Goldstein LB, Levey AI et al. An assessment by the Statin Cognitive Safety Task Force: 2014 update. *J Clin Lipidol.* 2014; 8: 5-16.
41. Shuster J. Lipid-lowering drugs and headache. *Nursing.* 1998; 28: 32.
42. Buettner C, Nir RR, Bertisch SM et al. Simvas-
- tatin and vitamin D for migraine prevention: A randomized, controlled trial. *Ann Neurol.* 2015; 78: 970-981.
43. Tuccori M, Lapi F, Testi A et al. Statin-associated psychiatric adverse events: a case/non-case evaluation of an Italian database of spontaneous adverse drug reaction reporting. *Drug Saf.* 2008; 31: 1115-1123.
44. Hoogeweg MT, Theuns DA, Kupper N et al. Relation of statin therapy to psychological functioning in patients with an implantable cardioverter defibrillator. *Am J Cardiol.* 2013; 111: 1169-1174.
45. Mansi I, Frei CR, Pugh MJ, Mortensen EM. Psychologic disorders and statin use: a propensity score-matched analysis. *Pharmacotherapy.* 2013;33: 615-626.
46. Broncel M, Gorzelak-Pabi P, Sahebkar A, et al. Sleep changes following statin therapy: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled polysomnographic trials. *Arch Med Sci.* 2015; 11: 915-926.
47. Stein EA, Vidt DG, Shepherd J et al. Renal safety of intensive cholesterol lowering treatment with rosuvastatin: a retrospective analysis of renal adverse among 40,600 participants in the rosuvastatin clinical development program. *Atherosclerosis.* 2012; 221: 471-477.
48. Sanguankeo A, Upala S, Cheungpasitporn W et al. Effects of Statins on Renal Outcome in Chronic Kidney Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015; 7: 10.
49. Qin X, Dong H, Fang K, Lu F. The effect of statins on renal outcomes in patients with diabetic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017; 33: 6.
50. Zhou X, Dai J, Xu X et al. Comparative Efficacy of Statins for Prevention of Contrast-Induced Acute Kidney Injury in Patients With Chronic Kidney Disease: A Network Meta-Analysis. *Angiology.* 2019; 70: 305-316.
51. Kasiske BL, Wanner C, O'Neill WC. An Assessment of Statin Safety by Nephrologists. *Am J Cardiol.* 2006; 97: 82-85.
52. Klinefelter GR, Laskey JW, Amann RP. Statin drugs markedly inhibit testosterone production by rat Leydig cells in vitro: implications for men. *Reprod Toxicol.* 2014; 45: 52-58.
53. Munkboel CH, Baake MLK, Styrihave B. Atorvastatin decreases steroid production in H295R cells and in major endocrine tissues of male rats. *Arch Toxicol.* 2018; 92: 1703-1715.
54. de Graaf L, Brouwers AH, Diemont WL. Is decreased libido associated with the use of HMG-CoA-reductase inhibitors?. *Br J Clin Pharmacol.* 2004; 58: 326-328.

55. Xiang Cai, Ye Tian, Tao Wu et al. The role of statins in erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl.* 2014; 16: 461-466.
56. Kostis JB, Dobrzynski JM. The effect of statins on erectile dysfunction: a meta-analysis of randomized trials. *J Sex Med.* 2014; 11: 1626-1635.
57. Krysiak R, Drosdzol-Cop A, Skrzypulec-Plinta V, Okopie B. The effect of atorvastatin on sexual function and depressive symptoms in young women with elevated cholesterol levels - a pilot study. *Endokrynol Pol.* 2018; 69: 688-694.
58. Tuccori M, Montagnani S, Mantarro S, et al. Neuropsychiatric adverse events associated with statins: Epidemiology, pathophysiology, prevention and management. *CNS Drugs.* 2014; 28: 249-272.
59. RJ Gerson, JS MacDonald, AW Alberts et al. On the etiology of subcapsular lenticular opacities produced in dogs receiving HMG-CoA reductase inhibitors. *Exp. Eye Res.* 1990; 50: 65-78.
60. Yu S, Chu Y, Li G et al. Statin use and the risk of cataracts: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc.* 2017; 20: DOI: 10.1161/JAHA.116.004180.
61. Hill C, Zeitz C, Kirkham B. Dermatomyositis with lung involvement in a patient treated with simvastatin. *Aust N Z J Med.* 1995; 25: 745-6.
62. Xu JF, Washko GR, Nakahira K, et al. COPDGene Investigators. Statins and pulmonary fibrosis: the potential role of NLRP3 inflammasome activation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185: 547-556.
63. Momo K, Takagi A, Miyaji A, Koinuma M. Assessment of statin-induced interstitial pneumonia in patients treated for hyperlipidemia using a health insurance claims database in Japan, *Pulm Pharmacol Ther.* 2018; 50: 88-92.
64. Lantuejoul S, Brambilla E, Brambilla C, et al. Statin-induced fibrotic nonspecific interstitial pneumonia. *Eur Respir J.* 2002; 19: 577-580.
65. Coward WR, Marei A, Yang A, et al. Statin induced proinflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *J Immunol.* 2006; 176: 5284-5292.
66. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1001-1019.
67. Vallianou NG, Kostantinou A, Koulias M et al. Statins and Cancer. *Anti Cancer Agent Med Chem.* 2014; 14: 706-712.
68. Minsker DH, MacDonald JS, Robertson RT, Bokelman DL. Mevalonate supplementation in pregnant rats suppresses the teratogenicity of mevinolinic acid, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductase. *Teratology.* 1983; 28: 449-556.
69. Dostal LA, Schardein JL, Anderson JA. Developmental toxicity of the HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in rats and rabbits. *Teratology.* 1994; 50: 387-394.
70. U.S Food and Drug Administration. Available at: <http://www.fda.gov>.
71. Karalis DG, Hill AN, Clifton S, Wild RA. The risks of statin use in pregnancy: A systematic review. *J Clin Lipidol.* 2016; 10: 1081-1090.
72. Botha TC, Pilcher GJ, Wolmarans K et al. Statins and other lipid-lowering therapy and pregnancy outcomes in homozygous familial hypercholesterolemia: A retrospective review of 39 pregnancies. *Atherosclerosis.* 2018; 277: 502-507.
73. Lee MS, Hekimian A, Doctorian T, Duan L. Statin exposure during first trimester of pregnancy is associated with fetal ventricular septal defect. *Int J Cardiol.* 2018; 269: 111-113.

**MEDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ**

# SULLA MALATTIA DI L. van BEETHOVEN

## The disease of L. van Beethoven

**RENATO FELLIN<sup>1</sup>, JÜRGEN RICHERT<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Professore di Medicina Interna (in quiescenza), Università di Ferrara;

<sup>2</sup>M.D., Internal Medicine (in quiescenza), Università di Monaco, Germania

### Introduzione

A fronte della pressoché universale conoscenza della musica di Beethoven e del suo rilievo centrale nella storia della cultura europea, non sono altrettanto conosciute le vicende riguardanti la sua salute. Molto nota è la sordità che colpì il compositore già in età giovane, che provocò una grande sofferenza e certamente influì sul suo umore, sul suo carattere, sulla sua musica e sulla quale sono state pubblicate molte indagini e interpretazioni. Questo specifico aspetto non sarà trattato in questo lavoro.

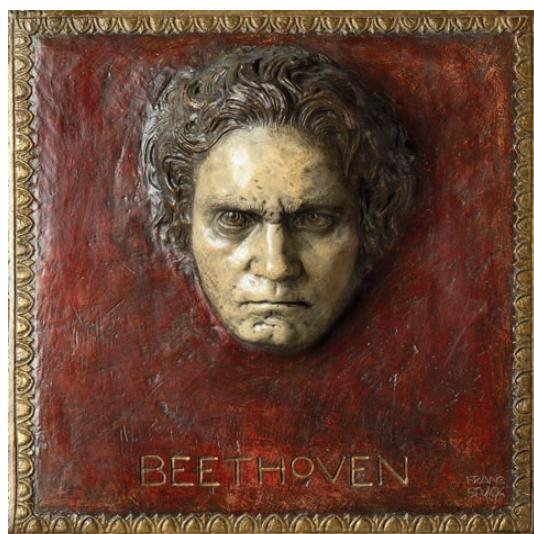
Il suo stato di salute in generale fu quasi sempre malfermo, con un alternarsi pressoché continuo di periodi di malattia-benessere che rese la vita di questo ammirabile uomo estremamente travagliata. “Bin ich immer ein armer Kranker gewesen?” “Non sono sempre stato un povero malato?” (Lettera all'amico di gioventù F. Wegeler - Vienna 16 novembre 1801) (1).

### Indirizzo per la corrispondenza

Renato Fellin

E-mail: fellin.renato@gmail.com

Dopo la sua morte e soprattutto nel secolo scorso si è andato formando un ampio “corpus” di lavori scientifici volti a descrivere la sua malattia e a formulare un’ipotesi diagnostica, alcuni eccellenti, altri contraddirittori se non fuorvianti. Ciò non deve meravigliare trattandosi di giudizi e conclusioni “a posteriori” basati su informazioni talvolta incomplete o senza ri-



Ludwig van Beethoven  
Franz Von Stuck (1863 - 1928).

scontri oggettivi fatta eccezione della accurata descrizione della malattia finale e della autopsia. Si aggiunga la pessima opinione di Beethoven nei confronti dei medici che lo ebbero in cura che cambiò in continuazione, almeno 15, definiti "somari medici" o "medici ronzanti".

La disparità delle conclusioni espresse sulla malattia di Beethoven e talvolta la loro incongruenza ci ha indotti a scrivere questa nota nella quale abbiamo preso in considerazione i lavori più significativi della biografia medica del compositore e confrontato le diverse opinioni con lo scopo di una possibile reinterpretazione diaagnostico-clinica alla luce delle conoscenze della medicina moderna. Estremamente utili sono stati a questo scopo le informazioni derivanti dalla lettura dei Quaderni di conversazione (2) e soprattutto del ricco Epistolario (3) che egli tenne con i più svariati soggetti della società del suo tempo nonché della accurata descrizione dell'autopsia. Allo stesso tempo vuole essere un omaggio alla sua figura nel momento in cui si avvicina il 250° anno dalla nascita.

### L'epilogo

Il 1° dicembre 1826 Beethoven con il nipote Karl rientrava nottetempo a Vienna dalla residenza del fratello Johann a Gneixendorf, allora sobborgo della città. La carrozza era scoperta, pioveva e faceva freddo. A causa del tempo così inclemente si fermò in una locanda dove passò il resto della notte in una camera non riscaldata; era già febbrile con brivido e sete intensa. Il giorno successivo comparvero in rapida successione tosse, emoftisi, dispnea e dolore all'emitorace destro. Il 5 dicembre il suo ultimo medico Andreas Wawruch (4) diagnosticò un'infiammazione polmonare ed iniziò un trattamento anti-infiammatorio (decotto di erbe, latte di mandorla e liquore di Salep)

con effetto diaforetico seguito da un temporaneo miglioramento tanto che il compositore riprese il progetto di portare a termine l'Oratorio "David e Saul". Otto giorni dopo tuttavia a questi segni di aggiunsero un violento dolore addominale, rigor, oliguria, edema ingraescente, ascite e ittero, a comporre un quadro clinico di estrema gravità.

Il dottor Wawruch nella sua visita descrive un "fegato duro e bernoccoluto". Il 20 dicembre il dottor Johann Seibert eseguì una paracentesi con un drenaggio di 11 litri con grande sollievo del paziente che rivolto al dottor Seibert esclamò "*Professore, lei mi ricorda Mosè che batte la roccia con il suo bastone*" (per far uscire l'acqua). A questa paracentesi ne seguirono altre 3, una il 9 gennaio e due il 2 ed il 27 febbraio con scarso effetto.

Questo complesso quadro clinico tuttavia non giungeva inaspettato poiché nei mesi trascorsi a Gneixendorf nel corso dei quali aveva completato i due ultimi quartetti per archi, il compositore non si sentiva bene a causa di inappetenza, perdita di peso, aumento della sete, diarrea, edemi ai piedi e gonfiore addominale (5).

Testimoni di quelle settimane di inizio dell'anno 1827 descrivono un ambiente squallido e caotico nel quale Beethoven isolato dal mondo a causa della sordità appariva quieto, ma ancora in grado di scrivere e di ricevere visite, forse anche quella di Schubert (6).

Pure mantenendo la mente a tratti ancora vivace, le condizioni del paziente andarono peggiorando: divenne anoressico, emaciato, oligurico con continua perdita di liquido ascitico dalle paracentesi che si complicò con un'infezione da eresipela.

Venne chiamato a consulto il prof. Giovanni Malfatti che al fine di incrementare la diuresi ordinò "the di ginepro e bagni con acqua di cavoli" senza risultato. Prescrisse allora un punch alcoolico con ghiaccio

la bevanda preferita di Beethoven che lo fece dormire una notte intera e provocò una profusa diaforesi. Il giorno seguente sentendosi molto meglio tanto da riprendere la composizione dell'Oratorio, esclamò: *"quale miracolo! I sapienti dottori sono stati sconfitti e io vivo grazie all'abilità di Malfatti"*. Incoraggiato da questo risultato cominciò ad assumere grandi quantità di questa bevanda che dopo poche ore provocò un intensissimo dolore addominale e diarrea. Il dottor Wawruch allora la sossepe permettendo di assumere solo piccole quantità di vino del Reno con lo scopo di stimolare l'appetito senza alcun beneficio.

L'anorexia si aggravò e comparve un respiro stertoroso. Il 24 marzo lucido e in pace acconsentì a ricevere l'Estrema Unzione. Subentrò il coma caratterizzato da una continua agitazione e il 26 marzo 1827 in una giornata di burrasca con grandine, neve, pioggia e lampi, un tuono particolarmente forte lo risvegliò, egli si eresse sul letto agitando il pugno contro la finestra, poi ricadde sui cuscini senza vita, alle ore 6 del pomeriggio all'età di 56 anni.

## L'autopsia

Il giorno successivo nello stesso appartamento del compositore il dottor Johann Wagner eseguì l'autopsia alla presenza del suo assistente Karl von Rokitansky destinato a diventare uno dei fondatori della moderna Anatomia Patologica (questa fu la sua prima di 59.786 autopsie). Redatto in lingua latina il referto di questa autopsia andò perduto e fu ritrovato nel 1970 presso il Museo di Anatomia Patologica di Vienna (7). Noi abbiamo recuperato e tradotto la versione in latino-tedesco e confrontata con la traduzione in inglese di J. Horan contenuta nel lavoro di P.J. Davies (8). Presentiamo qui un riassunto di questo referto.

«*Corpus mortui* di 167 cm di lunghezza appare emaciato con diffuse petecchie di colore nero specie alle estremità; l'addome è disteso e gonfio per la presenza di versamento, la cute stirata.

La cavità toracica e il suo contenuto sono normali.

La cavità addominale è ripiena di 5-6 litri circa di liquido rugginoso. *"Hepar in dimidium suis voluminis reductum"*, il fegato è ridotto a metà del suo volume con aspetto simile al cuoio, duro, di colore grigio-bluastro, con diffuse nodularità sia superficiali che al taglio del parenchima, della grandezza di un fagiolo. Tutti i suoi vasi sono molto ristretti, ispessiti e privi di sangue. La cistifellea contiene un liquido di colore scuro con una grande quantità di sedimento sabbioso. La milza ha un volume doppio del normale, di consistenza dura e al taglio di colore bluastro.

Il pancreas è ingrandito e di consistenza aumentata (*majus et densum*), il dotto escretore permette il passaggio di una penna d'oca. Lo stomaco e l'intestino sono fortemente distesi dall'aria.

Entrambi i reni sono di colore rosso-pallido e all'apertura il parenchima appare ridotto a circa 2,5 cm, coperto da un liquido torbido e scuro che ne impedisce l'osservazione. *"Unusquisque calix concremento calcareo, piso in medio secato aequante, obsessus erat"*, ogni calice risultava ripieno di una concrezione calcarea simile ad un pisello tagliato nel mezzo.

*"Nervi faciei"* erano notevolmente inspessiti mentre quelli acustici apparivano rimpiccioliti *"et sine medulla"*; le rispettive arterie di calibro come una penna d'oca, di consistenza cartilaginea. Il nervo acustico di sinistra molto sottile prendeva origini da tre tenuissime radici di colore grigio, il destro da una radice più consistente di colore biancastro; lo strato superficiale che circonda il quarto ventricolo era di

consistenza aumentata e più vascolarizzata rispetto ai nervi che originavano da esso.

Il cervello era più soffice ed edematoso, le circonvoluzioni apparivano più profonde e numerose del normale. La volta cranica era fortemente e uniformemente compatta dello spessore di circa mezzo inch (1,25 cm).»

In Austria a quel tempo 1 inch era equivalente a 2,63 cm, quindi la volta cranica misurava 1,3 cm di spessore, il doppio del normale (Oiseth S.J.) (9).

### La storia clinica

Quali sono gli eventi patologici accaduti nella vita di Beethoven e quali hanno avuto maggiore attinenza con il quadro clinico finale brevemente descritto nell'epilogo? L'ampia biografia medica che si è accumulata nel secolo scorso esprime interpretazioni assai diverse che obbligano a un confronto e a una valutazione più aggiornata.

Durante l'infanzia Beethoven contrasse probabilmente il vaiolo, frequente a quei tempi, che lasciò le caratteristiche cicatrici al volto.

Nel 1787 la madre Maria Magdalena, alla quale era profondamente affezionato, morì a 41 anni di tubercolosi. In coincidenza con questo evento Beethoven presentò un episodio di depressione associato a una sintomatologia polmonare con asma, febbre e tosse, disturbi che si ripeterono spesso nelle stagioni fredde. Lettera al dr von Schaden, Bonn 15 settembre 1787 “... tutto il tempo tormentato dall'asma e temo che sopravvenga la tisi. A ciò si aggiunga la malinconia che è per me un male grande quanto la mia malattia stessa”. Anche il fratello Kaspar Anton Karl morì di tubercolosi nel 1815 all'età di 41 anni lasciando un figlio, Karl, che fu affidato in adozione al compositore.

Nel mese di novembre 1792 la famiglia Beethoven si trasferì da Bonn a Vienna allo

scopo di permettere al giovane Ludwig di ricevere lezioni da Haydn. Il 18 dicembre successivo il padre Johann morì di cirrosi epatica. Va ricordato che il padre e la nonna paterna erano alcoolisti.

In due lettere agli amici (3), l'insegnante di violino Karl Amenda (Vienna 1° giugno 1801) e l'amico di infanzia Franz Wegeler (Vienna 29 giugno 1801) Beethoven scrive “*sappi che la più nobile parte di me, il mio udito, è molto diminuito; ti prego di non confidarlo a nessuno, chiunque sia*” e ancora “*da tre anni il mio udito è diventato sempre più debole e ciò deve essere accaduto a causa del mio intestino che come tu sai, era anche prima in cattive condizioni ... continuamente afflitto da dissenteria e in conseguenza da straordinaria debolezza ... mi ridussi addirittura alla disperazione ... allora un asino di medico mi consigliò per il mio stato, bagni freddi, un altro più intelligente bagni normali di acqua tiepida del Danubio. Questo ha fatto il miracolo, lo stomaco ha migliorato, il mio udito però è divenuto addirittura peggiore. Questo inverno sono stato in condizioni miserabili.*” Dissenteria, violente coliche addominali e debolezza si ripeterono in modo ricorrente nel corso degli anni successivi.

Nell'autunno 1802 durante un soggiorno a Heiligenstadt, sobborgo di Vienna, Beethoven scrisse il famoso “Testamento” in forma di lettera ai fratelli Karl e Johann ai quali lasciava ogni suo bene. La lettera mai spedita e ritrovata fra le sue carte dopo la morte è probabilmente da riferire alla profonda depressione di quel periodo.

Nel 1804 e nel 1807 soffrì rispettivamente di un accesso ad un dito e alla gola.

In una lettera a Wegeler (Vienna 2 maggio 1810) scrive “*pure sarei felice, forse uno degli uomini felici, se il demonio non avesse stabilito la sua dimora nelle mie orecchie ... oh, com'è bella la vita! Ma per me essa è sempre avvelenata*”.

Tra il 1813 e il 1825 soffrì di episodi di bronchite, reumatismo e ansia; (lettera novembre 1814) “*come sempre pieno di acciacchi*” (2). Le coliche addominali e la diarrea provocavano uno stato disidratazione che lo lasciavano prostrato. Interrogato dal Dr. Wawruch negli ultimi mesi di malattia circa la perdita di sangue dal retto, Beethoven avrebbe risposto in modo affermativo, mentre non vi è traccia di questo segno negli anni precedenti. Indirettamente ciò potrebbe suggerire la sua assenza perché la perdita di sangue dal retto è un evento così preoccupante da essere ricordato. Diarrea e stipsi si alternavano periodicamente provocando anoressia. La sua alimentazione era povera riducendosi a pane, frutta e pochissime proteine animali mentre già da tempo beveva in modo eccessivo e irregolare punch e vino ungherese contenente piombo. L’aggiunta di piombo al vino al fine di migliorarne l’aroma e il gusto era pratica frequente ma illegale e l’intossicazione cronica da piombo fu secondo Stevens et al. (10) la causa più probabile della sordità neurosensoriale.

Nel 1817 la sordità divenne totale. Nel 1821 presentò un episodio di ittero che regredì dopo alcuni mesi e a metà del 1822 venne diagnosticata una forma di “thoracic gout” (pleurodinia).

Un persistente dolore agli occhi tra il 1823 e l’anno successivo costrinse il compositore a ridurre la luce nell’ambiente e a bendare gli occhi durante la notte.

Nel corso del soggiorno a Baden nei mesi maggio-ottobre 1825 presentò diversi episodi di epistassi e emoftisi spontanee e forse di emorragia congiuntivale.

Nello stesso periodo per i soliti disturbi intestinali il dottor Anton Braunhofer prescrisse una dieta con esclusione di alcool, caffè e spezie con notevole miglioramento della sintomatologia. Questo beneficio

deve essere stato assai breve perché nel mese di maggio dello stesso anno da Baden così scrisse al dottor Braunhofer “*non stiamo affatto bene, sempre debole, con il mal di stomaco. Credo che sia finalmente necessaria una medicina più forte che non produca stitichezza e dovrei poter bere vino bianco con acqua dato che la mefitica birra mi dà la nausea! Il mio stato catarrale si manifesta nella seguente maniera: appena sputo vien fuori molto sangue, probabilmente dalla trachea, dal naso ne viene fuori ancora più spesso cosa che è avvenuta continuamente questo inverno. Non c’è dubbio però che lo stomaco è terribilmente indebolito e nel complesso tutto l’organismo.*

**Tabella I - Sintomi e eventi patologici in ordine cronologico presentati da Beethoven nel corso della vita (1770-1827).**

	Probabile vaiolo nell’infanzia. Probabile infezione tubercolare (madre e un fratello morti per TBC).
1787	Febbre, tosse e asma; depressione
1796	Febbre tifoide dopo la quale comparve ipoacusia e tinnitus.
1798	Ipoacusia e tinnitus, sordità profonda nel 1817; ricorrenti episodi di depressione, frequentecefalea.
1801-1807	Infezioni ricorrenti, epigastralgie, stipsi/diarrea; ricorrenti episodi di colica addominale, diarrea e prostrazione. Attacchi di reumatismo e/o gotta (thoracic gout).
1821	Itero durato alcuni mesi.
1823	Dolore oculare con fotofobia.
1825	Emottisi e epistassi spontanee; debolezza.
1826 Sett-Nov	Gonfiore addominale, edemi periferici, inappetenza, perdita di peso, sete (back pain).
1826 - Dicembre	Itero, idropisia (anasarca), oliguria, dolore addominale, dispnea, peritonite batterica spontanea (paracentesi).
1827 - 25 Marzo	Coma.
1827 - 26 Marzo	Morte.

*Per quanto conosco la mia natura, le mie forze potrebbero difficilmente riprendersi da sole*” (3). Nel 1826 in una lettera al dottor Braunhofer il compositore lamentava “*dolore al dorso, non intenso, ma che dimostra che il problema è ancora presente*” ed era tormentato da disturbi reumatici o gotta (Tabella 1). All’amico Karl Holz, 9 settembre 1826 “... sono stanco, per lungo tempo la gioia mi abbandonerà, ogni speranza svanisce!”.

### Diagnosi differenziale

Un naturale esercizio professionale ha indotto molti biografi medici a tentare di ricondurre la complessa sintomatologia sofferta da Beethoven nel corso della vita a un solo quadro patologico. Un più attento approfondimento di questa tuttavia rende problematico tale tentativo e costringe a proporre una interpretazione diagnostica diversa.

L’analisi degli elementi raccolti nella Tabella 1 dicono chiaramente che siamo di fronte a una polipatologia con eziopatogenesi eterogenea comparsa in tempi diversi. Nella Tabella 2 sono elencate le ipotesi diagnostiche “unificanti” che tendono cioè a comporre segni o sintomi in un unico schema diagnostico-clinico formulate da diversi autori.

**Tabella 2 - Ipotesi diagnostiche formulate da vari autori sulla malattia di Beethoven.**

Tubercolosi (5)
Sifilide (11, 14, 15)
Sarcoidosi (6)
Malattia di Whipple (13)
Lupus eritematoso sistematico - LES (12)
Malattia infiammatoria intestinale - IBD (16)
Malattia di Paget dell’osso (17, 19)
Iperparatiroidismo primario (9)
Emocromatosi (15)

Desideriamo commentare soltanto quelle elencate nella tabella 2, che a nostro avviso sembrano avere maggiore fondamento.

#### 1. Tubercolosi

Entrambe in quel tempo in grande espansione epidemiologica definite anche come “grandi simulatrici” perché in grado sotto forma di malattia granulomatosa cronica di colpire ogni organo e apparato.

Quasi certamente Beethoven venne in contatto con la tubercolosi che fu causa di morte della madre e di un fratello ed è significativo ricordare che subito dopo la perdita della madre (1787), egli allora diciassettenne, soffrì di una forma febbrale con asma, tosse e dolore toracico da probabile interessamento pleurico. Sebbene “grande simulatrice” una forma tubercolare difficilmente potrebbe spiegare la accessuale sintomatologia dolorosa addominale sovente di tipo colico. Anche una tubercolosi peritoneale o una forma miliare non sono compatibili con tale sintomatologia. Mentre emottisi e epistassi spontanee comparse nel 1825, due anni prima della morte possono essere spiegate dalla trombocitopenia e dalla alterazione dei fattori della coagulazione della cirrosi epatica già in atto.

#### 2. Sifilide

Quanto alla possibilità di una infezione da sifilide contratta tra il 1814 e il 1816, essa si basa unicamente su una prescrizione di un farmaco contenente mercurio che il dottor Andrea Bertolini attesta essere in possesso di Beethoven (Mc Cabe B.F.) (14). Una neurite del nervo acustico nell’ambito di una meningoencefalite sifilitica secondo questo autore potrebbe essere stata la causa della sordità. Dello stesso avviso sono London S.J. (11) e Donnenberg et al. (15) i quali sostengono

no che la maggiore parte degli elementi della malattia di Beethoven sia attribuibile alla sifilide in stadio avanzato e la sordità a una piaaracnoidite basilare cronica e a una arterite dell'ottavo nervo. Ipotesi difficile da sostenere data l'assenza di altri sintomi riferibili a questa infezione.

### 3. Sarcoidosi

La sarcoidosi è una patologia sistemica di origine sconosciuta caratterizzata dalla presenza di granulomi non caseificanti in diversi organi e apparati. Questa malattia, più frequente in coloro che sono stati esposti alla tubercolosi, potrebbe secondo Palfermann T.G. (6) essere presa in considerazione per interpretare buona parte dei disturbi sofferti dal compositore quali: sintomi polmonari, artralgie, interessamento cutaneo (lupus pernio), oculare (uveite), paralisi dei nervi cranici (nervo acustico), epatite granulomatosa (ma non cirrosi), ipertensione portale, calcolosi renale da ipercalcemia e conseguenti cliche renali.

Una sarcoidosi dell'intestino, oltre che rara, non potrebbe spiegare tuttavia i violenti dolori addominali talvolta in forma di colica e diarrea che hanno rappresentato per tanti anni il leit-motif sintomatologico di Beethoven. La malattia inoltre tende a risolversi entro 2-5 anni ed è causa di morte in meno del 5% dei pazienti, usualmente per fibrosi polmonare, insufficienza renale e o cardiaca.

### 4. Malattia di Whipple

Anche questa malattia come la sarcoidosi è stata presa in considerazione a pieno titolo nella diagnosi differenziale della complessa sintomatologia presentata da Beethoven (Sharma O.P. (13)). Non nota ai suoi tempi, è una forma multisistemica causata dall'actinobatterio *Tropheryma whippelii* che colonizza i macrofagi della

mucosa intestinale, i linfonodi mesenterici e periferici, fegato, cuore, sistema nervoso centrale, a livello oculare, renale, sinoviale, e polmonare. Se non riconosciuta per tempo e non trattata ha un esito fatale.

Sintomi caratteristici di questa forma sono febbre, artralgie e artriti migranti delle piccole e grandi articolazioni che possono precedere la comparsa di diarrea, steatorrea, dolore addominale, malassorbimento e perdita di peso. Beethoven più volte nelle sue lettere descrive la contemporaneità di questi sintomi accompagnati da cefalea. Nel 50% dei casi vi è tosse con interessamento pleurico, frequente è la pancreatite mentre l'interessamento renale sotto forma di glomerulonefrite, nefrite interstiziale e nefrolitiasi è poco frequente. Il raro interessamento epatico e soprattutto la storia naturale della malattia, rendono improbabile questa diagnosi.

### 5. Lupus eritematoso sistemico - LES

La possibilità di una malattia sistemica del connettivo su base autoimmune suggerita da Larkin E. (12) caratterizzata da una sintomatologia proteiforme e dalla produzione di auto-anticorpi antinucleo può comprendere effettivamente molti elementi della storia clinica di Beethoven: disturbi reumatici, spesso associati a tosse e dolore toracico di tipo pleurico, addominali da vasculite intestinale, oculari, pancreatite, epatite cronica, alterazioni renali sotto forma di glomerulonefrite, trombocitopenia, splenomegalia e le cicatrici (lupus) cutanee del viso che rendevano assai brutto il suo aspetto.

L'autore conclude che possa avere sofferto di una forma acuta di LES all'età di 16 o 26 anni. Per quanto suggestiva, questa ipotesi diagnostica incontra alcune obiezioni. La rarità del LES nell'uomo (9:1 casi in favore della donna), il non interessamento renale comparso soltanto nell'ultima fase

e soprattutto la cirrosi epatica con ipertensione portale, ascite e splenomegalia, causa della morte, rendono poco probabile questa malattia se intesa come responsabile di tutto il quadro clinico.

#### *6. Malattia infiammatoria intestinale - IBD*

L'associazione di dolore addominale, diarrea-dissenteria e sintomi articolari ha caratterizzato per molti anni la storia clinica di Beethoven ed è ben noto che questa associazione è frequente sia nella malattia di Crohn sia nella rettocolite ulcerosa. La presentazione clinica può variare dalle semplici artralgie periferiche a artriti mono o poliarticolari spesso a carattere migrante, spondilite anchilosante, sacroileite e infiammazione oculare.

La presenza contemporanea di sintomi intestinali e articolari così come desunta dall'Epistolario sembra fortemente indicativa per una forma di IBD (16). Tuttavia la mancanza di una descrizione dell'aspetto delle feci e il riscontro autoptico rendono problematica questa conclusione. Il dr. Wagner descrive un "intestino disteso da gas" (nel IBD è ispessito, rigido e poco distendibile), ma questo non venne aperto e alla osservazione esterna non vengono descritte lesioni organiche quali fibrosi, stenosi, aderenze o perforazioni. L'assenza di queste e la denuncia di Beethoven di una alternanza di periodi di diarrea e di stipsi può suggerire una più probabile diagnosi di sindrome del colon irritabile (IB Syndrome).

#### *7. Malattia di Paget dell'osso*

Una malattia di Paget dell'osso, caratterizzata da un rimodellamento patologico di vaste aree dello scheletro a eziologia tuttora sconosciuta (genetica, virale?), è stata suggerita da Naiken V.S. (17) come possibile causa della frequente cefalea e soprattutto della sordità progressiva in rapporto alla

compressione ossea del nervo acustico a livello del meato e alla calcificazione della catena degli ossicini (Sorsby M. (18)). Secondo questi autori inoltre una nefrolitiasi indotta dalla ipercalcemia secondaria alla malattia di Paget potrebbe spiegare i frequenti dolori addominali e il dolore al fianco in rapporto a episodi di colica renale.

La fisiognomica del compositore infine ricavata dai suoi ritratti e dalla ricostruzione del cranio dopo la prima esumazione nel 1868 (Meredith W.) (19) può accordarsi con tale ipotesi diagnostica: il massiccio facciale ampio e prominente con ossa zigomatiche pronunciate conferivano un aspetto leonino tipico della m. di Paget.

La diagnosi di malattia di Paget con associato iperparatiroidismo è fortemente sostenuta da Oiseth S.J. (9) nella sua rivisitazione dell'autopsia sulla base del riscontro di una volta cranica compatta e di spessore doppio della norma e della nefrolitiasi.

Senza escludere del tutto questa ipotesi, va ricordato che la malattia di Paget è rara prima dei 50 anni mentre la sordità è iniziata a 26-27 anni, inoltre non può spiegare la lunga storia di dolore addominale, diarrea e stipsi, la epatopatia e la pancreatite.

#### *8. Iperparatiroidismo*

Il quadro clinico dell'iperparatiroidismo in alcuni pazienti può presentarsi con segni e sintomi multipli. Nell'eccellente lavoro di Kubba e Young (16), Hofbauer e Heufelder prendono in considerazione una forma di iperparatiroidismo primario quale possibile causa della cronica sintomatologia addominale, disturbi reumatici, nefrolitiasi, depressione e perdita dell'udito. Assumendo questa come diagnosi principale, il dolore addominale potrebbe essere attribuito a una ulcera peptica o a episodi di pancreatite acuta aggravata dall'abuso di alcool, i disturbi reumatici a alterazioni muscoloscheletriche quali osteite fibrosa cistica,

gotta o pseudogotta, mentre l'ipercalcemia potrebbe spiegare i disturbi emozionali, la depressione, l'affaticamento e la possibile nefrolitiasi riscontrata all'autopsia. Un cronico iperparatiroidismo primario oltre che comprendere la sintomatologia sopra riportata può accompagnarsi a una perdita irreversibile dell'udito su base neurosensoriale e trasmissiva da calcificazione degli ossicini.

Per quanto affascinante in questa ipotesi diagnostica non trovano spazio la sintomatologia polmonare e soprattutto l'epatopatia cronica esitata in cirrosi macronodulare.

### 9. Emocromatosi

Ripetute segnalazioni sulla pigmentazione scura di Beethoven permettono di prendere in considerazione una possibile emocromatosi. Nel corso di un viaggio a Mergentheim all'età di 21 anni gli amici si rivolgevano a lui chiamandolo "spagnolo" a causa della sua "dark appearance".

L'emocromatosi è una frequente malattia ereditaria caratterizzata da un aumentato riassorbimento intestinale di ferro e aumentato deposito nelle cellule parenchimali di organi e tessuti con danno funzionale. La malattia causata dal gene mutante HFE legato al locus HLA-A del cromosoma 6p è più frequente nell'uomo e nelle popolazioni nordiche. Nella forma omozigote le manifestazioni cliniche principali sono cirrosi epatica, diabete, artriti, cardiomiospatia e ipogonadismo ipogonadotropico. La malattia nel 70% dei casi si manifesta clinicamente tra i 40 e i 60 anni, raramente prima dei 20 ed è accelerata e aggravata dall'abitudine all'alcool.

Benché buona parte del quadro clinico di Beethoven adulto compresa la pancreatite cronica possa essere compatibile con quello della emocromatosi, rimangono molte incertezze e il quesito resta aperto.

Né il dottor Wawruch né il dottor Wagner fanno cenno alla "dark appearance" di Beethoven (la malattia non nota al tempo fu descritta da von Recklinghausen nel 1889) e il riconoscimento di una forma eterozigote nei familiari non è clinicamente possibile perché quasi sempre asintomatica. Allo stesso tempo non può essere esclusa una emocromatosi secondaria alla cirrosi epatica post-alcoolica sicuramente presente nel compositore.

### Commento e epicrisi

Abbiamo fin qui brevemente esposto le principali ipotesi diagnostiche formulate da diversi autori volte a interpretare in modo unitario la sintomatologia di Beethoven e commentato come nessuna di queste sia del tutto esauriente allo scopo. Siamo costretti perciò adottando l'inverso del principio di Occam, a pensare in modo più articolato e a considerare la sintomatologia del compositore come dovuta non una singola malattia ma a patologie diverse comparse in età diverse della sua vita a comporre un quadro clinico estremamente complesso.

I risultati dell'esame autoptico sono illuminanti per chiarire buona parte del quadro clinico finale mentre la variegata sintomatologia dell'anamnesi patologica remota si presta a interpretazioni non univoche e giustifica quindi le diverse opinioni espresse al riguardo.

La *Tabella 3* illustra la epicrisi degli autori ricavata dai documenti storici (Epistolario, Quaderni di conversazione, autopsia) e dal confronto con la biografia medica esistente.

La patologia principale e causa della morte è stata certamente la cirrosi epatica scompensata associata come fatto terminale a una peritonite batterica spontanea secondaria alle ripetute paracentesi men-

**Tabella 3 - Epicrisi degli autori.**

Patologia principale e causa della morte	Insufficienza epatica acuta in cronica in paziente con cirrosi epatica scompensata (ipertensione portale, ascite, splenomegalia) macronodulare a probabile eziologia mista (epatitica-alcoolica) Peritonite batterica spontanea; eresipela
Patologie associate	Pancreatite cronica Calcolosi della colecisti Probabile diabete Bronchite cronica asmatiforme Colon irritabile (IB Syndrome) Sindrome reumatologica di n.d.d. Pielonefrite cronica, nefrolitiasi, idropionefrosi Possibile m. di Paget dell'osso Emocromatosi? Etilismo Depressione

tre le diffuse petecchie sono da riferire alla piastrinopenia. L'aspetto macronodulare, "noduli grandi come un fagiolo" orienta verso una forma post-epatitica/alcoolica. Questo ultimo aspetto necessita un approfondimento.

Beethoven indulgeva all'alcool, punch e vino, in modo irregolare già prima del 1812 forse come reazione alla ipoacusia già avanzata, alla ricorrente depressione o favorita da un background genetico tenendo conto che sia il padre sia la nonna paterna erano stati alcoolisti (Walters et al. (20)). Dai registri della spesa risulta che egli consumava da uno a tre litri di vino al dì (Krehbiel H.E. (21)) al quale era aggiunto secondo una pratica diffusa ma illegale del piombo per migliorarne l'aroma ed il gusto. Attorno al 1822 l'abitudine all'alcool divenne marcata e contemporaneamente si manifestò un comportamento bizzarro, con scatti d'ira e trascuratezza della persona mentre il rapporto con i medici curanti si deteriorava.

Talvolta girava per la città imprecando contro i nobili e la casa regnante, mal vestito e oggetto di derisione da parte dei monelli di strada; una volta venne arrestato da un commissario di polizia per compor-

tamento disturbante. Aspetti che possiamo attribuire a episodi di ubriachezza o a un disagio (turbamento) emotivo favorito dall'assunzione di alcool.

Abbiamo già accennato all'episodio di ittero comparso nel 1821 accompagnato da dolore e vomito, regredito dopo alcuni mesi, che certamente assume un rilievo significativo nella storia evolutiva dell'epatopatia che può essere ascritto a una epatite alcoolica, a una colica biliare o a un attacco di pancreatite.

Tra le possibili cause della cirrosi deve essere infine annoverata la epatite lupoide, modernamente definita epatite cronica attiva (CAH), una forma su base autoimmune che se non trattata esita spesso in cirrosi macronodulare ed è associata a manifestazioni extra epatiche quali dolori addominali, diarrea sanguinolenta, colite ulcerosa, artralgie e artriti, eritema nodoso, pleurite e pericardite. Senza escludere del tutto questa ipotesi, va tenuto presente che alcune di queste manifestazioni sono comparse molto prima dei segni di epatopatia e in ogni caso non spiega la violenta sintomatologia intestinale. L'assenza dell'esame istologico del fegato non permette una diagnosi certa mentre il nostro orientamento conclusivo è

per una forma di cirrosi a eziologia prevalentemente epatitico-alcoolica.

La pancreatite cronica accertata all'autopsia ha avuto a nostro avviso un rilievo clinico centrale nella lunga e complessa sintomatologia addominale di Beethoven. Siamo propensi a interpretare le violenti coliche addominali accompagnate da diarrea-steatorrea seguite da uno stato di prostrazione a pancreatiti ricorrenti probabilmente indotte da episodi di etilismo acuto. D'altra parte l'associazione di etilismo acuto, dolore colico e diarrea è quasi patognomonica di pancreatite. Non è da escludere tuttavia che almeno in parte questa sintomatologia possa essere legata anche alla cronica intossicazione da piombo.

Il dolore addominale e l'alternanza di diarrea e stipsi denunciate più volte nell'Epistolario inducono a considerare la coesistenza di una malattia infiammatoria intestinale (IBD), una m. di Crohn secondo Kubba e Young (16) non confermata dall'autopsia, una sindrome del colon irritabile (IBSyndrome) secondo il nostro parere, tenendo presente le caratteristiche cliniche, la difficile giovinezza di Beethoven, le forti tensioni emotive degli anni successivi e il miglioramento della sintomatologia con la dieta priva di alcool, caffè e spezie suggerita dal dottor Braunhofer.

Coesiste diabete? Vi sono molti elementi per questa diagnosi. La polidipsia, la perdita di peso, la facilità alle infezioni degli ultimi mesi sono caratteristici di questa condizione che è fortemente corroborata dal riscontro di pancreatite cronica all'autopsia. Manca il test di un eventuale sapore dolce delle urine perché a quel tempo i medici in ambito tedesco non gradivano eseguire questa prova.

Come già accennato, nella storia clinica di Beethoven è presente una sintomatologia polmonare cronica esordita all'età di 17

anni con febbre, tosse e asma, sintomi che si ripetevano ad ogni inverno negli anni successivi. Questi elementi unitamente al riscontro nella visita del dr. Wawruch di un torace enfisematoso rendono probabile la diagnosi di bronchite cronica asmatiforme.

Nel 1825 due anni prima della morte, in una lettera al dr. Braunhofer il compositore descrive uno stato catarrale con emottisi e epistassi spontanee riconducibili con ogni probabilità alla trombocitopenia e alle alterazioni dei fattori della coagulazione della cirrosi già in atto.

Reni con diffusi ascessi corticali e perirenali, di volume ridotto, di colore rosso pallido e al taglio parenchima atrofico descritti dal dott. Wagner all'autopsia costituiscono un quadro compatibile con gli esiti di una pielonefrite cronica mentre la descrizione autoptica "*unus quisque calix concremento calcareo, piso in medio secato equante, obcessus erat*" "ogni calice risultava ripieno di una concrezione calcarea simile ad un pisello tagliato nel mezzo" si presta a diverse interpretazioni: secondo Davies P.J. (8) una necrosi papillare acuta, evento frequente nel diabete, più probabilmente una massiva nefrolitosi secondo Geller S.A. e de Campos F.P.F. (22) e Oiseth S.J. (9). Il dolore al fianco e all'addome la febbre e i brividi, sintomi spesso presenti negli ultimi mesi di vita potrebbero essere compatibili con entrambe queste forme. In mancanza di una diagnosi certa di diabete e la presenza di calcolosi (calcoli di urato?) nella pelvi renale preferiamo una diagnosi di pielonefrite cronica secondaria a idronefrosi da calcolosi.

L'aspetto più difficile da interpretare a nostro avviso riguarda la sintomatologia reumatologica che Beethoven in molte lettere afferma presentarsi contemporaneamente ai disturbi addominali. Escludendo una forma di Inflammatory Bowel Disease (IBD) di cui non vi è traccia all'autopsia,

questo binomio sintomatologico potrebbe essere inquadrato in una artropatia enteropatica, una forma di artrite reattiva chiamata in passato sindrome di Reiter, che compare più frequentemente in soggetti giovani portatori dell'antigene HLA - B27. In questa malattia la sintomatologia reumatologica, estremamente variegata, accompagnata da sintomi sistemici quali malessere, affaticamento e febbre, compare a seguito di un'infezione intestinale con diarrea che può essere causata da numerosi batteri, virus e parassiti.

Un ultimo aspetto mai trattato nelle precedenti biografie mediche di Beethoven riguarda l'abitudine all'alcool e la depressione. Il padre e la nonna paterna erano stati alcolisti, la madre soffriva di depressione. Beethoven presentò nel corso della vita numerosi episodi depressivi il primo dei quali a 17 anni alla morte della madre, un altro particolarmente grave nel 1802 in rapporto all'ipoacusia già progredita che lo portò alla disperazione e al proposito suicidario bene espresso nel testamento di Heiligenstadt. La dipendenza dall'alcol è largamente su base genetica e tende ad associarsi alla comparsa di disturbi psichiatrici principalmente la depressione. Il recente lavoro di Walters et al. (20) può rappresentare un'autorevole conferma di questo assunto.

### Conclusione

Una diagnosi retrospettiva a distanza di quasi due secoli impone una naturale prudenza, tuttavia l'ampia analisi dei documenti storici e delle biografie mediche di Beethoven esaminate nella nostra indagine permette di suggerire le seguenti considerazioni conclusive.

Al di là dei vari tentativi fatti in passato di comprendere in un'unica diagnosi tutta la sintomatologia presentata da Beethoven,

crediamo che essa possa essere inquadrata in una polipatologia caratterizzata da affezioni diverse comparse in periodi diversi della vita.

Bronchite cronica, colon irritabile (IB Syndrome) e sindrome reumatologica di n.d.d. costituiscono il nucleo che ha caratterizzato gli anni giovanili e dell'età adulta, mentre le patologie più gravi quali la cirrosi epatica, la pancreatite cronica, la pielonefrite e nefrolitosi si sono clinicamente aggravate negli anni più tardivi. La causa principale della morte è stata la cirrosi epatica legata probabilmente alla dipendenza dall'alcool su possibile base genetica.

Nonostante le numerose e croniche affezioni Beethoven mantenne fino a pochi mesi dalla morte una brillante creatività grazie alla forza d'animo e alla ferrea disciplina che imponevano, come nelle giornate del suo conterraneo I. Kant, a partire dalle cinque del mattino fino all'ora di pranzo lunghe ore di lavoro, seguite da una solitaria passeggiata fonte di nuove ispirazioni.

### Omaggio al dr. A. Wawruch (1773-1842)

Andreas Ignaz Wawruch nato a Niemczicz (Moravia) si era laureato all'Università di Praga e aveva completato la sua preparazione scientifica all'Università di Vienna dove nel 1829 divenne direttore della Clinica Medica. Eccellente violoncellista, fu l'ultimo della lunga serie di medici che ebbero in cura Beethoven. Per motivi che non conosciamo Beethoven lo detestava come pure il suo assistente Schindler e la piccola corte attorno al compositore. Quando egli giungeva per la visita il paziente esclamava "ecco, è arrivato l'asino" e voltava la testa dall'altra parte.

Wawruch non si lasciò impressionare da questa avversione e continuò a trattare

il paziente con gentilezza, incoraggiamenti e grande professionalità. La stessa che, pochi giorni dopo la morte di Beethoven al fine di mantenere viva la memoria dei fatti appena accaduti, dimostrò mettendo mano a un completo resoconto della malattia finale. Ancora oggi chi desidera studiare dal punto di vista medico la vicenda di Beethoven non può prescindere da questa testimonianza (4).

**Ringraziamento:** Un sentito ringraziamento al Prof. E. Manzato dell'Università di Padova per i preziosi suggerimenti e la revisione del manoscritto.

## Bibliografia

1. Wegeler F, Ries F. Remembering Beethoven. London: Andrew Deutsch 1988.
2. Quaderni di conversazione di Beethoven a cura di Luigi Magnani Ricciardi editore 1962
3. Epistolario di Beethoven a cura di Nicolò Di Fede Cappelli editore 1971.
4. Wawruch A. Aertliche Rucklick auf Ludwig van Beethoven letzte Lebensepoche. Wiener Zeitschrift 30 April 1842.
5. Forbes E. ed Thayer's Life of Beethoven. Princeton, New Jersey, Princeton University Press. 1973; 1973-10013.
6. Palferman TG. Classical notes: Beethoven's medical history, a variation on a rheumatological theme. J.R. Soc Med. 1990; 83: 640-645.
7. Bankl H, Jesserer H. Die Krankheiten Ludwig van Beethovens. Mitteilungen des Pathologisch-Anatomischen Bundesmuseums in Wien. 1986; 1: 5-12.
8. Davies PJ. Beethoven's Nephropathy and death: discussion paper JR Soc Med. 1993; 86: 159-161.
9. Oiseth SJ. Beethoven's autopsy revised: A pathologist sound a final note Journal of Medical Biography. 2017; 0: 1-9.
10. Stevens MH, Jacobsen T, Crofts AK. Lead and deafness od Ludwig van Beethoven Laryngoscope. 2013; 123: 2854-2858.
11. London SJ. Beethoven: case report of a titan's last crisis. Arch Intern Med. 1964; 113: 442-448.
12. Larkin E. Beethoven's Illness - a Likely Diagnosis Proc Roy Soc Med. 1971; 64: 493-496.
13. Sharma O. P. Beethoven's illness: Whipple disease rather than sarcoidosis? J.R Soc Med. 1994; 87: 283-285.
14. McCabe BF Beethoven' deafness. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1958; 67: 192-206.
15. Donnenberg MS, Collins MT, Benitez RM, Makowski PA. The Sound That Failed Am J. Med. 2000; 108: 475-480.
16. Kubba AK, Young M. Ludwig van Beethoven: a medical biography Lancet. 1996; 347: 995-999.
17. Naiken VS. Did Beethoven have Paget's disease of bone? Ann. Intern. Med. 1971; 74: 995-999.
18. Sorsby M. Beethoven's deafness J. Laryngol Otol. 1930; 45: 529-544.
19. Meredith W. The History of Beethoven's Skull Fragments. Part One. The Beethoven Journal. 2005; 20: 1-25.
20. Walters RK, Polimanti R, et al. Agrawal A. Transancestral GWAS of alcohol dependence reveals common genetic underpinnings with psychiatric disorders. Nature Neuroscience. 2018; 21: 1656-1669,
21. Krehbiel HR. Beethoven and his biographer Alexander Wheelock Thayer. In: Krehbiel HE (ed.) Music and manners in the classical period (Ed. 2), 1<sup>st</sup> ed. Portland, ME: Longwood Press. 1976; [1968], 190-211.
22. Geller SA, de Campos F.P.F. Renal papillary necrosis. Autopsy and Case Reports. 2013; 3: 69-71.

**NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI****ESC 2019**

*Nei giorni dal 31 agosto al 4 settembre 2019 si è tenuto a Parigi il meeting annuale dell'European Society of Cardiology (ESC). Tra gli argomenti discussi durante il congresso, i più recenti risultati dai trial clinici sugli inibitori SGLT2 e sugli anticoagulanti.*

**Nuove linee guida EAS/ESC per la gestione delle dislipidemie**

Le nuove linee guida per la gestione delle dislipidemie, prodotte congiuntamente dall'European Society of Cardiology (ESC) e dall'European Atherosclerosis Society (EAS), sono state pubblicate il 31 agosto scorso e presentate durante il Congresso ESC. Esse forniscono nuove importanti raccomandazioni sulla gestione dei pazienti, che dovrebbero consentire ai clinici di ridurre in modo efficiente e sicuro il rischio CV attraverso la modifica dei lipidi. Le nuove linee guida ribadiscono il concetto "the lower, the better" relativamente all'approccio ipocolesterolemizzante, e il ruolo della riduzione assoluta del colesterolo LDL nel determinare il beneficio clinico. Le evidenze dagli studi di randomizzazione mendeliana sono state fondamentali nel guidare un cambio di prospettiva a favore di un trattamento precoce, che può significare una terapia meno intensiva a lungo termine.

Con i nuovi obiettivi di LDL-C, più stringenti, si sottolinea l'importanza della terapia di combinazione in pazienti ad alto e altissimo rischio, prima con ezetimibe e poi con un inibitore del PCSK9. I prossimi passi fon-

damentali sono l'implementazione appropriata di queste raccomandazioni da parte dei clinici nella loro pratica quotidiana, insieme all'attenzione per garantire l'aderenza al trattamento da parte dei pazienti.

**Nuove linee guida ESC/EASD per la gestione e la prevenzione delle malattie CV nei pazienti con diabète o prediabète**

Dalla pubblicazione delle precedente versione delle linee guida nel 2013, sono stati completati e pubblicati trial clinici fondamentali in ambito di prevenzione cardiovascolare primaria e secondaria dei pazienti con diabète. Le linee guida incorporano i risultati emersi dagli studi appositamente disegnati per rilevare gli eventi cardiovascolari con gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT-2) - studio EMPA-REG OUTCOME con empagliflozin, CANVAS con canagliflozin e DECLARERMI 58 con dapagliflozin – e sugli agonisti del recettore del glucagon-like peptide 1 (GLP-1) – in particolare lo studio LEADER su liraglutide, SUSTAIN-6 con semaglutide, Harmony Outcomes con albiglutide, REWIND con dulaglutide, PIONEER 6 con semaglutide e CREDENCE con

canagliflozin. Un punto cruciale è la riclassificazione del rischio cardiovascolare nei pazienti con diabete in base alle comorbilità e alla durata della malattia. Le evidenze cliniche suggeriscono con forza che SGLT-2 inibitori e GLP-1 agonisti dovrebbero essere raccomandati come trattamento di prima linea nei pazienti con diabete di tipo 2 e CVD prevalente o rischio CV elevato/molto elevato, come quelli con danno d'organo o diversi fattori di rischio CV, sia che siano naïve al trattamento o che stiano già assumendo metformina.

I risultati del trial ASCEND con aspirina nei diabetici con rischio cardiovascolare moderato hanno portato alla raccomandazione di usare il farmaco (75-100 mg/die) per la prevenzione primaria solo nei soggetti a rischio alto/molto alto, ma non in quelli con rischio moderato. Lo studio COMPASS sull'anticoagulante orale rivaroxaban più aspirina in pazienti con malattia coronarica stabile ha portato a raccomandare l'impiego della duplice terapia antiplastrinica per la prevenzione a lungo termine della malattia cardiovascolare.

Il documento raccomanda inoltre obiettivi di colesterolo LDL inferiori a 2,5 mmol/l, 1,8 mmol/l e 1,4 mmol/l nei soggetti con diabete di tipo 2 rispettivamente a rischio cardiovascolare medio, alto e molto alto. E' inoltre raccomandato l'automonitoraggio della glicemia e della pressione sanguigna per ottenere un migliore controllo glicemico.

#### **Dapagliflozin, terapia promettente per l'insufficienza cardiaca anche in soggetti non diabetici: il trial DAPA-HF**

DAPA-HF è il primo studio clinico sugli esiti dello scompenso cardiaco nel quale si è utilizzato un inibitore di SGLT2, dapagliflozin, in pazienti con ridotta frazione di eiezione (HFrEF), con e senza diabete di

tipo 2 (DMT2). Dapagliflozin è attualmente approvato, da solo o in associazione, per il controllo glicemico in pazienti adulti affetti da DMT2. Il razionale del trial si basa su due diversi dati di fatto. Il primo è che gli inibitori di SGLT2 prevengono lo sviluppo dello scompenso cardiaco nei pazienti con DMT2, il secondo che i benefici del trattamento con questi farmaci possono essere indipendenti dal controllo glicemico.

L'analisi dei dati ha evidenziato che dapagliflozin, in aggiunta allo standard di cura, ha ridotto in modo significativo, del 26% (HR 0,74; p < 0,0001), il rischio di andare incontro a uno degli eventi inseriti nell'*end point* primario (combinazione dei decessi per cause cardiovascolari e dei casi di peggioramento dello scompenso cardiaco) rispetto al placebo. I dati hanno mostrato un beneficio del trattamento anche per ognuno dei singoli componenti dell'*end point* combinato, con una riduzione significativa, pari al 30% (p<0,00003), del rischio di peggioramento dello scompenso cardiaco e una riduzione del 18% (p<0,029) del rischio di decesso per cause cardiovascolari.

#### **Ticagrelor più aspirina riducono gli eventi ischemici in pazienti coronarici stabili con diabète: il trial THEMIS**

Lo studio THEMIS ha esaminato se l'aggiunta del farmaco antiaggregante piastrinico all'aspirina riduce il rischio di eventi trombotici in pazienti con arteriopatia coronarica stabile e diabète. Ha arruolato 19.220 pazienti in 1315 siti in 42 Paesi. L'*outcome* primario di efficacia era un composito di morte cardiovascolare, infarto o ictus, quello di sicurezza il sanguinamento maggiore da trombolisi nell'infarto miocardico (TIMI). L'incidenza dell'*outcome* primario di efficacia è risultato inferiore nel gruppo ticagrelor rispetto al gruppo place-

bo (7,7% contro 8,5%; hazard ratio [HR] 0,90; IC 95% 0,81-0,99; p = 0,038). L'incidenza di sanguinamento maggiore da TIMI era più elevata nel gruppo ticagrelor rispetto al gruppo placebo (2,2% contro 1,0%; FC 2,32; IC 95% 1,82-2,94; p<0,001).

I pazienti che maggiormente potrebbero trarre beneficio da ticagrelor e aspirina sono i pazienti ad alto rischio ischemico, ma a basso rischio di sanguinamento. In particolare, coloro che hanno precedentemente tollerato la doppia terapia antiplastrinica senza complicanze emorragiche sembrano essere i migliori candidati per una terapia prolungata con ticagrelor e aspirina.

### **Prasugrel meglio di Ticagrelor in pazienti dopo sindrome coronarica acuta**

Secondo le attuali linee guida di pratica clinica, prasugrel e ticagrelor hanno pari raccomandazioni di Classe I per l'uso dopo l'intervento coronarico percutaneo (PCI) nelle sindromi coronarie acute (ACS), con e senza elevazione del segmento ST.

In uno studio di confronto diretto multicentrico in aperto, che ha arruolato pazienti ammessi per ACS e ha pianificato una strategia invasiva da 23 centri in Germania e Italia, i pazienti randomizzati a ticagrelor hanno ricevuto una dose di carico il più presto possibile dopo la randomizzazione e prima dell'angiografia coronarica. L'*end point* primario era un composto di morte, infarto del miocardio (IM) o ictus entro 12 mesi dalla randomizzazione. Gli end point secondari includevano i singoli componenti del composito, sanguinamento e trombosi dello stent. Il composito di morte, infarto miocardico o ictus a 12 mesi era più alto con ticagrelor rispetto a prasugrel (9,3% vs 6,9%; HR 1,36; IC 95% 1,09–1,70; p = 0,006). La differenza tra gli effetti dei due trattamenti sull'*endpoint* primario è stata princi-

palmente determinata dai tassi di IM, che erano del 4,8% con ticagrelor e del 3,0% con prasugrel (HR 1,63; IC 95% 1,18-2,25). Non vi erano differenze significative tra ticagrelor e prasugrel nei tassi di mortalità complessiva e ictus.

### **Utilità della misurazione della troponina cardiaca T ad alta sensibilità**

HiSTORIC (High-Sensitivity Cardiac Troponin On Presentation to Rule Out Myocardial Infarction) è il primo studio randomizzato controllato per valutare l'efficacia e la sicurezza dell'implementazione della misurazione della troponina cardiaca T ad alta sensibilità nei pazienti infartuati. In breve, i pazienti con un valore di tropo-nina alla presentazione inferiore a 5 ng/L (che ha un valore predittivo negativo del 99,5% per escludere un IM) potevano essere rimandati a casa, ad eccezione di chi si presentava in fase precoce e che veniva ritestato dopo 3 ore. I pazienti con un valore superiore al 99° percentile specifico per genere alla presentazione erano ammessi per ulteriori valutazioni. I pazienti "intermedi" con valori compresi tra 5 ng/L e il 99° percentile venivano ritestati dopo 3 ore e, a quel punto, quelli con una piccola variazione della troponina potevano essere rimandati a casa, mentre i soggetti con una variazione di almeno 3 ng/L erano ammessi per ulteriori approfondimenti. Nel complesso, lo studio ha incluso 14.700 pazienti, dimostrando che l'approccio ha ridotto il tempo nel pronto soccorso e ha determinato l'invio a casa di più pazienti, senza aumentare l'occorrenza di infarto del miocardio o morte cardiaca a un anno.

Nel trial RAPID-TNT, studio di non inferi-  
orità rispetto al metodo tradizionale di 0/3 ore, che ha incluso 3378 soggetti con sospe-  
cta sindrome coronarica acuta (ACS), il  
ricorso a un protocollo di 0/1 ore (0/1-hour

protocol) usando la troponina cardiaca T ad alta sensibilità (hs-cTnT) nei pazienti con dolore toracico che si presentano al pronto soccorso non ha aumentato il rischio di morte o infarto miocardico (IM) a 30 giorni rispetto ai test standard. Un numero maggiore di pazienti trattati con lo 0/1 hour protocol sono stati dimessi dal pronto soccorso, mentre la durata mediana della permanenza nel dipartimento di emergenza è stata ridotta di 1,0 ore nei bracci da 0/1 ora. Inoltre, un numero inferiore di pazienti è stato indirizzato a ecocardiogrammi da stress o test funzionali nel gruppo 0/1 ore.

#### **Il cancro supera le CVD come causa di morte in alcuni Paesi ad alto reddito**

Le malattie cardiovascolari (CV) rimangono la principale causa di morte in tutto il mondo, ma il cancro ha ormai superato le malattie cardiache in Canada, Svezia, Arabia Saudita ed Emirati Arabi Uniti, i quattro paesi ad alto reddito inclusi come parte dello studio PURE (Prospective Urban Rural Epidemiology). Lo studio ha mostrato che a livello globale, il 40% e il 26% di tutti i decessi erano attribuibili rispettivamente a malattie CV e cancro. Malattie respiratorie, lesioni e infezioni erano le altre principali cause di morte. Nei paesi ad alto reddito, tuttavia, il 23% dei decessi era dovuto a malattie CV rispetto al 55% dei decessi per cancro. Nei paesi a medio e basso reddito, le malattie CV erano la principale causa di mortalità, responsabile rispettivamente del 42% e del 43% di tutti i decessi. Le morti per cancro sono diventate relativamente più frequenti, non perché sia aumentato il tasso di mortalità per tumore, ma perché è stato ridotto il tasso di mortalità per malattie CV. Lo studio ha inoltre posto l'attenzione su alcuni fattori di rischio CV emergenti, come la dieta, l'inquinamento ambientale e l'accesso ai servizi sanitari.

#### **PARAGON-HF: la combinazione sacubitril/valsartan non raggiunge l'end point primario ma sembra efficace in alcuni sottogruppi**

L'associazione sacubitril/valsartan non ha centrato l'end point primario dello studio PARAGON-HF, ovvero la riduzione dei ricoveri per scompenso cardiaco e della mortalità per cause cardiovascolari nei pazienti con scompenso cardiaco, con frazione di eiezione conservata. I dati tuttavia suggeriscono che il trattamento potrebbe migliorare gli *outcome* in alcuni sottogruppi di pazienti. Lo studio PARAGON-HF è un trial multicentrico internazionale che ha coinvolto in totale 4.822 pazienti di almeno 50 anni, randomizzati al trattamento con sacubitril/valsartan o con il solo valsartan. La combinazione sacubitril/valsartan, inibisce simultaneamente il sistema renina-angiotensina e blocca la scissione dei peptidi natriuretici prodotti nell'organismo. In quasi 3 anni di follow-up mediano, l'incidenza dell'end point primario è risultata pari a 12,8 per 100 anni-paziente con l'associazione, rispetto a 14,6 per 100 anni-paziente con il solo sartano (rate ratio 0,87; IC 95% 0,75–1,01; p = 0,059).

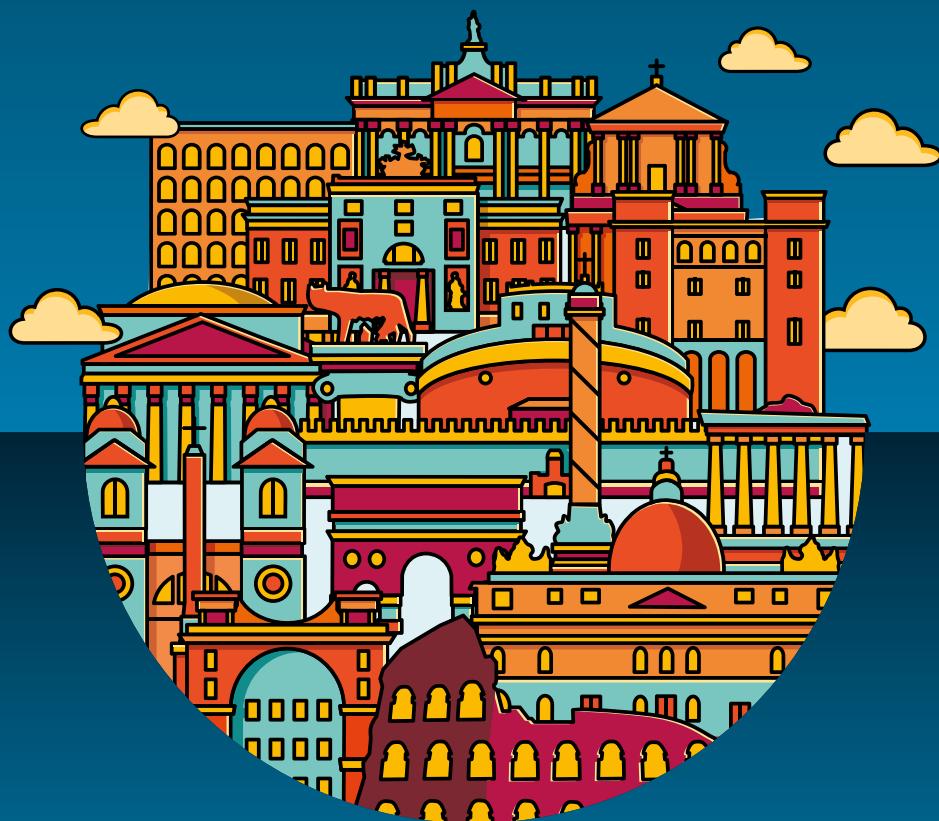
I risultati relativi agli *end point* secondari suggeriscono che i pazienti trattati con sacubitril/valsartan hanno maggiori probabilità di ottenere un miglioramento della classe NYHA (15% contro 12,6%) e della qualità della vita e minori probabilità di avere un peggioramento della funzione renale (1,4% contro 2,7%) rispetto ai controlli. In particolare, si è osservato un vantaggio dell'associazione rispetto alla monoterapia nei pazienti con frazione di eiezione inferiore alla mediana del 57%, con una riduzione dell'end point primario del 22% (rate ratio 0,78; IC 95% 0,64–0,95) e nelle donne, con una riduzione del 28% (ratio rate 0,73; IC 95% 0,59–0,90).



SOCIETA' ITALIANA  
PER LO STUDIO  
DELL'ATEROSCLEROSI

# 33° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A.

## ROMA, 24/26 NOVEMBRE 2019



### SEDE CONGRESSUALE

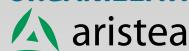
NH Vittorio Veneto  
Corso d'Italia, 1 • 00198 Roma  
Tel. 06 84951

### SEGRETERIA S.I.S.A.



V.le Maresciallo Pilsudski, 118  
00197 Roma  
Tel. 06 845431 • Fax 06 84543700  
E-mail info@sisa.it • Web www.sisa.it

### SEGRETERIA ORGANIZZATIVA



V.le Maresciallo Pilsudski, 118  
00197 Roma  
Tel 06 845431 • Fax 06 84543700  
E-mail roma@aristea.com  
Web www.aristea.com

[www.sisa.it](http://www.sisa.it)



# RIASSUNTO DELLE COMUNICAZIONI PRESENTATE AL 33° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A.

## SEPARATION AND CHARACTERIZATION OF DIFFERENT POPULATIONS OF EXTRACELLULAR VESICLES AND MEMBRANE-LESS NANOPARTICLES SECRETED BY A HUMAN LYMPH-NODE METASTATIC CELL LINE

F.M. Accattatis<sup>1</sup>, A. Granata<sup>1</sup>, S. Mazza<sup>1</sup>, E. Vergani<sup>2</sup>, M. Romano<sup>3</sup>, A. Ridolfi<sup>4</sup>, P. Bergese<sup>5</sup>, A. Corsini<sup>6</sup>, L. Arnaboldi<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari; <sup>2</sup>IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia e Consorzio Interuniversitario per lo Sviluppo dei Sistemi a Grande Interfase (CSGI), Firenze; <sup>4</sup>Consorzio Interuniversitario per lo Sviluppo dei Sistemi a Grande Interfase (CSGI), Firenze e CNR, Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati (CNR-ISMN), Bologna and Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff", Università degli Studi di Firenze; <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia and Consorzio Interuniversitario per lo Sviluppo dei Sistemi a Grande Interfase (CSGI), Firenze; <sup>6</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari DiSFeB, Università degli Studi di Milano, IRCCS Multimedica, Milano; <sup>7</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari DiSFeB, Università degli Studi di Milano

E-mail: lorenzo.arnaboldi@unimi.it

**Introduction.** Extracellular vesicles (EVs) are structures physiologically secreted by cells. Lack of separation and characterization methods impairs the comprehension of their biology. EVs are classified in small - (50-80 nm), large - (80-120 nm) exosomes and microvesicles (120-1000 nm). Nevertheless, a new population of non-membranous nanoparticles (exosomes; <50 nm) emerged.

**Aims.** To separate, quantify and characterize (dimensions, lipid/protein content, distribution) different EVs subpopulations. To pharmacologically modulate lipid-dependent pathways involved in EVs synthesis/secretion.

**Materials and Methods.** Lymph-node melanoma metastatic cell line (LM-16) are cultivated in 150 mm dishes and isolated by differential ultracentrifugation according to Livshits. Obtained EVs are analyzed by Transmission Electron Microscopy, Colorimetric Nanoplasmonic assay (CONAN), Atomic Force Microscopy (AFM), while lipids are detected by colorimetric assays and GLC.

**Results.** We show a relative and continuous increase in saturated fatty acids, ranging from microvesicles (35.89%) to exosomes (65.27%), counterbalanced by a decrease in unsaturated ones from 51.07% (microvesicles) to 29.38% (exosomes) and by an increase in plasmalogens from 5.33% to 13.02%, respectively. The mass of Phospholipid (PL) and of Free Cholesterol (FC) increases vs parental cells up to 4 and 14 folds respectively, together with the increased FC/PL, with specific changes. To assess purity, dimensional distribution and the real number of particles, preliminary data obtained by CONAN and AFM suggest a correspondence between calculated and experimental EVs radius, together with a relative sample purity, but adjustment will be necessary. EV populations will be characterized also by lipidomics and proteomics.

**Future aims.** The final goal will be to administer different EVs populations harvested from naïve - or pharmacologically - treated with drug affecting lipids metabolism (which has pivotal roles in their biogenesis

and structural functions) parental cells to prove their effects in functional tests (e.g. proliferation, apoptosis, migration, invasion), to shed light on their pathophysiological roles, for a possible new pharmacological approach or the discovery of novel tumor biomarkers.

## THE EFFECT OF WEIGHT LOSS ON CIRCULATING PCSK9 LEVELS IN OBESE PATIENTS

A. Altomari<sup>1</sup>, M.G. Zenti<sup>1</sup>, S. Galvan<sup>1</sup>, C. Maneschi<sup>1</sup>, M. Aventaggiato<sup>1</sup>, D. Sandri<sup>1</sup>, E. Paiola<sup>1</sup>, M. Battistoni<sup>1</sup>, M.G. Lupo<sup>2</sup>, G. Targher<sup>1</sup>, N. Ferri

<sup>1</sup>UOC Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo, AOUI Verona e Università di Verona; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova

E-mail: anna.altomari@hotmail.it

**Background.** The main role of PCSK9 is the regulation of low-density lipoprotein-cholesterol, however, several evidence indicate that PCSK9 may play a role on visceral adipose tissue deposition and hypertriglyceridemia, disorders observed in obese and insulin resistant patients AIM: to investigate the effects of weight-loss on PCSK9 plasma concentration in obese patients.

**Methods.** Preliminary data of a non-randomized-observational-study on 10 patients (3M/7F), BMI  $43.7 \pm 7.9 \text{ kg/m}^2$ ; age  $42.7 \pm 11$  years, who underwent bariatric surgery (4 Sleeve gastrectomy and 6 Gastric Bypass). We performed an OGTT at baseline (T0) and 6 months after surgery (T6), to assess glucose, insulin and PCSK9 plasma levels at 0-60-120-180 minutes. PCSK9 levels were compared with a group of 12 healthy subjects (4M/8F), BMI  $20.7 \pm 2.1 \text{ kg/m}^2$ ; age  $34 \pm 11$  years, with normal glucose-tolerance.

**Results.** Body-Weight and fat-mass significantly decreased after surgery ( $\Delta$ weight:  $33.8 \pm 14.9 \text{ kg}$  and  $\Delta$ fat-mass:  $-27.3 \pm 8.1 \text{ kg}$ ;  $p < 0.01$  for both). At T6, we observed a significant decrease in glucose (T0:  $6.4 \pm 1.8 \text{ mmol/L}$ ; T6:  $4.9 \pm 0.4 \text{ mmol/L}$   $p < 0.01$ ), insulin (T0:  $16.4 \pm 9.9 \text{ mU/L}$ ; T6:  $6.1 \pm 1.7 \text{ mU/L}$ ;  $p < 0.01$ ) and PCSK9 plasma-levels (T0:  $299 \pm 55 \text{ ng/mL}$ ; T6:  $256 \pm 22 \text{ ng/mL}$ ;  $p < 0.05$ ). At baseline, PCSK9 showed a progressive reduction after oral glucose-loading and concomitant hyperinsulinemia (insulin-peak at 60 min of  $75.1 \pm 40.0 \text{ mU/L}$ , PCSK9 nadir at 120 minute,  $256 \pm 62 \text{ ng/mL}$ ), which was not observed at T6 as in the control group.

**Discussion.** In our study weight-loss determines a significant reduction of PCSK9 levels. In addition, we observed a progressive reduction of PCSK9 plasma-levels in response to glucose loading. PCSK9 clearance occurs very rapidly (within 90-120 minutes) and the mass of adipose tissues appears to play a major role. Indeed, PCSK9 remains constant during the OGTT test in healthy subjects with normal glucose tolerance and BMI of 20.7, and, more importantly, in obese patients that change BMI from 43.7 to 31.9  $\text{kg/m}^2$ .

**Conclusions.** We observed a previously unknown phenomena characterized by a very rapid clearance of PCSK9 from circulation in response to glucose overload in insulin resistant obese patients. This effect suggests a role of adipose tissue on PCSK9 uptake and clearance, potentially through the very low-density lipoprotein receptor.

## TELOMERES ALTERATIONS WITH LIFELONG EXPOSURE TO GENETICALLY DETERMINED HYPERCHOLESTEROLEMIA

A. Baragetti<sup>1</sup>, F. Pellegatta<sup>2,3</sup>, L. Grigore<sup>2,3</sup>, L. Da Dalt<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, A. Moregola<sup>1</sup>, V. Zampoleri<sup>1,2</sup>, A. Pirillo<sup>2</sup>, G.D. Norata<sup>1,2</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>

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

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

E-mail: andrea.baragetti@unimi.it

**Aim.** Telomere Length Shortening (TLS) reflects cellular senescence and associates with cardiovascular disease (CVD). Moreover, effects on TLS by CVD risk factors have been demonstrated. Among them, however, despite elevated cholesterol levels were correlated with shorter Leukocytes Telomere Length (LTL), it is still underexplored if this relation mirrors exposure over time to elevated LDL-C, causal for enhanced CVD risk.

**Methods.** To study if TLS associates with lifelong exposure to hypercholesterolemia, we measured LTL of genomic DNA from 206 hypercholesterolemic patients referring to the Lipid clinic of Milano (within the LIPIGEN Registry). Exome sequence screening for Familial Hypercholesterolemia (FH)-related mutations on LDL gene confirmed a total of 135 heterozygous FH (HeFH) probands. LTL was available in 320 subjects from a large population-based cohort (the PLIC Study), without positive genetic diagnoses and with  $136.37 \pm 35.58$  mg/dL as mean LDL-C.

**Results.** LTL of HeFH was shorter vs that of hypercholesterolemic patients without genetic positivity for FH (non-FH HC, n=71) and controls ( $1.33 \pm 0.03$  vs  $1.44 \pm 0.07$  vs  $1.51 \pm 0.03$  p<0.001). Pairing for LDL-C, LTL was still shorter in HeFH vs non-FH HC ( $1.33 \pm 0.05$  vs  $1.55 \pm 0.08$ , p=0.019), independently from previous CVD and statins. LTL was shorter only in HeFH below 35 years-old without statins, but no longer between HeFH and nonFH-HC over fifties. Blood LTL was reduced in one-years-old LDLR KO rodents vs wild-types peers ( $0.83 \pm 0.14$  vs  $1.11 \pm 0.27$ , p<0.001), confirming TLS as a conserved trait of genetically determined hypercholesterolemia in mammals. Cholesterol levels correlated with expansion of multipotent proliferative stem cells niche in bone marrow where TL was enhanced in LDLRKO mice vs wild-type ( $3.42 \pm 1.19$  vs  $0.85 \pm 0.14$ , p=0.002).

**Conclusions.** By using genetic models and translations in mice, we found significant TLS in circulating cells with lifelong exposure to elevated LDL-C. Taken together these findings entice further investigations to study relations between hypercholesterolemia and commitment of hematopoiesis over evolution.

## LIVER FIBROSIS AND METABOLIC SYNDROME PREDICT CARDIOVASCULAR EVENTS IN PATIENTS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

F. Baratta<sup>1</sup>, D. Pastori<sup>1</sup>, F. Angelico<sup>2</sup>, A. Balla<sup>3</sup>, A.M. Paganini<sup>3</sup>, N. Cocomello<sup>4</sup>, D. Ferro<sup>4</sup>, F. Violi<sup>4</sup>, A.J. Sanya<sup>5</sup>, M. Del Ben<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University of Rome; <sup>2</sup>Department of Public Health and Infectious Diseases, Sapienza University of Rome; <sup>3</sup>Department of General Surgery and Surgical Specialties "Paride Stefanini", Sapienza University of Rome; <sup>4</sup>Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University of Rome;

<sup>5</sup>Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Virginia Commonwealth University School of Medicine, Richmond, Virginia, USA

E-mail: francesco.baratta@uniroma1.it

**Background and Aims.** In addition to liver-related complications, people with NAFLD have also an increased risk of developing cardiovascular diseases (CVD), such as myocardial infarction and stroke, which represent the major causes of death in this setting. Liver fibrosis has been shown to be most important factor affecting the prognosis of patients with NAFLD3, but the relationship between liver fibrosis and cardiovascular events (CVEs) has been poorly investigated.

**Methods.** Secondary pre-specified analysis of the prospective observational PLINIO study (Progression of Liver Damage and Cardiometabolic Disorders in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: an Observational Cohort study), study including 898 consecutive outpatients screened for liver steatosis by ultrasound. Liver fibrosis was assessed by FIB-4 >2.67 and by NAFLD Fibrosis Score (NFS) >0.676. CVEs were prospectively collected including fatal/nonfatal ischemic stroke and myocardial infarction, cardiac/peripheral revascularization, new-onset arterial fibrillation and cardiovascular death.

**Results.** Mean age was  $56.4 \pm 12.7$  years and 37.5% of patients were women. Most patients were overweight and obese, type 2 diabetes mellitus in 25.7% and metabolic syndrome in 48.6%. NAFLD was diagnosed in 660 (76.4%) patients. In a median follow-up time of 41.4 months (3044.4 patient-years), 58 CVEs (1.9%/year) were registered. The rate of CVEs was higher in patients with (n=643, 2.1%/year) compared to those without NAFLD (n=255, 1.0%/year, p=0.066). At multivariable Cox proportional regression analysis, NAFLD predicted CVEs (Hazard Ratio [HR]:2.41, p=0.036), after adjustment for metabolic syndrome. In NAFLD patients, male sex (HR:2.10, p=0.039), previous CVEs (HR:3.52, p=0.010), metabolic syndrome (MetS) (HR:2.89, p=0.006) and FIB-4>2.67 (HR:4.02, p=0.023) were independent predictors of incident CVEs. Similar results were obtained using NFS >0.676 (HR:2.35, p=0.038).

**Conclusions.** We confirm that patients with NAFLD are characterized by a high risk for CVEs. In NAFLD patients, liver fibrosis indexes, together with the presence of MetS, were independent predictors of incident CVEs.

## PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 PREDICTS THE EXTENSION OF ATHEROSCLEROTIC DISEASE IN THE CORONARY ARTERIES OF PATIENTS UNDERGOING CORONARY ANGIOGRAPHY

V. Bianconi<sup>1</sup>, M.R. Mannarino<sup>1</sup>, R. Curcio<sup>1</sup>, J. Fusaro<sup>1</sup>, A. Sahebkar<sup>2</sup>, M. Pirro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unit of Internal Medicine, Angiology and Arteriosclerosis Diseases, Department of Medicine, University of Perugia; <sup>2</sup>Neurogenic Inflammation Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran  
E-mail: v.bianconi.vb@gmail.com

**Introduction.** Among the multitude of traditional and emerging cardiovascular risk factors, hypercholesterolemia, particularly elevated plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), has been established as an unequivocal causative factor for coronary heart disease (CHD). Albeit different functions and roles of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) have been proposed, its role in regulating plasma LDL-C concentrations by promoting LDL receptor (LDLR) degradation is remarkably consistent. A prospective association between plasma PCSK9 concentrations and CHD risk has been found in several clinical studies. Importantly, some studies have remarked the dependence of this association from plasma lipids, whereas other studies a significant independence. Such a controversial scenario emerging from prospective studies performed in different clinical settings underlies the debate on whether PCSK9 may exert a proatherogenic effect that is independent of lipid pathways and, more specifically, of plasma LDL-C. Based on the available studies, the association between PCSK9 and atherosclerotic burden at the coronary district remains still unclear and requires further clarification. The aim of this study was to investigate the association between plasma PCSK9 concentrations, current acute coronary syndrome (ACS), coronary artery disease (CAD) presence, severity and extension and the burden of coronary calcifications in patients undergoing coronary angiography for suspected ACS.

**Materials and Methods.** One hundred and one patients, with or without current ACS, were recruited for this cross-sectional study. CAD presence was defined based on either the presence or absence of at least one significant ( $\geq 50\%$ ) CAD lesion (SCAD). CAD severity was classified according to the absence of coronary lesions, the presence of non-significant ( $< 50\%$ ) CAD (MCAD) or SCAD in at least one major coronary artery. Patients with one, two or three significantly diseased major coronary arteries were defined as 1-SCAD, 2-SCAD and 3-SCAD, respectively. The cumulative length of SCAD lesions and the amount of calcifications in coronary arteries were also estimated.

**Results.** Plasma PCSK9 concentrations were higher in patients with SCAD as compared to those without ( $p=0.012$ ). A significant increase in plasma PCSK9 concentrations was observed with greater CAD severity ( $p=0.042$ ). Higher plasma PCSK9 concentrations were found in 3-SCAD patients as compared to either 2-SCAD or 1-SCAD ( $p<0.001$ ). PCSK9 increased with the cumulative length of SCAD lesions and the burden of calcifications ( $p<0.05$  for both comparisons). Multivariable adjustment abolished the association between PCSK9 and either CAD presence or severity, but not the association between PCSK9 and the number of significantly diseased vessels, SCAD lesion length and the burden of coronary calcifications. ACS was associated with a borderline significant in-

crease of plasma PCSK9 concentrations among patients not taking statins ( $p=0.05$ ).

**Conclusions.** In this study circulating PCSK9 concentrations discriminated patients with greater coronary atherosclerotic lesion extension and calcification, and were increased in patients with current ACS.

## DISCOVERY THE HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECT OF MENAQINONE-7

N. Biancorosso<sup>1</sup>, M.G. Lupo<sup>1</sup>, E. Brilli<sup>2</sup>, G. Tarantino<sup>2</sup>, M.P. Adorni<sup>3</sup>, G. Vivian<sup>1</sup>, M. Salvalaio<sup>1</sup>, S. Dall'Acqua<sup>1</sup>, H. Chen<sup>4</sup>, A. Bressan<sup>5</sup>, E. Faggini<sup>5</sup>, M. Rattazzi<sup>5</sup>, N. Ferri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova; <sup>2</sup>PharmaNutra S.p.A., Pisa; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma; <sup>4</sup>Tianjin Key Laboratory for Modern Drug Delivery & High-Efficiency, School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin, China; <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova  
E-mail: noemibiancorosso@gmail.com

Appropriate nutraceutical combinations may represent a valid approach to prevent vascular calcification associated to chronic kidney disease (CKD). In the present study, we tested the effect of diet supplementation of MK-7 (3.5 µg/g diet) in combination to magnesium carbonate and sucrosomial® iron on vascular calcification in uremic rats. Rats were randomly divided into three groups, control (normal diet), uremic (diet containing 0.5% adenine) and supplemented uremic diet (0.5% adenine, MK-7, magnesium carbonate and sucrosomial® iron). After 6 weeks, serum and vascular calcification were examined. Uremic diet increased creatinine and phosphate levels and extensive vascular calcification, as determined by von Kossa staining and biochemical determination of the Ca<sup>2+</sup> content. Interestingly, the uremic condition also induced a mild hypercholesterolemia condition (+52% of total cholesterol;  $p<0.05$ ). Supplemental diet did not reduce creatinine and phosphate levels as well as vascular calcification, however we observed a significant hypocholesterolemic effect (-18.9% uremic vs supplemental uremic diet;  $p<0.05$ ). Similarly to simvastatin, incubation of cultured human hepatoma cell line (Huh7) with 7.5 µM and 15 µM of MK7 significantly reduced cholesterol biosynthesis (-35±40%). At the same concentrations, MK7 induces 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase (4 fold), low-density lipoprotein receptor (LDLR) by 3-fold and LDL uptake (+26%). MK7 also induced the mRNA expression of both HMG-CoA reductase and LDLR. However, in contrast to simvastatin, MK7 reduced both intracellular and secreted active form of PCSK9 in Huh7 cell line. The induction on LDLR was reversed by the co-incubation with squalene, suggesting that MK7 may act on an enzymatic step of the mevalonate pathway upstream the squalene synthase. Taken together, these results indicated that MK7 has a significant impact on cholesterol metabolism and its supplementation may help to control the mild hypercholesterolemic conditions in CKD patients.

## HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: MORE EVOLOLCUMAB THAN AUTHORIZED IS NEEDED

F. Bigazzi, F. Sbrana, B. Dal Pino, A. Ripoli, M. Coceani,  
R. Luciani, M. Pianelli, T. Sampietro

*Lipoapheresis Unit, Reference Center for Diagnosis and Treatment of Inherited Dyslipidemias, Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa*

E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

**Background.** Evolocumab represents a breakthrough in the treatment of hypercholesterolemia. The TAUSIG study [NCT01624142] was conducted in subjects affected by Heterozygous Familial hypercholesterolemia (HeFH) already on chronic lipoprotein-apheresis (LA); evolocumab 420 mg was administered every 14 days at the end of each LA procedure, in addition to conventional medical therapy. The aim of the study was to verify if evolocumab efficacy is maintained in HeFH subjects that discontinued chronic LA and began evolocumab 140 mg, according to European Medicines Agency (EMA).

**Methods.** We retrospectively evaluated 12 HeFH patients enrolled in the TAUSIG trial (mean age 67±8 years, 9 male) with known cardiovascular disease and on chronic LA. After the end of the trial, all study participants were shifted on Evolocumab 140 mg every 2 weeks, according to EMA recommendations.

**Results.** During three years of follow-up, a cumulative LDL-C reduction of -56% was recorded; 6/12 patients discontinued LA because they were able to maintain LDL-C level below 70 mg/dl. Three months after the reduction of evolocumab dosage, we registered a significant LDL-C increase in the subgroup of patients who discontinued LA ( $LDL-C\ 68\pm22\ mg/dl$  vs  $84\pm22\ mg/dl$ ,  $p<0.05$ ), while subjects on LA showed no significant change in their lipid profile. In the subgroup of patients who discontinued LA, we tried to titrate lipid lowering therapy maximally without success and, in one case, LA was restarted.

**Conclusions.** Our study reveals the unmet needs of HeFH patients whose phenotypic spectrum is broad and, in many cases, overlaps with that of HoFH, thus needing a higher drug dose.

## STATIN-ASSOCIATED MUSCLE SYMPTOMS IN THE PROSISA STUDY: PREVALENCE AND RISK FACTORS

F. Bonaiti<sup>1</sup>, M. Casula<sup>1,2</sup>, E. Olmastroni<sup>1</sup>, M. Gazzotti<sup>1</sup>, L. Grigore<sup>3</sup>, A. Zambon<sup>4</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan;* <sup>2</sup>*IRCCS MultiMedica Hospital, esto S. Giovanni, Milan;* <sup>3</sup>*S.I.S.A. Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan;*

<sup>4</sup>*Clinica Medica 1, Department of Medicine - DIMED, University, Hospital of Padua*

E-mail: bonaitifederica@gmail.com

Statin associated muscle symptoms (SAMS) are one of the main reasons for poor treatment adherence and/or discontinuation. A definitive diagnosis of SAMS is difficult because symptoms are subjective and there is no 'gold standard' diagnostic test or questionnaire. PROSISA (PROject Statin Intolerance SISA) is an observational, retrospective, and multicentre study aimed at assessing the prevalence of statin intolerance due to SAMS in dyslipidaemic patients. Demographic and anamnestic data, biochemical levels, and potential occurrence of SAMS were collected. Adjusted logistic regression was fitted to estimate odds ratios (OR) and 95% confidence intervals for the association between SAMS onset and several factors. This analysis was carried out on 16,535 patients (mean age  $60.5\pm12.0$  years; 52.2% men) on statins. Overall, 57.4% of them had hypertension, 38.1% previous CV events, and 24.6% diabetes. During statin therapy, 9.7% of patients (N=1585) reported SAMS, in particular 8.7% of men, 10.8% of women, 14.5% of patients with liver disease. Symptoms were mainly myalgia (71.7%), cramps (24.8%), and fatigue (16.9%). Risk of SAMS onset was significantly higher for patients who practice physical activity (OR 1.26 [1.09-1.47]), with significant liver disease (OR 1.78 [1.43-2.21]), with previous CV events (OR 1.21 [1.06-1.37]), and for female patients (OR 1.26 [1.13-1.40]). Among patients reported with SAMS, 753 stopped statin treatment (dechallenge), with disappearance of muscular symptoms in 87.5% of cases. Moreover, among 955 patients experienced a rechallenge (different statin/lower dose, with or without washout period), with disappearance of muscular symptoms in 74.2% of cases. This study offers a real-life outlook of SAMS in Italian clinical practice. The reported prevalence of SAMS was 9.65%, but the percentage of patients in whom intolerance has been confirmed by dechallenge/rechallenge was between 23-27%, emphasizing the need for a better management of SAMS to provide a definitive diagnosis of SAMS and treatment re-evaluation.

## REPROGRAMMING OF T REGULATORY CELLS AS A THERAPEUTIC TOOL TO DAMPEN THE IMMUNO-INFLAMMATORY RESPONSE ASSOCIATED TO ATHEROSCLEROSIS

F. Bonacina<sup>1</sup>, E. Martini<sup>2</sup>, M. Cremonesi<sup>2</sup>, S. Locatelli<sup>1</sup>, J. Nour<sup>1</sup>, F. Pellegatta<sup>3</sup>, A.L. Catapano<sup>1,4</sup>, M. Kallikourdis<sup>2</sup>, G.D. Norata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Excellence of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>IRCCS Humanitas Research Foundation, Rozzano, Milano; <sup>3</sup>Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; <sup>4</sup>IRCSS Multimedica, Milano  
E-mail: fabrizia.bonacina@unimi.it

**Aim.** Loss of anti-inflammatory activity of regulatory Tcells (Treg) is a pathogenic feature of immune mediated disease, as atherosclerosis. Our aim was to investigate whether Treg functionality was impaired in patients affected by familial hypercholesterolemia (FH) and test Treg-Adoptive Cell Therapy (ACT) as a treatment of atherosclerosis-related inflammation. To achieve selective targeting, we reprogram Treg to migrate to the plaque as a selective Treg-ACT in models of atherosclerosis.

**Methods.** Treg from FH patients (HE for LDLR) and LDLR KO mice were phenotypical and functional characterized by flow cytometry. Then, Treg from WT animals were retrovirally (IRES-EGFP vector) transfected with chemokine receptors or an empty vector and i.v. injected (2x10<sup>5</sup> GFP+ cells/mouse) in 8-week high cholesterol diet (WTD) fed male LDLR KO. Homing of transfected Treg to atherosclerotic plaque, its progression and composition was analysed by flow cytometry and histology.

**Results.** HeFH patients present increased levels of Treg (CD3/CD4/CD25high/CD127low/FOXP3+) compared to age and sex matched controls (+23%, p<0.01). Functional experiments, however, showed that Treg isolated from FH patients present a reduced ability in suppressing conventional Tcells proliferation compared to Treg cells from controls (-60% suppression of T cell proliferation, p<0.01), thus pointing to a decreased immunosuppressive function of Treg. Of note, similar impairment of Treg functionality has been confirmed in LDLR KO mice, the experimental model of the disease; these findings allow an easy translation to humans and paves the road for testing Treg treatment as a strategy to dampen the immuno-inflammatory response associated to the atherosclerotic plaque thus limiting disease progression. Therefore, to target Treg function in the plaque, chemokine's signature was evaluated in atherosclerotic LDLR KO mice, the experimental model of FH. mRNA expression revealed that CX3CL1 is selectively expressed in the aorta of KO mice but not in other districts (lymph nodes, spleen and liver), suggesting that the ectopic expression of its matching CX3CR1 would drive Treg to the atherosclerotic plaque. Transduced CX3CR1 or ctrl WT Treg, both overexpressing the fluorescent protein GFP, were injected in atherosclerotic KO mice. 24 h after, CX3CR1-Treg were mainly detected in the aorta (2.5% of GFP+/lived cell compared to 0.6% of ctrl-Treg), while migration was limited and similar to that of ctrl-Treg in other districts, suggesting that the CX3CL1/CX3CR1 axis would represent a strategy to vehiculate Treg to the plaque. To evaluate the effect of engineered Treg on atherosclerosis progression, LDLR KO mice were fed for 4 additional weeks to high cholesterol diet (WTD) after CX3CR1- or ctrl-Treg transfer. Although levels of cholesterol were unchanged, treatment with CX3CR1-Treg significantly reduces plaque progression (-40%, p<0.05) and lipid deposition (-11%, p<0.05), while ameliorates stability by increasing collagen (+27%, p<0.05) and smooth muscle cells content and decreasing pro-inflammatory macrophages.

**Conclusion.** Our data suggest that dysfunctional Treg could contribute to inflammatory burden of atherosclerotic plaque in FH patients. CX3CL1 is selectively expressed in atherosclerotic plaque and the CX3CL1/CX3CR1 axis may represent a pathway to target selective migration to the atherosclerotic plaque. Overexpressing CX3CR1 appears a promising ACT to promote selective homing of Treg into the plaque thus limiting atherosclerosis progression by reducing inflammatory burden.

## THE ACHILLES TENDON ULTRASONOGRAPHY IN THE FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA'S DIAGNOSTIC PATHWAY

M. Biolo<sup>1</sup>, P. Scarinzi<sup>1</sup>, P. Bigolin<sup>2</sup>, C. Panzavolta<sup>1</sup>, M.V. Rabuini<sup>1</sup>, R. Marin<sup>1</sup>, D. Vianello<sup>1</sup>, S. Bertocco<sup>1</sup>, F. Fabris<sup>1</sup>, E. Manzato<sup>1</sup>, S. Zambon<sup>1</sup>, L. Previato<sup>1</sup>, A. Zambon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova;

<sup>2</sup>Ospedale di Castelfranco Veneto  
E-mail: marta.biolo@gmail.com

**Introduction.** For their higher LDL cholesterol levels since birth the patients that suffer from Heterozygous Familial Hypercholesterolemia (HeFH) develop, besides known cardiovascular complications in early age, a progressive tendon thickening until xanthomas formation. Clinical examination, targeted at Achilles tendon (AT) palpation, is really useful for the diagnosis only in advanced stages of disease. AT ultrasonography could be an useful diagnostic tool for clinicians but it doesn't have a clear role yet.

**Aim.** To analyse the diagnostic value of the AT ultrasonography to identify xanthomas compared with clinical examination in subjects with HeFH.

**Materials and Methods.** From January 2016 to July 2018 we collected medical history, clinical examination, complete lipid profile, and Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) score of 120 subjects, 83 with a confirmed genetic hypercholesterolemia and 37 without genetic mutation. All subjects were submitted to bilateral AT ultrasonography to evaluate AT thickness and presence of hypo-echogenic formations.

**Results.** No differences were recognized between the two groups about age, sex, BMI, total cholesterol, HDL, triglycerides or cardiovascular risk factors. A ROC curve showed that the best AT thickness diagnostic cutoff was a ≥6 mm value, that provided a 72.3% sensitivity, a 70.2% specificity, a 84.5% positive predictive value, a 53% negative predictive value, a 2.43 positive likelihood ratio and a 0.39 negative likelihood ratio. We confirmed that ultrasonography is more sensitive than clinical examination to identify xanthomas, and it could represent, with medical history, a useful method to reach an early diagnosis of HeFH.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH AND WITHOUT CORONARY ARTERY DISEASE WITH “EXTREME LDL-C PHENOTYPES”

F. Brucato<sup>1</sup>, N. Martinelli<sup>2</sup>, R. Spina<sup>1</sup>, F. Busti<sup>2</sup>, V. Ingrassia<sup>1</sup>, C. Scrimali<sup>1</sup>, G.I. Altieri<sup>1</sup>, D. Noto<sup>1</sup>, G. Misiano<sup>1</sup>, A. Giannamico<sup>1</sup>, C.M. Barbagallo<sup>1</sup>, F. Fayer<sup>1</sup>, A.B. Cefalù<sup>1</sup>, O. Olivier<sup>2</sup>, D. Girelli<sup>2</sup>, M.R. Averna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties (PROMISE) University of Palermo; <sup>2</sup>Department of Medicine University of Verona;  
E-mail: federicabrucato21@gmail.com

**Introduction.** LDL cholesterol (LDL-C) plasma levels are closely related to the development of coronary artery disease (CAD) and represent one of the main cardiovascular risk factors. The assessment of risk factors must take into account exposure times as well as cholesterol levels. This concept clearly emerges from the study of two monogenic diseases characterized by mutations that are controlled by high levels of cholesterolemia (familial hypercholesterolemia-FH) or low levels of plasma cholesterol (familial Hypobetalipoproteinemia-FHBL) which determine an increase or a reduction to develop CAD.

**Materials and Methods.** The study sample includes patients of Verona Heart Study (VHS) with angiographically documented CAD (positive CAD) and subjects with a completely normal coronary angiography who underwent coronary angiography for other reasons than suspected CAD (negative CAD). We selected patients with extreme LDL-C phenotype with cut-offs of LDL-C > 98th percentile (222 mg/dl) or with LDL-C cutoff < 2nd percentile (66 mg/dl). For the study of the genetic bases of phenotypes characterized by high/low levels of LDL-C, a large-scale sequencing system based on Ion Torrent technology through PGM System has been developed. The analysis was carried out on 13 patients (4 negative CAD and 9 positive CAD) with a high LDL-C phenotype and 12 patients (6 negative CAD and 6 positive CAD) with a low LDL-C phenotype.

**Results.** Among the patients with LDL-C > 98th percentile, the NGS analysis revealed the presence of a pathogenetic mutation in LDLR in one CAD positive subject while the others had an high probability of polygenic-FH (8 CAD positive and 4 CAD negative). The analysis of patients with low levels of LDL-C allowed the identification of two causative mutations in the APOB gene in two CAD negative patients while one missense variant in PCSK9 which correlate with low LDL-C was identified in a CAD positive patient.

## CORRELATION BETWEEN DIFFERENT LDL-R MUTATIONS AND RESPONSE TO AB-PCSK9 THERAPY IN A GROUP OF PATIENT WITH GENETIC DIAGNOSIS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. PRELIMINARY REPORT

A. Buonaiuto<sup>1</sup>, M. Gentile<sup>1</sup>, I. Calcaterra<sup>1</sup>, C. Giacobbe<sup>2</sup>, M. Tripaldella, F. Forte<sup>1</sup>, M.D. Di Minno<sup>1</sup>, G. Iannuzzo<sup>1</sup>, G. Fortunato<sup>2</sup>, P. Rubba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università “Federico II” di Napoli; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università “Federico II” di Napoli  
E-mail: ale.buonaiuto@gmail.com

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disease that leads to cardiovascular disease (CAD). The availability of ab-PCSK9 has changed the approach to therapy. We evaluate the relationship between genetic mutations and response to ab-PCSK9. 71 FH patients, 32 women and 39 men (54.04±13.1 yrs), in primary prevention (N=45) and secondary prevention (N=26), were recruited. This sample included patients with mutations in LDLR gene: heterozygotes for missense mutations (N=30), for null mutations (N=30), compound heterozygotes or homozygotes (N=11). At baseline visit, the whole sample had a maximally tolerated lipid lowering therapy (MT-LLT) without ab-PCSK9; 10 patients had statin intolerance. After ab-PCSK9 therapy (160 days from baseline visit) we evaluated the achievement of a goal (LDL<100 mg/dL in patients without CAD or Diabetes Mellitus (DM) or organ damage, LDL<70 mg/dL). After 160 days of therapy with ab-PCSK9 (45 patients on Alirocumab, 26 patients on Evolocumab) and MT-LLT, 46/71 patients (64.8%) of the whole sample achieve the goal of LDL cholesterol. Of them 27/46 (58.6%) were in primary prevention versus 19/46 (41.3%) in secondary prevention, no difference in achievement of the goal ( $p=0.266$ ). We then evaluated the percent of patients achieving the goal of LDL cholesterol:

- 22/30 (73.3%) patients with missense mutation and 23/30 (76.6%) patients with null mutation, no significant difference among groups;
- 1/11 (9.1%) compound heterozygotes or homozygotes ( $p<0.001$  if compared to heterozygotes);
- 10 patients with statin intolerance, 4/10 (40.0%) achieved the goal of LDL cholesterol ( $p=0.077$  versus those on therapy with statins, 6/10 (60.0%)).

The other main cardiovascular risk factors did not influence of the achievement the goal of LDL cholesterol. These findings indicate lack of correlation between type of mutation in heterozygous FH patients and ab-PCSK9 therapy response. Response was significantly poorest in patients with compound heterozygosity or homozygosity mutation as compared to heterozygotes.

## FENRETINIDE TREATMENT ACCELERATES ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT IN APOLIPOPROTEIN E-DEFICIENT MICE IN SPITE OF BENEFICIAL METABOLIC EFFECTS

M. Busnelli<sup>1</sup>, S. Manzini<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, A. Colombo<sup>1</sup>, S. Soldati<sup>2</sup>, S.S. Barbieri<sup>3</sup>, P. Amadio<sup>3</sup>, L. Sandrin<sup>3</sup>, F. Arnaboldi<sup>4</sup>, E. Donetti<sup>4</sup>, R. Laaksonen<sup>5</sup>, S. Paltrinieri<sup>2</sup>, E. Scanziani<sup>2</sup>, G. Chiesa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano; <sup>4</sup>Department of Biomedical Sciences for Health, Università degli Studi di Milano; <sup>5</sup>Faculty of Medicine and Life Sciences, University of Tampere, Tampere, Finland

E-mail: marco.busnelli@gmail.com

**Aim.** Fenretinide, a synthetic retinoid derivative first investigated for cancer prevention and treatment, has been shown to ameliorate glucose tolerance and the plasma lipid profile, and to reduce body fat mass. These effects, together with its ability to inhibit ceramide synthesis, have suggested that fenretinide may display anti-atherosclerotic effects.

**Methods.** To this aim, 9-weeks-old apoE-knockout (EKO) female mice were fed for 12 weeks a Western diet, without (EKO-Ctrl) or with (0.1% w/w) fenretinide (EKO-Fen). As a reference, wild-type (WT) mice were likewise treated. Growth and metabolic parameters were monitored throughout the study. Atherosclerosis development was evaluated in the aorta and at the aortic sinus. Blood and lymphoid organs were further characterized with thorough cytological/histological and immunocytofluorimetric analyses.

**Results.** Fenretinide treatment significantly lowered body weight, glucose levels and plasma levels of total cholesterol, triglycerides and phospholipids. In the liver, fenretinide remarkably reduced hepatic glycogenesis and steatosis driven by the Western diet. Treated spleens were abnormally enlarged, with severe follicular atrophy and massive extramedullary hematopoiesis. Severe renal hemosiderin deposition was observed in EKO-Fen. Treatment resulted in a threefold increase of total leukocytes (WT and EKO) and raised the activated/resting monocyte ratio in EKO-Fen. Finally, atherosclerosis development was markedly increased at the aortic arch (34.4±7.3% vs 26.1±5.8%, +32%), thoracic (14.3±4.9% vs 4.9±2.1%, +191%) and abdominal aorta (7.6±3.3% vs 3.3±1.8%, +130%) of fenretinide-treated mice. Plaque extent was further quantified at the aortic sinus and provided similar results (810.000  $\mu\text{m}^2$  vs. 540.000  $\mu\text{m}^2$ , +50% in EKO-Fen). Plaques of treated mice were characterized by an increased collagen content and a larger necrotic core, whereas the area occupied by macrophages, foam cells and neutral lipids was comparable between EKO-Fen and EKO-Ctrl.

**Conclusion.** We provide the first evidence that, despite beneficial metabolic effects, fenretinide treatment may prove detrimental for atherosclerosis development.

## FAT MASS LEVELS IN OVERWEIGHT/OBESE CHILDREN AND VASCULAR HEALTH

G. Campana<sup>1</sup>, M.R. Licenziati<sup>1</sup>, G. Iannuzzo<sup>2</sup>, G. Valerio<sup>3</sup>,

D. Morlino<sup>2</sup>, M. Renis<sup>4</sup>, A. Iannuzzi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Obesity and Endocrine Disease Unit, Department of Neurosciences, Santobono-Pausilipon Children's Hospital, Naples; <sup>2</sup>Department of Internal and Clinical Medicine Federico II University, Naples;

<sup>3</sup>Department of Movement Sciences and Wellbeing Parthenope University of Naples; <sup>4</sup>Division of Internal Medicine, Cava dei Tirreni Hospital, Salerno; <sup>5</sup>Department of Internal Medicine and Medical Specialties, A. Cardarelli Hospital, Naples

E-mail: giuseppina.campana86@gmail.com

**Background.** Childhood obesity is one of the most serious public health challenges of the 21st century (1). Adiposity in childhood tracks into adulthood and is associated with later cardiovascular diseases. Body mass index (BMI), the most widely used marker of body fatness, has serious limitations, particularly in children, since it does not accurately discriminate between lean and fat mass, which can be differently distributed in individuals with the same BMI. Recently it was shown that a new prediction model based on height, weight, age, sex, and ethnicity had high accuracy in predicting fat mass in children (2). Aim of our study was to assess in overweight or obese children whether the estimate of fat mass, as derived by the new prediction model, was associated with the carotid cross-sectional area of the intima media complex (CSA-IMC), a parameter that takes into account changes in both wall thickness and lumen diameter and therefore is a more appropriate measure of arterial mass than Intima-Media Thickness (IMT) alone (3).

**Subjects and Methods.** 485 overweight/obese Italian children, 55.2% males, aged 5-15 years, admitted to a tertiary care hospital, were consecutively enrolled in a study on cardiovascular markers of atherosclerosis. All children underwent an ultrasound carotid arterial examination.

**Results.** Mean weight was 62.5±21.1 kg and fat-mass was 26.3±10.7 kg. CSA-IMC was 8.9±1.6 mm<sup>2</sup>. Multiple regression analyses showed a significant association with CSA-IMC (beta 0.216, p<0.001); the association remained significant (beta 0.190, p=0.006) after controlling for the main cardiovascular risk factors (age, sex, systolic blood pressure, HOMA-index, triglycerides, HDL-cholesterol). Fat mass was also independently associated with other cardiovascular risk factors (blood pressure, HOMA-index, triglycerides, HDL-cholesterol).

**Conclusion.** Fat mass, as assessed using the new prediction model based on simple anthropometric measures, is associated with subclinical atherosclerosis in overweight/obese children.

## References

1. World Health Organization. Childhood overweight and obesity 2014. [www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/)
2. Hudda MT, Fewtrell MS, Haroun D, Lum S, Williams JE, Wells JCK, Riley RD, Owen CG, Cook DG, Rudnicka AR, Whincup PH, Nightingale CM. Development and validation of a prediction model for fat mass in children and adolescents: meta-analysis using individual participant data. *BMJ*. 2019; 366: i4293.
3. Roman MJ, Pickering TG, Schwartz JE, Pini R, Devereux RB. Relation of blood pressure variability to carotid atherosclerosis and carotid artery and left ventricular hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1507-1511.

## PCSK9 REGULATES NOX2-MEDIATED PLATELET ACTIVATION BY CD36 RECEPTOR: IMPLICATIONS IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION

V. Cammisotto<sup>1</sup>, P. Pignatelli<sup>2</sup>, C. Nocella<sup>2</sup>, S. Bartimoccia<sup>2</sup>, V. Castellani<sup>2</sup>, D. Pastori<sup>2</sup>, F. Violi<sup>2</sup>, R. Carnevale<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of General Surgery and Surgical Speciality Paride Stefanini, Sapienza University of Rome; <sup>2</sup>Department of Internal Medicine and Medical Specialities, Sapienza-University of Rome;

<sup>3</sup>Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza-University of Rome, Latina

E-mail: vittoria.cammisotto@uniroma1.it

**Introduction.** Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is mainly expressed in the liver, where it LDL cholesterol uptake regulating the expression of LDL receptor (LDL-R). In addition, it was found in other tissues such as the small intestine, kidney, pancreas, and also in the arterial wall, where it could influence local homeostasis and atherosclerosis. The gain of function variants of PCSK9 gene is associated with increased levels of circulating LDL cholesterol, and increased risk for cardiovascular events (CVE) in patients with and without atrial fibrillation (AF). Circulating levels of PCSK9 above 1200 pg/ml were shown to be predictive of cardiovascular events (CVEs) in patients with atrial fibrillation (AF). Because high PCSK9 plasma levels were significantly correlated with 11-dehydro-thromboxane B2 (11-dh-TxB2), a marker of platelet activation, it is possible to hypothesize a direct effect of PCSK9 on PA, but the mechanism involved is still unclear. The aim of the study was to evaluate the role of PCSK9 on PA in vivo in AF patients, if PCSK9, in the range of concentration achievable in human circulation, may influence PA and the underlying molecular mechanism.

**Materials and Methods.** Cross-sectional study including 50 patients with baseline PCSK9 below and 50 above the median value of 1200 pg/ml from the ATHERO-AF cohort. The two groups were balanced for age and sex. In vivo PA was assessed by platelet aggregation, platelet recruitment, serum thromboxane B2 (TxB2) formation and sP-selectin levels. As markers of oxidative stress we evaluated sNox2-dp, H2O2 production, urinary isoprostanes and oxLDL. We performed an *in vitro* study with platelets from healthy subjects (n=5) added with PCSK9 concentrations achievable in human circulation (1000 pg/ml and 2000 pg/ml) measuring aggregation, TxB2, isoprostanes and H2O2 production, Nox2 activation, oxLDL formation. Moreover, to investigate if PCSK9 directly interacts with CD36 and LOX-1, we assessed a co-immunoprecipitation between PCSK9 and these receptors. Finally, p38, p47 and PLA2 phosphorylation was evaluated by western blot analysis.

**Results.** We observed increased PA, measured by platelet aggregation (49,8±2,5 vs 68,6±1,9%; p<0,0001), platelet recruitment (16,46±1,568 vs 31,20±1,861%; p<0,0001), p-selectin expression and serum levels of TxB2 (7,7±0,6 vs 14,7±0,45 ng/mL; p<0,0001; 121,5 ± 1,9 vs 245,5±4,6 pg/mL; p<0,0001, respectively), and oxidative stress evaluated by sNox2 release (21,4±0,9 vs 34,4±1,1 pg/ml; p<0,0001), H2O2 (29,5±1,3 vs 48,8±1,6 µM; p<0,0001), ox-LDL production (12,0±0,9 vs 33,5±1,1 mU/ml; p<0,0001) and isoprostanes biosynthesis (137,2±22,0 vs 272,0±8,6 pg/mg creatinine; p<0,0001) in patients with PCSK9 levels above median (1200 pg/ml) compared to those below (p<0,05). Circulating levels of PCSK9 significantly correlated with markers of platelet activation (PA, TxB2, sNox2-dp and sP-selectin) and oxidative stress oxidative stress (isoprostanes, H2O2 and oxLDL formation). In vitro study demonstrated that PCSK9 was able to increase PA by binding the CD36 receptor. PCSK9-dependent PA is inhibited by the specific Nox2

blocking peptide and is mediated by p38, p47phox and cPLA2 phosphorylation.

**Conclusions.** PCSK9, at concentration achievable in blood from patients with AF, directly induce CD36-mediated platelet activation by amplifying Nox2 activity and arachidonic acid metabolism.

## THE DIAGNOSIS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA IN CHILDREN

R. Buganza<sup>1</sup>, G. Massini<sup>1</sup>, M.D. Di Taranto<sup>2</sup>, A. Gerace<sup>1</sup>, L. de Sanctis<sup>1</sup>, O. Guardamagna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health and Pediatrics, University of Turin;

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II

E-mail: buganzaraffaele@gmail.com

**Introduction.** The identification and treatment of familial hypercholesterolemia (FH) since childhood can improve prognosis and reduce the associated cardiovascular mortality. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of the international scores Simon Broome Register (SBR), Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) and LIPIGEN in predicting the correct FH diagnosis already confirmed by gene mutation detection.

**Material and Methods.** 213 patients (mean age 7±4.15 years) were retrospectively evaluated. Lipid profiles were analyzed before any treatment, and SBR, DLCN and LIPIGEN scores were applied to all patients; 178/213 patients were screened for mutations in the LDLR, APOB and PCSK9 genes.

**Results.** Mean levels of total cholesterol (TC) and LDL-cholesterol (LDL-C) were 279±66.5 mg/dl and 211.3±50.16 mg/dl respectively, without significant differences between males and females. Among the 178 patients undergoing molecular investigations, 159 showed causative mutations, while the molecular analysis was negative on 19 subjects. No independent mutation predictors have been identified among the lipoprotein parameters taken into account (CT, LDL-C, HDL-C, non-HDL-C, LDL/HDL ratio and triglycerides). The use of international scores as discriminant for molecular testing would have led to a loss of 25.7%, 40.7% and 27.1% of mutated patients, with SBR, DLCN and LIPIGEN scores respectively.

**Conclusions.** In the paediatric population with FH, the evaluation of SBR score is the more reliable tool to predict the FH diagnosis in children.

## LIPID PROFILE OF MALE AND FEMALE PATIENTS UNDER 18 YEARS OLD WITH A DIAGNOSIS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: AN ANALYSIS FROM THE LIPIGEN PAEDIATRIC COHORT

M.E. Capra<sup>1</sup>, M. Gazzotti<sup>2</sup>, M. Casula<sup>3</sup>, A.L. Catapano<sup>3</sup>, E. Olmastroni<sup>2</sup>, F. Bonaiti<sup>2</sup>, C. Pederiva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Dislipidemie in età evolutiva U.O. Pediatria e Neonatologia, Ospedale G. da Saliceto, Piacenza; <sup>2</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>3</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano; <sup>4</sup>U.O. Clinica Pediatrica, Servizio Clinico Dislipidemie per Lo Studio e la Prevenzione dell'Aterosclerosi in età pediatrica, Ospedale San Paolo, Milano

**Background.** Familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most common genetic disorder in childhood, yet is often undetected. High levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) are present since birth, thus leading to the development of early atherosclerosis.

**Aim and methods.** In 2018, the LIPIGEN paediatric group was born within the LIPIGEN Network, to improve detection, diagnosis and management of paediatric FH patients. In this analysis, we selected LIPIGEN patients <18 years and evaluated biochemical parameters focusing on gender differences.

**Results.** 567 male and 633 female LIPIGEN patients, age <18 y, were analysed. At diagnosis, the distribution of males/females through the age classes was 48.2%/51.8% for 199 subjects with age 0-5 years, 43.9%/56.1% for 501 subjects with 6-10 years, 52.7%/47.3% for 296 subjects with 11-13 years, and 46.6%/53.4% for 204 subjects with 14-17 years. Mean age at diagnosis was 9.6±3.8 years in both sexes. Excluding 40 males and 44 females under lipid-lowering treatment, in the 0-5y age group, LDL-C was (mean±SD, mg/dl) 198.2±82.4 and 212.1±72.7 mg/dL (for males and females, respectively; p=0.221) and non-HDL-C was (mean±SD, mg/dl) 210.7±85.7 and 225.3±72.0 mg/dL (p=0.205). In the 6-10y age group, LDL-C was 184.6±80.1 and 169.3±64.1 mg/dL (p=0.021) and non-HDL-C was 200.9±81.4 and 185.0±65.1 (p=0.019). In the 11-13y age group, LDL-C was 164.9±60.2 and 168.8±58.9 (p=0.593) and non-HDL-C was 186.14±63.02 and 189.9±62.1 (p=0.630). In the 14-17y age group, LDL-C was 185.2±55.9 and 199.2±61.6 (p=0.118) and non-HDL-C was 202.3±57.2, 218.1±64.0 (p=0.088).

**Conclusion.** This "snapshot" of LIPIGEN-network pediatric population highlights statistically significant differences in lipid profile in male and female at different ages. These results confirm the variability of lipid profile according to pubertal status, with a transient improvement in female as their reach pubertal status before male. The lipidologist must always be aware of these pubertal-related lipid variations in the management and follow up of pediatric patients.

\*Heads of centers of LIPIGEN paediatric group: Francesco Angelico (Roma), Marcello Arca (Roma), Maurizio Averna (Palermo), Andrea Bartuli (Roma), Giacomo Biasucci (Piacenza), Claudio Borghi (Bologna), Paolo Calabro (Napoli), Francesca Carubbi (Modena), Francesco Cipollone (Chieti), Nadia Citroni (Trento), Giuliana Fortunato (Napoli), Ornella Guardamagna (Torino), Arcangelo Iannuzzi (Napoli), Lorenzo Iughetti (Modena), Graziana Lupattelli (Perugia), Giuseppe Mandruffino (Messina), Lorenzo Maroni (Varese), Giuliana Mombelli (Milano), Sandro Muntoni

(Cagliari), Cristina Pederiva (Milano), Fabio Pellegatta (Sesto San Giovanni (MI)), Livia Pisciotta (Genova), Arturo Puja (Catanzaro), Francesco Purrello (Catania), Paolo Rubba (Napoli), Carlo Sabbà (Bari), Riccardo Sarzani (Ancona), Giovanni Battista Vigna (Ferrara), José Pablo Werba (Milano), Sabina Zambon (Padova), Maria Grazia Zenti (Verona) LIPIGEN Steering Committee: Marcello Arca (Roma), Maurizio Averna (Palermo), Stefano Bertolini (Genova), Sebastiano Calandra (Modena), Alberico L. Catapano (Milano), Patrizia Tarugi (Modena) Centralized laboratory: Veronica Zampolieri (Cinisello Balsamo (MI)).

## LIPID PROFILE IN ADOLESCENTS WITH ANOREXIA NERVOSA: A CHALLENGE FOR PEDIATRIC LIPIDOLOGISTS

M.E. Capra, G. Biasucci

Department of Pediatrics and Neonatology, "Guglielmo da Saliceto" City Hospital, Piacenza  
E-mail: mel.capra@gmail.com

**Introduction.** Anorexia nervosa (AN) is epidemically increasing among adolescents. High total-cholesterol (TC) and LDL-cholesterol (LDL-C) values are often reported in AN patients. These alterations might lead some physicians to prescribe a low-fat diet to malnourished AN patients, thus worsening their metabolic and psychological conditions. Pediatric lipidologists play a pivotal role in analyzing and treating lipid alterations in these cohort of patients. Aim of this study is to evaluate the effect of re-feeding on lipid profile in adolescents admitted to our Unit

**Material and Methods.** 235 patients referred to our Pediatric Unit for eating disorders over a 4-year period. 93/235 patients were diagnosed with AN. 37/93 (36 females, age 11-21 years, mean 15 yrs) matched criteria for hospital admission (severe/extreme malnutrition, suicidal thoughts, ineffective/impossible home management). Mean hospital-stay: 78.8 days. Patients were evaluated for anthropometric measures and complete blood lipid profile at admission (T0) and discharge (T1). All patients underwent nutritional and psychological treatment.

**Results.** Lipid profile (mg/dl) at T0 and T1 was, respectively: total cholesterol 177.7±44.9 and 168.8±38.05, LDL 112.2±36.8 and 99.2±26.5 (p<0.05), HDL 55.7±13.1 and 59.2±13.7. Malnutrition-degree at T0 and T1 was, respectively: extreme 20/37 (54%) and 4/37 (11%), severe 8/37 (21.5%) and 3/37 (8%), moderate 8/37 (21.5%) and 10/37 (27%), mild 1/37 (3%) and 13/37 (35%). BMI (mean, range) at T0 and T1 was 14.2 kg/m<sup>2</sup> (range 11.26-18.52) and 16.33 (13.04-19.8). Statistic: Mann-Whitney test.

**Conclusions.** TC and LDL-C in malnourished AN adolescents were higher than expected before starting re-feeding. This finding may be due to a higher rate of synthesis of cholesterol-rich lipoproteins in such patients. Our preliminary data show that lipid values in AN pediatric patients must be evaluated by a pediatric lipidologist and related to BMI and malnutrition degree, in order to avoid prescription of unnecessary dietary restriction in an already compromised nutritional and psychological status.

## TWO HYPERTRIGLYCERIDEMIC PATIENTS CARRYING A SINGLE VARIANT CAUSATIVE OF HYPERTRIGLYCERIDEMIA AND A RARE APOB VARIANT

G. Cardiero<sup>1</sup>, C. Giacobbe<sup>1</sup>, D. Palma<sup>1</sup>, F. Forte<sup>2</sup>, G. Maione<sup>1</sup>, M.D. Di Taranto<sup>1</sup>, G. Iannuzzo<sup>2</sup>, A. Iannuzzi<sup>3</sup>, P. Rubba<sup>2</sup>, G. Fortunato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, and CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; <sup>3</sup>UO Medicina Interna, AORN "A. Cardarelli" di Napoli  
E-mail: cardiero@ceinge.unina.it

**Introduction.** Severe hypertriglyceridemia (HTG) is a rare disease consisting in increased plasma triglyceride (TG) levels (>10 mmol/L). Patients can show eruptive xanthomas, lipaemia retinallis, hepatosplenomegaly and pancreatitis. Five genes are causative of the disease with autosomal recessive inheritance: Lipoprotein lipase (LPL), Apolipoprotein A-V (APOA5), Apolipoprotein C-II, Glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored HDL-binding protein and Lipase maturation factor-1. Genetic causes are not identified in a consistent portion of patients.

**Patients, Material and Methods.** Two HTG patients were recruited and screened for variants in the 5 causative genes by traditional sequencing. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) was used to detect large rearrangements of LPL gene.

First patient: TG 1,456 mg/dL, cholesterol 407 mg/dL, HDL-cholesterol 21 mg/dL, hepatic steatosis, pancreatitis.

Second patient: TG 2,304 mg/dL, cholesterol 280 mg/dL, HDL-cholesterol 8 mg/dL, hepatic steatosis, pancreatitis.

Since the screening revealed only one pathogenic variant in each patient, the next-generation sequencing (NGS) was used to detect variants in a panel of 28 lipid-related genes.

**Results.** The first patient was heterozygote for the pathogenic variant c.809G>A - p.(Arg270His) in the LPL gene. By NGS, another rare variant was found in the exon 29 of APOB gene: c.12382G >A - p.(Val4128Met) that was classified as benign although identified in patients with Familial Hypercholesterolemia (FH). The second patient was heterozygote for the pathogenic variant c.883C >T - p.(Gln295\*) in the APOA5 gene. Another variant causative of FH was found by NGS in the exon 26 of APOB gene: c.10672C >T p.(Arg3558Cys). Both patients had the E2/E3 genotype of APOE. No copy number variations were found.

**Conclusion.** The presence of an APOB variant can be a modifier factor leading to HTG also in patients carrying a single causative variant. Severe HTG is a complex disease that can benefit from NGS to identify variants in a large number lipid-related genes that can act as phenotype modifier.

## LOW-GRADE ESCHERICHIA COLI ENDOTOXEMIA ENHANCES ARTERY THROMBUS GROWTH VIA TOLL-LIKE RECEPTOR 4. IMPLICATION FOR MYOCARDIAL INFARCTION

R. Carnevale<sup>1</sup>, S. Sciarretta<sup>1</sup>, C. Nocella<sup>1</sup>, G. Frati, V. Cammisotto<sup>1</sup>, M. Forte<sup>2</sup>, G. D'Amati<sup>1</sup>, R. Cangemi<sup>1</sup>, C. Gaudio<sup>1</sup>, G. Tanzilli<sup>1</sup>, D. Pastori<sup>1</sup>, F. Violì<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sapienza University of Rome; <sup>2</sup>IRCCS Neuromed

E-mail: roberto.carnevale@uniroma1.it

**Introduction.** Escherichia Coli-lipopolsaccharide (EC-LPS), a component of gut microbiota, is detectable in human circulation but its role in thrombosis is still unclear.

**Methods and Results.** We measured serum EC-LPS concentration and DNA, sP-selectin, a marker of in vivo platelet activation, and zonulin, a marker of gut permeability, in coronary thrombi and intra-coronary blood of patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI, n=50) and stable angina (SA) (n=50) respectively, and in peripheral circulation of matched controls (n=50). Experimental study was carried out in mice to assess if EC-LPS possess thrombotic property. Coronary thrombi from STEMI showed higher concentrations of EC-LPS and sP-selectin versus intra-coronary blood of SA and peripheral blood of controls. Serum zonulin was higher in STEMI compared to the other two groups and correlated with EC-LPS. EC-LPS DNA was detected in 34% of STEMI vs. 12% of SA and 4% of controls. In a subgroup of 12 STEMI, immuno-histochemical analysis of coronary thrombi showed positivity for leucocyte Toll-like receptor 4 (TLR4), cathepsin G and EC-LPS in 100%, 80% and 25% of samples, respectively. EC-LPS injected in mice (n=10) to reach lipopolysaccharides concentrations like those detected in coronary thrombi was associated with enhanced artery thrombosis and platelet activation, an effect blunted by TLR4 inhibitor co-administration. In vitro study demonstrated that EC-LPS, at the same concentrations detected in coronary thrombi, enhanced platelet aggregation via TLR4-mediated leucocyte cathepsin G activation.

**Conclusions.** STEMI patients disclose an enhanced gut permeability that results in EC-LPS translocation in human circulation and eventually thrombus growth at site of artery lesion via leucocyte-platelet interaction.

## ASSOCIATION BETWEEN GLOBAL CARDIAC CALCIFICATION SCORE (GCCS) AND OSTEOPOROSIS

P. Carrai, S. Camarri, P. Fortini, A. AL Refaie, C. Caffarelli,

R. Nuti, S.T. Gonnelli

*Department of Medicine and Neurosciences, University of Siena,  
Policlinico Le Scotte, Siena*

E-mail: paolo.carrai@libero.it

**Background.** Lately there is an increasing attention in finding a linkage between bone metabolism and cardiovascular disease. Experimental studies suggest that bone mineral density (BMD) and valvular calcification may be reciprocally related, but with conflicting data. Furthermore literature suggests that cardiac calcification (measured with Global Cardiac Calcium Score, GCCS) is associated with cardiovascular events and mortality.

**Aim.** This study aimed to evaluate if cardiac calcium deposit was correlated with BMD.

**Methods.** In 84 subjects assessed for bone fracture risk (mean age 71±6,4 years) we measured Bone Mineral Density (BMD) at lumbar spine (BMD-LS) at femur (Neck: BMD-FN; Total: BMD-FT) and we assessed with echocardiography a global cardiac calcium score. GCCS is a semi-quantitative score, that was applied assigning points for calcification in the aortic root and valve, mitral annulus and valve and sub-mitral apparatus, and points for restricted leaflets mobility.

**Results.** The results show that there is a significant inverse correlation between BMD-FN, BMD-FT and BMD-LS with GCCS (respectively  $r=0,393$ ,  $p<0,05$ ;  $r=0,444$ ,  $p<0,05$  and  $r=0,361$ ,  $p<0,05$ ).

Dividing the study population based on BMD, we found that GCCS was higher in osteoporotic and osteopenic subjects respect those who have normal value of BMD.

Dividing patients into two groups based on presence of bone fragility fractures (25 patients with fragility fractures and 46 patients without) we observed that the value of GCCS was significant higher ( $p<0,05$ ) in patients with fractures.

**Conclusion.** Our data suggest a link between osteoporosis and cardiac calcification. In fact the burden of cardiac calcium is higher in patients with lower BMD and fragility fractures. These findings confirm that osteoporotic patients have an higher risk of cardiac calcification and probably a greater risk of cardiovascular events.

## LIPOPROTEIN(A) IS SIGNIFICANTLY HIGHER AND ASSOCIATED WITH INCREASED PREVALENCE OF ATHEROSCLEROTIC CARDIOVASCULAR DISEASE IN MUTATION-NEGATIVE FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA PATIENTS

A. Cavicchioli, S. Lugari, P. Vita, A. Mondelli, E. Pellegrini, F. Carubbi, F. Nascimbeni

*Unit of Internal and Metabolic Medicine, Civil Hospital,  
A.O.U. of Modena and University of Modena and Reggio Emilia*

E-mail: alessia.cavicchioli.1990@gmail.com

**Introduction.** High lipoprotein(a) (Lp(a)) concentrations may be a cause of clinical familial hypercholesterolemia (FH) and are associated with an increase risk of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) [Langsted, Lancet Diabetes Endocrinol 2016]. We evaluate if Lp(a) concentrations and their association with ASCVD may differ between mutation-negative and mutation-positive FH patients.

**Methods.** 177 consecutive patients with clinical suspicion of FH from the Lipid Clinic in Modena underwent comprehensive evaluation, including Lp(a) measurement and genetcan analysis, within the LIPIGEN Project. We considered high Lp(a) concentrations (hyper-Lp(a)) when more than 50 mg/dl. Patients were defined as mutation-positive if "pathogenic" or "likely pathogenic" mutations were detected in FH-causing genes; mutation-negative patients were defined by the presence of "variants of uncertain significance" or absence of genetic variants.

**Results.** 135 FH patients (76.3%) were mutation-positive. Mutation-positive patients showed significantly higher LDL-cholesterol (LDL-c) levels ( $p<0.001$ ) and Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) score ( $p<0.001$ ) than mutation-negative patients, whereas the prevalence of ASCVD was not significantly different between the two groups (15.6% vs. 19.0%;  $p=0.593$ ). Conversely, Lp(a) concentrations were significantly higher (34.7 [10.7-88.9] vs. 22.8 [8.0-49.6] mg/dl;  $p=0.043$ ) and hyper-Lp(a) was significantly more frequent (40.5% vs. 23.7%;  $p=0.034$ ) in mutation-negative than mutation-positive patients. When adjusting LDL-c for Lp(a) cholesterol content (by subtracting 30% of the individuals' Lp(a) total mass from LDL-c), the Lp(a)-adjusted DLCN score tended to be more frequently lowered in mutation-negative than mutation-positive patients (28.6% vs. 15.6%;  $p=0.059$ ). Hyper-Lp(a) was significantly associated with an increased prevalence of ASCVD in mutation-negative patients ( $p=0.003$ ), but not in mutation-positive patients ( $p=0.269$ ). Of note, 7 out of 8 (87.5%) mutation-negative patients with a personal history of ASCVD had hyper-Lp(a).

**Conclusions.** Our study confirms that high Lp(a) concentrations may represent a significant risk factor for clinical FH. In mutation-negative FH patients hyper-Lp(a) may be a major contributing cause of clinical FH and increased ASCVD risk.

## ECHOCARDIOGRAPHIC ALTERATION IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS Affected BY HEPATIC STEATOSIS: A CROSS-SECTIONAL SINGLE CENTER STUDY

S. Cicco, N. Susca, L. Crudele, M. Guarascio, P. Leone, M. Prete, F. Dammacco, V. Rakanelli, A. Vacca

*Department of Biomedical Sciences and Human Oncology, Unit of Internal Medicine "Guido Baccelli", University of Bari Medical School, Bari*

*E-mail:* sebacicco@gmail.com

**Introduction.** Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease caused by autoimmunity. Systemic inflammation disease related may increase flogosis related damage as steatosis. In this study, we looked for a correlation between disease activity, evaluated by SLEDAI and SLICC-DI score, and heart involvement comparing those who presented a hepatic steatosis to those who do not.

**Materials and Methods.** We evaluated 19 SLE patients (Steat-SLE: 13 women and 6 men, aged  $51.89 \pm 10.37$  years) between 01/01/2015 and 31/12/2018 affected by hepatic steatosis. As control group, we use 51 patients (No-Steat-SLE: 42 women and 9 men, aged  $46.24 \pm 14.27$  years) that did not evidence of steatosis. Patients came in follow-up for revaluation and therapy adjustment.

**Results.** Anti-dsDNA Ab, C3, C4, ESR and PCR were not different between the groups. Hepatic dysfunction was not detected in Steat-SLE. No difference were found in SLEDAI, while SLICC-DI results increased if steatosis was detected (Steat-SLE  $3.57 \pm 3.36$  vs No-Steat-SLE  $2.27 \pm 2.15$ ,  $p < 0.05$ ). Patients with Steatosis present a longer disease (Steat-SLE  $232.0 \pm 129.8$  vs No-Steat-SLE  $121.4 \pm 110.6$  months,  $p < 0.05$ ). We highlight that patients with steatosis had an increased left ventricular mass (MLV) both as absolute value (MLV: Steat-SLE  $226.2 \pm 57.53$  vs No-Steat-SLE  $194.4 \pm 58.17$  gr,  $p < 0.05$ ) and MLV indexed (MLVi) for body surface area (BSA) (MLVi: Steat-SLE  $135.0 \pm 48.17$  vs No-Steat-SLE  $112.3 \pm 27.47$  gr/m $^2$ ,  $p < 0.05$ ) but no in interventricular septum thickness. At the same time no difference was found in left atrium (LA) as volume absolute value (LAV: Steat-SLE  $67.33 \pm 25.97$  vs No-Steat-SLE  $58.45 \pm 19.06$  ml,  $p < 0.05$ ) while it was increased as LA volume indexed (LAVi) for body surface area (BSA) (LAVi Steat-SLE  $41.67 \pm 19.49$  vs No-Steat-SLE  $34.12 \pm 9.74$  ml/m $^2$ ,  $p < 0.05$ ). Moreover, a correlation was found in both Steat and No-Steat SLE between SLICC-DI, MLV and MLVi.

**Conclusions.** These data show an increase of LAVi, MLV and MLVi in patients with steatosis. At the same time, these patients present an increased disease damage and duration. This could suggest heart involvement as result of systemic inflammation similarly to that related to hepatic steatosis. At the same time, the detection of hepatic steatosis should suggest a worsening in heart damage in SLE patients.

## ARTERIAL STIFFNESS, SUGAR-SWEETENED BEVERAGES AND FRUITS INTAKE IN A RURAL POPULATION SAMPLE: DATA FROM THE BRISIGHELLA HEART STUDY

A.F.G. Cicero<sup>1</sup>, F. Fogacci<sup>1</sup>, G. Desideri<sup>2</sup>, E. Grandi<sup>1</sup>, E. Rizzoli<sup>1</sup>, S. D'Addato<sup>1</sup>, C. Borghi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hypertension and Atherosclerosis Research Group, Medical and Surgical Sciences Department, University of Bologna; <sup>2</sup>Department of Life, Health and Environmental Sciences, University of L'Aquila  
E-mail: arrigo.cicero@unibo.it

**Introduction.** There are conflicting results linking fruit and fructose intake with cardiometabolic disorders. The main objective of our study was to evaluate the association between fruits and sugar-sweetened beverages intake with pulse wave velocity (PWV), a non-invasive marker of arterial aging, in a large population sample.

**Methods.** For this study, we selected four age and sex-matched subgroups from the last Brisighella Heart Study population survey, after exclusion of those in secondary prevention for cardiovascular diseases, affected by gout and moderate-to-severe chronic kidney disease (defined as eGFR<60 ml/min), and/or actively treated with direct vasodilating drugs (calcium-antagonists, alpha-blockers, nitrates). The remaining subjects were classified in four groups:

- 1) low fruit and low sugar-sweetened beverage intake (LFLB);
- 2) high fruit and low sugar-sweetened beverage intake (HFLB);
- 3) low fruit and high sugar-sweetened beverage intake (LFHB);
- 4) high fruit and high sugar-sweetened beverage intake (HFHB).

**Results.** PWV was significantly more elevated in subjects assuming a higher fructose load, in particular when it was derived from industrially sweetened beverages ( $8.6 \pm 2.3$  ms vs.  $9.6 \pm 2.3$  m/s,  $p < 0.001$ ). Moreover, the main predictors of PWV values were serum uric acid ( $B = 0.391$ , 95%CI 0.321-0.486,  $p = 0.001$ ), fructose load from both fruits and sugar-sweetened beverages ( $B = 0.310$ , 95%CI 0.099-0.522,  $p = 0.004$ ), triglycerides ( $B = 0.228$ , 95%CI 0.117-0.389,  $p = 0.018$ ), fasting plasma glucose ( $B = 0.015$ , 95%CI 0.008-0.022,  $p < 0.001$ ) and estimated Glomerular Filtration Rate ( $B = -0.043$ , 95%CI -0.052 - -0.035,  $p < 0.001$ ).

**Conclusion.** Our data suggest that increased intake of fructose derived from industrial sweetened beverages, though not from all fruits, is independently associated with higher pulse wave velocity.

## AWARENESS OF MAJOR CARDIOVASCULAR RISK FACTORS AND ITS RELATIONSHIP WITH MARKERS OF VASCULAR AGING: DATA FROM THE BRISIGHELLA HEART STUDY

A.F.G. Cicero<sup>1</sup>, F. Fogacci<sup>1</sup>, G. Tocci<sup>2</sup>, F. Ventura<sup>1</sup>, V. Presta<sup>2</sup>, E. Grandi<sup>1</sup>, E. Rizzoli<sup>1</sup>, S. D'Addato<sup>1</sup>, C. Borghi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hypertension and Atherosclerosis Research Group, Medical and Surgical Sciences Department, Sant'Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna; <sup>2</sup>Hypertension Unit, Division of Cardiology, Department of Clinical and Molecular Medicine, University of Rome Sapienza, Sant'Andrea Hospital, Rome  
E-mail: arrigo.cicero@unibo.it

**Background.** The aim of the present study was to evaluate the vascular aging of subjects aware and not aware to be hypertensive, hypercholesterolemic, hypertriglyceridemic or diabetics in a general population sample.

**Methods.** We interviewed 1652 subjects without atherosclerotic cardiovascular diseases (M: 46.6%, F: 53.4%) about their awareness of hypertension, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia or type 2 diabetes. Then we compared the augmentation index and pulse wave velocity of subjects aware and not aware of the investigated cardiovascular risk factors.

**Results.** 1049 participants declared not to be hypertensive, while 32 were not sure. Among them, respectively, 23.5% and 50% were hypertensive. Subjects not aware of their hypertension had significantly higher aortic blood pressure than aware ones ( $p<0.001$ ). 841 participants declared not to be hypercholesterolemic, while 60 were not sure. Among them, respectively, 18.1% and 40% were hypercholesterolemic. Subjects not aware of their hypercholesterolemia had significantly higher augmentation index than the aware ones ( $p<0.05$ ). 1226 participants declared not to be hypertriglyceridemic, while 200 were not sure. Among them, respectively, 19.2% and 44% were hypertriglyceridemic. Subjects not aware of their hypertriglyceridemia had significantly higher TG levels aware ones ( $p<0.05$ ), although this seemed to not related to increased arterial stiffness. 1472 participants declared not to be diabetic, while 20 were not sure. Among them, respectively, 2.0% and 25.0% were diabetics. Subjects not aware of their diabetes had significantly higher augmentation index than the aware ones ( $p<0.05$ ).

**Conclusions.** In conclusion, the lack of awareness of hypertension and hypercholesterolemia is relatively frequent in general population and associated to significantly higher arterial stiffness.

## ENDOCAN LEVELS AS MARKER OF CARDIOVASCULAR HEALTH IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE PATIENTS

M. Cinquegrani<sup>1</sup>, M. Sciaro<sup>1</sup>, F. Savarino<sup>1</sup>, M. Scuruchi<sup>2</sup>, G. Costantino<sup>1</sup>, C. Zito<sup>1</sup>, W. Fries<sup>1</sup>, A. Saetta<sup>1</sup>, J. Rodriguez Carrio<sup>3</sup>, G. Squadrato<sup>1</sup>, G. Mandrappino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine, Internal Medicine Unit, University of Messina; <sup>2</sup>University

<sup>f</sup>Messina, Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Images; <sup>3</sup>Area of Immunology, Department of Functional Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain

E-mail: mariacinquegrani@gmail.com

**Background.** Inflammatory Bowel Diseases (IBDs) are systemic disorders characterized by increased CV risk; however, CV risk assessment is not always easy, and it is often underestimated mainly in earlier phases of the ill, when CV involvement is generally subclinical. Endocan, a novel biomarker of endothelial dysfunction, plays a key role in endothelial and systemic inflammatory reaction; recently, Endocan was found significantly increased in IBD patients.

**Aim.** To evaluate novel potential markers of early cardiovascular involvement in patients with refractory (as considered after six months of conventional therapy with CCS plus mesalazine) IBD before and after treatment with biological drugs (infliximab, adalimumab, vedolizumab). Consistently, circulating CD34+ cell count and Endocan levels were assessed, along with Carotid-femoral Pulse Wave Velocity (cf-PWV), global longitudinal strain (GLS) assessment.

**Methods.** Clinical and instrumental examination was performed in 27 IBD patients; PWV, GLS, endocan levels and circulating CD34+ cells were evaluated before (T0) and after (T1) a six-months treatment with biological drugs. GLS was measured by speckle tracking echocardiography. Circulating CD34+ were counted by flow cytometry. In addition, inflammatory indices and EF% were also evaluated. Results: At T1, we found a significant reduction of Endocan levels (-22.16%,  $p=0.045$ ), and CRP (-67%,  $p<0.005$ ) as well CD34+ cell count (+6.5%,  $p=0.047$ ) and GLS (+26%,  $p<0.001$ ) were increased. No statistically significant difference as regards ESR, PWV, EF with respect to T0. The interdependence analysis performed on the mean percent changes showed a significant correlation between  $\Delta$ Endocan and  $\Delta$ GLS ( $r=0.80$ ), and a trend with  $\Delta$ CD34+ ( $r=0.31$ ).

**Conclusions.** In our study we have shown that biological drugs may improve inflammatory status, clinical compensation and CV risk as suggested by favorable change of CRP, Endocan and CD34+ plasma levels and GLS values. This study is limited by short patients cohort to confirm this preliminary data. Endocan is involved in a variety of biological processes including cell proliferation, migration, and neovascularization. Its levels are closely related to the development and progression of CVD. Patients with IBD have a greater risk of developing CV disease, especially when IBD is clinically uncontrolled.

## SERUM IL-18 INCREASE AND INFLAMMOSOME ACTIVATION IN GLUTEAL ADIPOSE TISSUE AFTER PROLONGED BED-REST

R. Colonna<sup>1</sup>, E. Dalla Nera<sup>1</sup>, J.M. Sanz<sup>1</sup>, M.A. Miselli<sup>1</sup>, C.M. Semprini<sup>1</sup>, G. Zuliani<sup>2</sup>, A. Passaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Sciences, Section of Internal and Cardio Respiratory Medicine, University of Ferrara; <sup>2</sup>Department of Morphology, Surgery, and Experimental Medicine, University of Ferrara

E-mail: clnrsl@unife.it

**Introduction.** Sedentary lifestyle is an independent risk factor for cardiometabolic disorders, regardless of concomitant physical activity, body weight and composition. Low-grade systemic inflammation is known to be involved in the pathogenesis of cardiometabolic diseases and IL-18 has been recognized as an actor in the development of atherosclerotic plaque. The aim of this study was to investigate the effect of physical inactivity on gluteal adipose tissue gene expression and systemic inflammation markers.

**Methods.** 23 healthy men underwent 14 days of total physical inactivity, expressed as absolute bed-rest. At basal time and at the end of bed-rest we performed impedance analysis and obtained blood samples and gluteal adipose tissue biopsy for RNA isolation and subsequent microarray analysis (7 subjects).

**Results.** After bed-rest we observed a significant modification in body composition (reduction of FFM, BCM, muscle mass; increase of FM) and metabolic profile (reduction of total and LDL-cholesterol). We documented a trend to increase of IL-18 levels, and a direct correlation of IL-18 levels with FM and an inverse correlation with FFM, BCM and MM. Moreover, subjects in the upper tertile of IL-18 variation, showed the greatest increase in FM and the greatest reduction in FFM, BMC e MM. Similar results were observed regarding total and LDL-cholesterol, with the greatest reduction in subjects belonging to the upper tertile of IL-18 variation. The microarray analysis showed that, among the 342 coding genes differently expressed after bed-rest, there was a significant up regulation of genes belonging to the inflammosome, such as IL-18, IL1 $\beta$ , and NLRP3.

**Conclusion.** Our data suggest that subcutaneous adipose tissue may be one of the actors playing a role in the detrimental effect of sedentary behaviour, participating to the activation of the inflammatory cascade and contributing to a low-grade systemic inflammation, a known pathophysiological mechanism in atherosclerosis development.

## CARDIOVASCULAR RISK STRATIFICATION THROUGH THE EVALUATION OF COMMON CAROTID STIFFNESS BY SPECKLE-TRACKING ULTRASONOGRAPHY

R. Curcio, N. Mojovic, M.R. Mannarino, E. Cosentini, E. Bortone, M. Pirro, V. Bianconi

Unit of Internal Medicine, Angiology and Arteriosclerosis Diseases, Department of Medicine, University of Perugia

E-mail: curciorosa90@gmail.com

**Introduction.** Carotid speckle-tracking ultrasonography is emerging as a non-invasive and feasible method for evaluating the multi-directional mechanics of carotid arteries. The association between carotid stiffness and cardiovascular (CV) risk has not been fully elucidated. We investigated the association between left common carotid (lcc) elastic modulus (lccEM) and pulse wave velocity (lccPWV) and two conventional surrogate markers of CV risk, i.e. lcc intima-media thickness (lccIMT) and aortic PWV (aPWV). Also, we explored the association between lccEM and lccPWV and the 10-year risk of fatal CV events.

**Materials and Methods.** Seventy-eight dyslipidemic patients were enrolled among those who referred to our tertiary care center for the management of lipid disorders. The 10-year risk of fatal CV events was estimated according to the European Atherosclerosis Society (EAS) recommendations. Carotid speckle-tracking ultrasonography was used to assess lccEM and lccPWV, while lccIMT was automatically calculated through a grey-scale analysis of the ultrasound images. The Sphygmo Cor Vx system was used to assess aPWV.

**Results.** Seventeen (22%), 24 (31%), 21 (27%) and 16 (20%) patients were in the low, moderate, high ad very high risk categories, respectively. LccEM correlated with aPWV ( $\rho=0.58$ ,  $p<0.001$ ) and lccIMT ( $\rho=0.25$ ,  $p=0.025$ ), while lccPWV correlated with aPWV ( $\rho=0.35$ ,  $p=0.002$ ) but not with lccIMT. In a binary logistic regression model including age, lccEM, lccPWV, lccIMT and aPWV as independent variables, age (OR=1.098, CI=1.017-1.185;  $p=0.017$ ) and lccPWV (OR=1.717, CI=1.053-2.801;  $p=0.030$ ) were independent predictors of high/very high CV risk. Carotid speckle-tracking ultrasonography might provide additive information for the CV risk stratification in dyslipidemic patients.

## PANCREATIC TISSUE SELECTIVE PCSK9 DEFICIENCY IMPACTS BETA CELLS FUNCTION AND INSULIN RELEASE IN MICE MODELS

L. Da Dalt<sup>1</sup>, A. Galli<sup>2</sup>, C. Perego<sup>2</sup>, L. Arnaboldi<sup>2</sup>, P. Cappello<sup>3</sup>, A.L. Catapano<sup>1,4</sup>, G.D. Norata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano;

<sup>3</sup>Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze della Salute, Università degli Studi di Torino; <sup>4</sup>IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milano  
E-mail: lorenzo.dadalt@unimi.it

**Background and Aim.** Meta-analysis and mendelian randomization studies have showed that PCSK9 or HMGCoA-R loss of function polymorphisms, although being associated with lower LDL-Cholesterol levels result in increased risk of developing new-onset T2D. Experimental studies in animal models confirmed that PCSK9 deficiency results in endocrine pancreas dysfunction with increased beta cells insulin content and impaired functionality.

Aim of thi study was to investigate the molecular mechanisms responsible for this observation. Methods: Pcsk9 KO, WT, albumin (Alb) Cre+/Pcsk9LoxP/LoxP (liver selective Pcsk9-KO mice) and (Pdx1) Cre+/Pcsk9LoxP/LoxP (pancreas selective Pcsk9-KO mice) were used and fed for 20 weeks with chow diet and standard fat diet. GTT, ITT, insulin and C-peptide plasma levels, pancreas morphology, cholesterol and triglycerides accumulation in pancreatic islets were investigated in the different animal models.

**Results.** Glucose clearance was impaired in PCSK9 KO mice compared to WT. A similar profile was observed in (Pdx1) Cre+/PCSK9fl/fl compared to their controls (Pdx1) Cre-/PCSK9fl/fl but not in (Alb) Cre+/PCSK9fl/fl mice. Insulin response (ITT test) was preserved in the different animal models. A detailed analysis of pancreas morphology revealed no difference in the islets of (Alb) Cre+/PCSK9fl/fl compared to controls, while (Pdx1) Cre+/PCSK9fl/fl presented increased cholesterol esters accumulation similar to what previously reported for PCSK9 KO mice.

**Conclusion/Discussion.** PCSK9 impacts cholesterol and fatty acid metabolism in pancreas thus affecting beta cell functionality and insulin secretion. These findings extend our previous observation, showing that pancreatic PCSK9 but not circulating (liver produced) PCSK9 impact beta cells functionality. This supports the observation that available anti-PCSK9 therapies, which target circulating PCSK9, might have a limited impact on glucose metabolism as opposed to statins.

## GENDER RELATED DIFFERENCES IN TWO TYPES OF WEIGHT LOSS INTERVENTION

M. D'Abbondanza<sup>1</sup>, E.E. Martorelli<sup>1</sup>, G. Mondovecchio<sup>1</sup>, M.A. Ricci<sup>1</sup>, S. De Vuono<sup>1</sup>, S. Ministrini<sup>1</sup>, E. Nulli Migliola<sup>1</sup>, A.R. Roscini<sup>1</sup>, D. Siepi<sup>1</sup>, M.T. Paganelli<sup>2</sup>, G. Lupattelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Internal Medicine, Department of Medicine, "Santa Maria della Misericordia" Hospital, University of Perugia; <sup>2</sup>Unit of General Surgery, "Santa Maria della Misericordia" Hospital, Perugia  
E-mail: marcodabbo@virgilio.it

**Background and Aims.** The prevalence of obesity is higher in women than men (1). However, only a few studies (2, 3) described gender effect on surgical and non-surgical interventions, with discordant results. The aim of our study was to investigate whether and how gender influences weight loss in two different populations, after a surgical intervention (sleeve gastrectomy) and dietary intervention (Ketogenic diet).

**Methods.** We enrolled 125 patients with morbid obesity (BMI 40 kg/m<sup>2</sup> or 35 kg/m<sup>2</sup> + comorbidity) eligible to sleeve gastrectomy (group 1) and a group of 40 patients following a ketogenic diet (group 2). We evaluated anthropometric parameters, peripheral blood pressure, biochemical and serum analysis at the enrollment and at twelve months after interventions.

**Results.** In the whole population there was a female prevalence (70% in group 1 and 61% in group 2); there were no differences in terms of age and blood pressure between gender in both groups. However, males presented increased adiposity (measured as VFA and fat mass) in both groups and a worse glyco-metabolic profile in group 1. Only after ketogenic diet we observed a significant difference between sexes in total weight loss (7.4% in males vs 5.9% in females, p<0.05) and excess of body weight loss (15.7% in males vs 12.1% in females, p<0.05) in favour of male population.

**Conclusion.** Male subjects, beyond a higher weight and BMI, had a worse glyco-metabolic pattern. No significant difference between sexes was found in weight loss in group 1 patients; on the contrary, male patients seemed to have a major benefit from ketogenic diet in comparison to female population. Gender differences in weight loss intervention could be determined by several factors: hormonal profiles, different body composition or higher initial weight in males. Further studies are necessary to investigate the determinants of these differences.

## References

1. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet. 2018. [WWW document]. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Williams RL, Wood LG, Collins CE, Callister R. Effectiveness of weight loss interventions—is there a difference between men and women: a systematic review. *Obes Rev*. 2015 Feb;16:171-86.
3. Robertson C, Avenell A, Boachie C, Stewart F, Archibald D, Douglas F, Hoddinott P, van Teijlingen E, Boyers D. Should weight loss and maintenance programmes be designed differently for men? A systematic review of long-term randomised controlled trials presenting data for men and women: The ROMEO project. *Obes Res Clin Pract*. 2016; 10: 70-84.

## EFFECT OF DIFFERENT AEROBIC EXERCISES (ENDURANCE TRAINING VS HIGH INTENSITY INTERVAL TRAINING) ON LIPID PROFILE AND LIPOPROTEINS SUBFRACTION IN OBESE PEOPLE: A RANDOMIZED CONTROL TRIAL

A. D'Amuri<sup>1</sup>, J.M. Sanz<sup>1</sup>, F. Vaccari<sup>2</sup>, E. Capatti<sup>3</sup>, F. Di Vece<sup>3</sup>, E. Dalla Nora<sup>3</sup>, G. Zuliani<sup>1</sup>, S. Lazzer<sup>2</sup>, A. Passaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Science, University of Ferrara;

<sup>2</sup>Department of Medicine, University of Udine; <sup>3</sup>Department of Medicine, Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara

E-mail: dmrndr@unife.it

**Introduction.** Exercise and diet are the first line treatment to prevent cardiovascular disease because have proved an evident benefit on cardiovascular morbidity and mortality. Guidelines suggests worldwide to engage at least 150 min/week of moderate intensity continuous physical activity (Endurance Training, ET) in apparently healthy people to preserve physical fitness and prevent non communicable diseases and 250-400 min/sett of the same exercise to induce weight loss in obese people (1). However, compliance to those indications is still low, mainly because lack of time. High Intensity Interval Training (HIIT) is characterized by short bouts of high-intensity exercise alternating with periods of low-intensity exercise. It is a feasible, well tolerated (2) and time sparing training that requires up to 40% less time than ET for an iso-energetic session of exercise (3). Moreover, HIIT appear to be similarly effective respect ET in weight loss (4) and body fat reduction (3) and also more efficient in improving cardio-respiratory fitness (5). Nevertheless, how HIIT affect lipid profile is still unclear. We conduct a randomized control trial to compare the effect of ET and HIIT on lipid profile and lipoprotein sub-fraction in obese people.

**Methods.** Inclusion criteria were age between 18 and 50 years old and body mass index (BMI)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ . Subjects who had cardiovascular, respiratory, neurologic, muscular-skeletal, metabolic and/or endocrine diseases or those who were taking any drugs known to influence energy metabolism were excluded. Finally, thirty-two obese adults (mean age: 39 years, mean BMI: 36 kg/m<sup>2</sup>) were randomized to execute 34 iso-energetic (20 KJ per kg of Fat-Free Mass) different exercise sessions in 16 weeks: ET (60% of the initial VO<sub>2peak</sub>) or HIIT (3-7 repetition of 3 min bouts 100% of VO<sub>2</sub> peak interspersed by 1.5 min 50% of VO<sub>2peak</sub>). Every session includes 10 min of warm up a 5 min of cool down. Before and after intervention we evaluate Total-Cholesterol (Tot-C), Low Density Lipoprotein-Cholesterol (LDL-C), Triglycerides, High Density Lipoprotein-Cholesterol (HDL-C), noHDL-Cholesterol, Tot-C/HDL-C ratio, Apo-B100, Apo-A1. Lipoprotein sub-fraction were assessed by non-denaturized polyacrylamide gel electrophoresis and the Lipoprint system.

**Results.** Both exercises improved (all p<0.05) Tot-C (-17.8 mg/dl), LDL-C (-15.6 mg/dl), noHDL-Cholesterol (-16 mg/dl), Tot-C/HDL-C ratio (-0.22) and Apo-B100 (-7.4 mg/dl) with no intervention effect. There was no variation in Triglycerides, HDL-C or Apo-A1 but percentage of Large-HDL particles increased in both types of exercise (+2.94%) with no significant differences in percentage of Intermediate- and Small-HDL particles. HIIT sessions required about 22% less time than ET sessions (44.3 vs 33.6 min; p<0.001).

**Conclusion.** We observed that HIIT is non inferior to ET in improving lipid profile and might be an useful strategy to increase patient's compliance in practice exercise. Further studies must assess if HIIT improves cardiovascular morbidity and mortality as ET does despite the modest effect on LDL-C and which biological pathways are involved.

## References

- 1 Appropriate Physical Activity Intervention Strategies for Weight Loss and Prevention of Weight Regain for Adults, 2011. American College of Sport Medicine.
- 2 Türk, Y., et al. High intensity training in obesity: a Meta-analysis. *Obesity science & practice*. 2017; 3:3: 258-271.
- 3 Wewege M, et al. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 2017; 18:6: 635-646.
- 4 Jolleyman, Charlotte, et al. The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: a meta-analysis. *Obesity reviews*. 2015; 16:11: 942-961.
- 5 Milanović, Zoran, Goran, Sporiš, Matthew Weston. Effectiveness of high-intensity interval training (HIT) and continuous endurance training for VO<sub>2max</sub> improvements: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Sports medicine*. 2015; 45:10: 1469-1481.

## DIRECT ORAL ANTICOAGULANTS IN LIPOPROTEIN APHERESIS: HANDLE WITH CARE

B. Dal Pino, F. Sbrana, A. Papa, F. Bigazzi, L. Panchetti, M. Pianelli, R. Luciani, T. Sampietro

*Lipoapheresis Unit, Reference Center for Diagnosis and Treatment of Inherited Dyslipidemias, Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa*

E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

**Background.** Direct oral anticoagulants (DOAC) are used in clinical practice for the stroke prevention in non-valvular atrial fibrillation and in treatment/prevention of thromboembolism. The aim of the study was to the revised the DOAC use in patients affected by Familial Hypercholesterolemia and ischemic heart disease that undergone chronic Lipoprotein-Apheresis (LA).

**Methods.** In our Center, 7/34 subjects are on oral anticoagulant therapy, in addition to antiplatelet therapy. Data of these patient were revised.

**Results.** 6/7 subjects are treated for non-valvular atrial fibrillation and the other case for pulmonary thromboembolism. One patient denied his consent to DOAC therapy and continued vitamin K antagonist. Another subject, after few months of therapy with dabigatran 110 mg BD discontinued DOAC because of vasospastic angina, starting again vitamin K antagonist until the symptom's remission. The symptoms were imputable to lower concentration of verapamil secondary to pharmacokinetic interaction between dabigatran and verapamil extended release formulation. A third patient is currently treated with rivaroxaban 15 mg OD, after pulmonary thromboembolism occurred during LA procedure, imputable to recent transcatheter mitral valve repair. During the follow-up the patient had an hospital admission for severe anaemia (Hb 7.7 g/dl) caused by gastrointestinal bleeding, which required blood transfusions. The other four subjects are regularly treated with dabigatran 110mg BD, but despite a correct plasma peak/trough diluted thrombin clotting time, 3/4 subjects reported a significant decrease in haemoglobin levels and the other subject reported two acute coronary syndromes.

**Conclusions.** The occurrence of 4 episodes of clinically relevant bleeding (Hb decrease  $\geq 2 \text{ g/dl}$  in 3 cases and a major bleeding) is a complication that suggest caution. Our experience, although the small patient group, underlines the need to personalize medical treatment, especially in subjects with comorbidities and multiple drug therapy that undergone extracorporeal procedure.

## THE TREATMENT OF THE VERY HIGHLY RISK PATIENT IN ITALY: A PARADOXIAL CASE

D. D'Ardes, I. Rossi, F. Vezzani, F. Cipollone, M. Bucci  
*Centro Ipertensione e Dislipidemie, Università di Chieti*  
*E-mail: mbucci@unich.it*

A 26-yo male came to us in 2018 for suspected familial hypercholesterolemia (FH) treated with atorvastatin 80/ezetimibe 10mg. Treatment was quite effective (LDL-C 94-70 mg/dL) but poorly tolerated for myalgia with a slight CPK rise (2x UNL). He also had hyper-Lp(a), stably between 70-90 mg/dL during treatment. Severe atherosclerotic CAD already complicated his hypercholesterolemia: in 2016, had NSTEMI with PTCA stenting on proximal and mean RCA and Cx/MO). His mother (52-yo) also had high LDL-C (=244 during Lovastatin 40 mg); grandfather had hypercholesterolemia complicated by AMI when was 55-yo and died for re-AMI at 59-yo. Her DLS was ≥10 but couldn't be immediately treated with PCSK9-i for the background therapy, not accepted by the AIFA register to access PCSK9-i. Our patient had DLS=6 and LDL-C 70 mg/dL, so he too couldn't start PCSK9-i. In 2018, ESC/EAS Guidelines' recommended LDL-C target respectively <70 for our very-hi-risk patient and <100 mg/dL for his hi-risk mother, but PCSK9-i could have been started only if LDL-C was ≥30 mg/dL higher than recommended targets. We modified both patients' therapy (rosuvastatin/ezetimibe 20/10 for mother; atorvastatin (poorly tolerated) reduced to 40 mg for son) and immediately performed a genetic test on patients, positive for the variant c.2054C>T, p. (Pro685Leu) of LDLR gene in heterozygosis, pathogenetic regarding FH. No variants associated with elevated Lp(a) have been identified. Recently, patients returned for control: mother had LDL-C =135 and started treatment while son still had 96 mg/dL, which didn't allow to start PCSK9-i despite 2019 Guidelines have reduced LDL-C targets (<55 mg/dL) and now our patient has an LDL-C 80% higher than his recommended target! Due to his characteristics (high Lp(a), very-high CV risk), even more paradoxical is that he could access LDL-Apheresis (refused due to logistical problems) which would cost much more than PCSK9-i treatment. In conclusion: the time has probably come for Italian regulatory Agencies to review access rules for treatments that, even if so expensive, in some cases can no longer be ethically inhibited in patients with similar characteristics.

## SANGER VALIDATION OF HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING IN GENETIC DIAGNOSIS: STILL THE BEST PRACTICE?

R. De Cario<sup>1</sup>, E. Sticchi<sup>1</sup>, A. Kura<sup>1</sup>, S. Suraci<sup>1</sup>, S. Galora<sup>1</sup>, A. Magi<sup>1</sup>, A. Volta<sup>1</sup>, R. Marcucci<sup>1</sup>, S. Nistri<sup>2</sup>, G. Pepe<sup>3</sup>, B. Giusti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Critical Medical Care and Medical Specialities, University of Florence; <sup>2</sup>Cardiology Service, Centro Medico Strumentale Riabilitativo (CMSR) Veneto Medica, Altavilla Vicentina;

<sup>3</sup>Marfan Syndrome and Related Disorders Regional (Tuscany) Referral Center, Careggi Hospital, Florence  
*E-mail: decariorosy@hotmail.it*

**Background.** Next-generation sequencing (NGS) is crucial in supporting genetic diagnosis and personalized medicine, this leading to Guidelines for Diagnostic NGS by the ESHG society. Factors of different nature might produce false-positive or -negative NGS data; Sanger validation (costly, time consuming and not completely error-free) is still recommended in genetic diagnosis. We reported the analysis of 4 cases of discrepancy between NGS and Sanger sequencing in a cohort of 229 patients admitted to the Advanced Molecular Genetics Laboratory, Careggi Hospital-University of Florence.

**Methods.** NGS was performed by Illumina MiSeq® and Haloplex/SureSelect protocols targeting 97 connectivopathies genes and 55 familial hypercholesterolemia genes. Variants passing GATK hard filtering method (QD<2.0, FS>60.0, MQ<40.0, MQ Rank Sum<12.5, Read Pos Rank Sum <8.0) were Sanger validated.

**Results.** Four variants in LTBP2 (n=2), COL5A2 (n=1) and TGFB1(n=1) showed a discrepancy between NGS and Sanger (heterozygous/homozygous or viceversa). Concerning one LTBP2 and COL5A2 variants, they were subjected to a second round of Sanger validation with newly designed primers as the previous primers were designed in a sequence carrying polymorphisms; the second validation confirmed the NGS datum. Concerning the other LTBP2 variant, the second pair of primers in a region not affected by polymorphisms didn't solve the discrepancy; the choice of a further primer combination confirmed the NGS call. Regarding TGFB1, the discrepancy was solved by PCR, using the same primers used for the discrepant Sanger sequencing, followed by restriction fragment length polymorphism approach (AluI enzyme), demonstrating the problem was ascribable to difficulties of Sanger sequencing in that region.

**Conclusions.** Our data confirm the importance to accurately evaluate the presence of polymorphisms when designing Sanger validation primers and indicate, in case of discrepancy, that Sanger sequencing might not be the gold standard. Our data together with those of literature indicating the growing accuracy of NGS technologies/pipelines of variants calling, raise a discussion on the opportunity to update guidelines on the NGS work-flow in genetic diagnosis.

## VASCULAR EFFECTS OF CANAGLIFOZIN ON VISCERAL ADIPOSE TISSUE ARTERIOLES FROM OBESE PATIENTS

A. De Stefano<sup>1</sup>, F. Schinzari<sup>2</sup>, G.S. Sica<sup>3</sup>, P. Gentileschi<sup>3</sup>, N. Di Daniele<sup>1</sup>, C. Cardillo<sup>2</sup>, M. Tesauro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Systems Medicine, Tor Vergata University, Rome;

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Catholic University, Rome;

<sup>3</sup>Department of Surgery, Tor Vergata University, Rome

E-mail: alessandrodestefano6@virgilio.it

Sodium-glucose cotransporter (SGLT-2) inhibitors have shown to improve cardiovascular outcomes in diabetes. Whether these drugs have also benefits to induce vasodilation in obese vessels is unknown. Aim of the study is to investigate the possible vasoactive properties of the SGLT-2 inhibitor canagliflozin in obese vessels. Visceral adipose tissue (VAT) is obtained from obese patients undergoing bariatric surgery and from control subjects undergoing laparoscopic surgery. Microarteries (150-450 µm) were dissected from each fat sample and mounted on wire myograph (DMT, Aarhus, Denmark). Vessels were pre-contracted by use of U46619 (1 µM) and the endothelium-dependent (bradykinin, BK 0.1 nM to 10 µM) and -independent (sodium nitroprusside, SNP 0.01 µM to 100 µM) relaxation was assessed. Direct vascular reactivity of canagliflozin (0.5 µM to 100 µM) were assessed by exposing the vessels of obese and lean VAT to cumulative concentrations of this drug. The mechanisms underlying canagliflozin-induced relaxation were investigated by pre-incubating microarteries with either the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (100 µM), or the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 µM), or the hydrogen peroxide scavenger catalase (500 U/ml). Vascular effect of canagliflozin was tested in the vessels with intact and denuded endothelium. Concentration response curves were analyzed by two-way Anova for repeated measures. Endothelium-dependent relaxation is reduced in microarteries of obese VAT compared to lean VAT ( $P=0.0002$ ). Endothelium-independent relaxation did not show any difference ( $P=0.166$ ). Canagliflozin elicits relaxation in arterioles from obese and lean VAT ( $P=0.0005$ ). Canagliflozin-induced relaxation is not modified after pre-incubating microarteries with inhibitors ( $P=0.667$ ). Any differences were found when vascular effect of canagliflozin was tested in vessels with intact and denuded endothelium ( $P=0.551$ ). Canagliflozin showed direct vasodilator properties in microarteries of obese patients through endothelium-independent mechanisms. Our findings support the evolving concept of ancillary cardiovascular properties of SGLT-2 inhibitors, even though further studies are needed to elucidate the signaling pathways involved.

## STATINS REDUCE MAJOR ADVERSE LIMB EVENTS AND MORTALITY IN PATIENTS WITH PERIPHERAL ARTERY DISEASE

F. Del Sole<sup>1</sup>, D. Pastori<sup>1</sup>, A. Farcomeni<sup>2</sup>, A. Milanese<sup>2</sup>, D. Menichelli<sup>1</sup>, W.R. Hiatt<sup>3</sup>, F. Viol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I Clinica Medica, Atherothrombosis Centre, Department of

Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University of Rome; <sup>2</sup>Department of Public Health and Infectious Diseases, Sapienza University of Rome; <sup>3</sup>Department of Medicine,

Division of Cardiology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, Colorado, USA

E-mail: francesco.delsole@uniroma1.it

**Background.** Statins are guideline recommended in patients with peripheral artery disease (PAD) for prevention of cardiovascular events. However, comprehensive meta-data on the impact of statin therapy on major adverse limb events (MALE) in PAD patients have not been reported.

**Objectives.** To examine the association of statin use with MALE events, all-cause death, and the composite cardiovascular endpoints cardiovascular death and stroke in patients with PAD.

**Methods.** We performed a systematic review of literature by searching PubMed (via MEDLINE) and Cochrane (CENTRAL) databases for clinical studies addressing the impact of statin therapy on different outcomes. The main outcomes were MALE (various definitions including amputation, graft occlusion/revascularization), all-cause death, composite cardiovascular endpoints, cardiovascular death and stroke.

**Results.** We included 51 studies with 138,060 PAD patients, of whom 48,459 (35.1%) were treated with statins. The studies included 2 randomized controlled trials, 20 prospective cohorts and 29 retrospective cohorts. Overall, 11,396 MALE events, 21,624 deaths, 4,852 composite cardiovascular endpoints, 4,609 cardiovascular deaths, and 860 strokes were used for the analysis. Statins reduced the incidence of MALE by 30% (pooled Hazard Ratio [HR] 0.702, 95% Confidence Interval [CI] 0.605-0.815) and amputations by 35% (HR 0.654, 95%CI 0.522-0.819), all-cause mortality by 39% (pooled HR 0.608, 95% CI 0.543-0.680), cardiovascular death by 41% (HR 0.594, 95%CI 0.455-0.777), composite cardiovascular endpoints by 34% (pooled HR 0.662, 95% CI 0.591-0.741) and ischemic stroke by 28% (pooled HR 0.718, 95%CI 0.620-0.831). Sex, age, diabetes and length of follow-up were not significant predictors for MALEs and mortality at meta-regression analysis.

**Conclusions.** Statins reduce the incidence of MALE, all-cause and CV mortality in patients with PAD. In PAD, a high proportion of MALE events and deaths could be prevented by implementing a statin prescription in this patient population.

## TREATMENT WITH VOLANESORSEN (VLN) REDUCED TRIGLYCERIDES AND PANCREATITIS IN PATIENTS WITH FAMILIAL CHYLOMICRONEMIA SYNDROME (FCS) AND SEVERE HYPERTRIGLYCERIDEMIA (SHTG) VS PLACEBO: RESULTS OF THE APPROACH AND COMPASS STUDIES

L. D'Erasmo<sup>1</sup>, S.D. Freedman<sup>2</sup>, A. Gelrud<sup>3</sup>, A. Digenio<sup>4</sup>, V.J. Alexander<sup>5</sup>, A. Hsieh<sup>4</sup>, I. Gouni-Berthold<sup>6</sup>, E. Bruckert<sup>7</sup>, E. Stroes<sup>8</sup>, R.S. Geary<sup>5</sup>, S.G. Hughes<sup>5</sup>, D. Gaudet<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Sapienza University of Rome; <sup>2</sup>Beth Israel Deaconess Medical Center, The Pancreas Center, Boston MA, USA; <sup>3</sup>Miami Cancer Institute, Miami, FL, USA; <sup>4</sup>Akcea Therapeutics Inc, Cambridge, MA, USA; <sup>5</sup>Ionis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA; <sup>6</sup>Polyclinic for Endocrinology, Diabetes and Preventive Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>7</sup>Institut E3M et IHU Cardiometabolique (ICAN), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>8</sup>Dept. Vascular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; <sup>9</sup>Dept of Medicine, Université de Montréal, Chicoutimi, QC, Canada  
E-mail: laura.derasmo@uniroma1.it

**Introduction.** FCS is a rare genetic disease characterized by severe chylomicronemia, sHTG and consequent risk of potentially fatal recurrent and acute pancreatitis (AP). HTG-induced AP has a more severe course, causing worse outcomes.

**Methods.** APPROACH randomized 67 FCS patients (66 dosed), fasting TGs  $\geq$ 750 mg/dL, 1:1 to 52 weeks of weekly VLN (300 mg) or placebo (PBO). COMPASS randomized 114 sHTG patients (113 dosed), fasting TGs  $\geq$ 500 mg/dL, 2:1 to VLN or PBO weekly for 26 weeks (dosing adjustments allowed at 3 months). Endpoints included % reduction in serum TGs at 13 weeks and TX-emergent pancreatitis.

**Results.** Combined COMPASS & APPROACH results showed a significant reduction ( $p=0.0185$ ) in pancreatitis events (1event/1 patient - VLN; 9 events/6 patients - PBO). Patients in APPROACH with  $\geq$ 2 pancreatitis events in 5 years (pre-randomization) suffered no attacks during study TX-period ( $p=0.02$ ). In APPROACH, VLN-group (n=33) month 3 TGs decreased by 77% and increased by 18% in PBO-group (n=33) ( $p<0.0001$ ). In COMPASS, VLN decreased TGs 71% ( $p<0.0001$ ) (n=75) after 3 months, compared with 1% decrease in PBO (n=38). The most common AE with VLN was injection site reactions (average % injections w/ $\geq$ 1 LCRIS: 12% FCS/24% sHTG). Declines in platelet counts led to 5 early terminations in APPROACH, 2 had platelets  $<$ 25,000/ $\mu$ l; platelet counts recovered to normal after VLN was stopped. COMPASS had no serious platelet events, but 1 potentially related SAE reported as serum sickness occurred 2 weeks after the last study dose.

**Conclusions.** VLN treatment reduced TGs and consequent AP risk in FCS and sHTG patients.

## VALUES OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE, DIASTOLIC BLOOD PRESSURE, PULSE WAVE ANALYSIS, PULSE WAVE VELOCITY AND ANKLE BRACHIAL INDEX IN HYPERCOLESTEROLEMIC PATIENTS AFFECTED BY FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA AND NOT AFFECTED BY HYPERCHOLESTEROLEMIA

C. Ferrari, S. D'Addato, A. F.G. Cicero, S. Palmisano, C. Borghi  
Università di Bologna, Ospedale Sant'Orsola  
E-mail: caterina.ferrari@studio.unibo.it

The present study investigates the correlation between hypercholesterolemia and hypertension, a correlation that has already been widely examined in previous studies (1). It is an observational and prospective case-control study in which hypercholesterolemic subjects were divided into 2 groups:

- an FH group: a case group made up of 18 patients (7 men, 11 women) with familial hypercholesterolemia with an LDLR mutation. These patients were enrolled starting from the LIPIDEN project database (2);
- a NON-FH group: a control group consisting of 36 patients (14 men, 22 women) not affected by familial hypercholesterolemia. The average age was 44 years  $\pm$ 11 in the FH group and 45 years  $\pm$ 5 in the NON-FH group. The average total cholesterol values were  $189\pm35$  mg/dl in the FH group and  $194\pm18$  mg/dl in the NON-FH group. The average LDL cholesterol values were  $118\pm30$  mg/dl in the FH group and  $119\pm16$  mg/dl in the NON-FH group. Patients below the age of 18 and patients treated with antihypertensive drugs were excluded. The study population was tested with Vicorder (Skidmore Medical Ltd, UK) to collect 5 hemodynamic parameters:

- Systolic Blood Pressure (SBP).
- Diastolic Blood Pressure (DBP).
- Augmentation Index (AIx, a predictor of arterial stiffness recorded within the Pulse Wave Analysis or PWA).
- Pulse Wave Velocity (PWV, another predictor of arterial stiffness).
- Ankle Brachial Index (ABI, a predictor of peripheral artery disease).

Subsequently these values were compared between the two groups, searching for any significant differences: SBP: FH group:  $125\pm11$  mmHg; NON-FH group:  $122\pm16$  mmHg DBP: FH group:  $65\pm9.5$  mmHg; NON-FH group:  $69\pm6$  mmHg ( $p=0.043$ ) AIx: FH group:  $28\pm6\%$ ; NON-FH group:  $24\pm8\%$  PWV: FH group:  $8.1\pm1.4$  m/s; NON-FH group:  $8.3\pm0.7$  m/s ABI: FH group:  $1.11\pm0.08$ ; NON-FH group:  $1.10\pm0.09$ . The results showed that the FH group had significant lower values of diastolic blood pressure compared to the NON-FH group ( $p<0.05$ ). A possible role of the LDLR mutation in influencing this difference is still to be investigated. The comparison of the other hemodynamic parameters did not reveal significant differences between the two groups.

### References

1. Borghi C, Urso R, Cicero AF. Renin-angiotensin system at the crossroad of hypertension and hypercholesterolemia. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2017; 27: 115-120.
2. Averna M, Cefalù AB, Casula M, et al. Familial hypercholesterolemia: The Italian Atherosclerosis Society Network (LIPIDEN). Atherosclerosis Supplements. 2017; 29: 11-16.

## IMPAIRED HDL CHOLESTEROL EFFLUX CAPACITY IN SUBJECTS WITH METABOLICALLY- BUT NOT GENETICALLY- DRIVEN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)

A. Di Costanzo<sup>1</sup>, L. D'Erasmo<sup>1</sup>, A. Ronca<sup>2</sup>, M. Manfredini<sup>3</sup>, F. Baratta<sup>1</sup>, D. Pastori<sup>1</sup>, L. Polito<sup>1</sup>, M. Di Martino<sup>4</sup>, F. Angelico<sup>5</sup>, M. Del Ben<sup>1</sup>, E. Favari<sup>2</sup>, M. Arcal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine and Medical Specialties,

Sapienza University of Rome; <sup>2</sup>Department of Food and Drug, University of Parma, Parco Area delle Scienze, Parma;

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Parco Area delle Scienze, Parma; <sup>4</sup>Department of Radiological Sciences, Sapienza University of Rome; <sup>5</sup>Department of Public Health and Infectious Disease, Sapienza University of Rome

E-mail: alessia.dico@gmail.com

**Background and Aims.** NAFLD is a common multi-factorial disease characterized by increased hepatic fat. Although NAFLD associates with increased risk of atherosclerotic cardiovascular disease, we speculate that this risk could differ in the different NAFLD subtypes, e.g. metabolically or genetically-driven. Recently, by comparing subjects with NAFLD due to metabolic disturbances to those with genetic NAFLD due to rs738409 PNPLA3 MM genotype, we found that the burden of carotid intima-media thickness was higher in metabolically but not in genetically-driven NAFLD. A mechanistic explanation of this difference is not available. Cholesterol efflux capacity (CEC) and cholesterol loading capacity (CLC), represent a key metric of high-density lipoprotein (HDL) function able to predict atherosclerotic cardiovascular disease (CVD). Therefore, this project was designed to test whether CEC and CLC are altered in metabolically- but not in genetically-determined NAFLD.

**Methods.** CEC and CLC were measured in three groups:

- 1) 19 individuals with hepatic steatosis due to metabolic disturbances and wild-type PNPLA3 genotype (metabolic NAFLD - group M);
- 2) 10 patients with NAFLD associated with the rs738409 PNPLA3 GG genotype (Genetic NAFLD - group G);
- 3) 10 healthy blood donors, PNPLA3 wild-type and without NAFLD (Controls). Hepatic fat fraction (HFF) was measured using magnetic resonance (MRS/MRI).

Metabolic syndrome (MetS) was defined using the NCEP ATP III definition, with abnormal values for at least 3 of the 5 criteria. HDL CEC was evaluated by radio isotopic techniques, plasma CLC was measured by a fluorimetric assay.

**Results.** NAFLD cases and controls did not differ with respect to age and sex because they were matched on these criteria. Compared with group G, group M cases had increased adiposity indices, dyslipidemia, insulin resistance and elevated ALT levels (all P<0.05). As expected, group G and controls showed similar anthropometric and metabolic characteristics. Compared with group G, HDL CEC of group M was impaired both as a whole (average reduction of 19%; P<0.0001) and with respect to specific membrane cholesterol transporters (-14.2% for aqueous diffusion; P<0.001; -25% for ABCA1-efflux; P<0.001; -16.3% for ABCG1-efflux; P=0.001; -15.4% for SRBI-efflux P=0.04). No difference in total CEC was found between group G and controls (P=0.82). When the participants in group M were further categorized according to the presence and absence of MetS diagnosis, a steady decrease of total CEC was observed from cases of group G to individuals in group M/MetS- to individuals in group M / MetS+, with the greater re-

duction of total CEC in the latter group (P for trend =0.001). As total CEC values positively correlated with HDL-C levels in our cohort (P=0.004), we further distributed HDL-C values according to quartiles, showing that plasma isolated from group M individuals promoted significantly lower total efflux from macrophages compared to group G cases with similar HDL-C levels (all P<0.025). To study the overall serum proatherogenic potential, we further evaluated CLC in NAFLD patients and controls. Plasma-induced cholesterol content increase resulted significantly higher in group G compared to group M patients ( $35.4 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$  vs.  $30.0 \pm 3.2 \mu\text{g/ml}$ , P<0.001). After adjustment for BMI, HDL-C, HOMA-IR and ALT levels or HFF%, mean Total CEC and CLC values in group G were significantly higher than those of group M (all Padj <1x10<sup>-7</sup>). **Conclusions.** Our data suggest that metabolically, but not genetically driven NAFLD may be associated with dysfunctional high-density lipoproteins (HDLs). These data led us to concentrate our attention on the functionality of HDL as a potential link between metabolic driven NAFLD and subclinical atherosclerosis.

## ASSOCIATION BETWEEN CARDIAC NATRIURETIC PEPTIDES AND LIPID PROFILE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

C. Di Pentima<sup>1</sup>, F. Spannella<sup>1</sup>, F. Giulietti<sup>1</sup>, M. Bordicchia<sup>2</sup>, R. Sarzani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Internal Medicine and Geriatrics, IRCCS INRCA, Ancona;

<sup>2</sup>Department of Clinical and Molecular Sciences, University "Politecnica delle Marche", Ancona

E-mail: chiara.dipentima@live.it

**Objective.** Cardiac natriuretic peptides (NPs) play a fundamental role in maintaining cardiovascular (CV) and renal homeostasis. Moreover, they also affect glucose and lipid metabolism. We performed a systematic review and meta-analysis of studies investigating the association of NPs with serum lipid profile.

**Methods.** A PubMed and Scopus search (2005-2018) revealed 45 studies reporting the association between NPs and components of lipid profile [total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDLc), high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) and triglycerides (TG)].

**Results.** Despite high inconsistency across studies, NPs levels were inversely associated with TC [pooled r=-0.09; I<sup>2</sup>=90.84%], LDLc [pooled r=-0.09; I<sup>2</sup>=79.74%] and TG [pooled r=-0.11; I<sup>2</sup>=94.14%], while they were directly associated with HDLc [pooled r=0.06; I<sup>2</sup>=87.85%]. The relationship with LDLc, HDLc and TG lost significance if only studies on special populations (works including subjects with relevant acute or chronic conditions that could have significantly affected the circulating levels of NPs or lipid profile) or low-quality studies (NOS<5) were taken into account.

**Conclusions.** The present study highlights an association between higher NP levels and a favorable lipid profile. This both confirms and extends our understanding of the metabolic properties of cardiac NPs and their potential in CV prevention.

## ACETYLSALICYDIC ACID PREVENTS THE PRO-CALCIFIC DIFFERENTIATION OF VALVULAR INTERSTITIAL CELLS THROUGH THE PRODUCTION OF ANTI-INFLAMMATORY LIPOXINS

M. Donato<sup>1</sup>, E. Bertacco<sup>2</sup>, E. Faggin<sup>1</sup>, A. Sala<sup>3</sup>, C. Bolego<sup>1</sup>, M. Puato<sup>2</sup>, G. Arrigoni<sup>4</sup>, C. Agostini<sup>2</sup>, P. Pauletto<sup>2</sup>, M. Rattazzi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova; <sup>3</sup>Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano;

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova

E-mail: maristella.donato@studenti.unipd.it

**Introduction.** Calcific aortic valve disease (CAVD) is the third most common cardiovascular disease in the western world. To date, no pharmacological therapy has proven to prevent or slow down the progression of CAVD.

**Aim.** To study the effect of acetylsalicylic acid (ASA) and ASA-triggered lipoxins (ATL) on interstitial valve cells calcification (VIC).

**Methods.** A clone of VIC able to acquire a pro-calcific phenotype was treated with endotoxin (LPS, 500 ng/ml) to induce the calcification and with ASA at two different concentrations (1 mM e 10 mM). Alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium deposition were determined through colorimetric assays. Proteins and RNA were extracted from VIC to perform western blotting (WB) and RT-PCR analyses. A RP-HPLC analysis was conducted on the culture medium to assess the production of arachidonic acid metabolites and ATL (such as PGE2, 15HETE, LTB4 e 15-epi-LXA4). Lastly, immunohistochemical analysis was performed on pathological valves to investigate the expression of FPR2 (ATL receptor).

**Results.** The treatment of VIC with ASA 10 mM reduced ALP activity ( $p<0.001$ ), calcium deposition ( $p<0.05$ ) and the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ,  $p<0.001$ ), induced by LPS. Moreover, the cells treated with ASA showed an increased production of ATL, such as 15-HETE and 15-epi-LXA4 ( $p<0.001$ ). We also observed that FPR2, the main ATL receptor, was expressed within human pathological valves and was increased in VIC treated with LPS. Finally, the in vitro studies showed a significant inhibition of ALP activity in VIC treated with MMK1 (50  $\mu$ M), a selective agonist for FPR2.

**Conclusion.** The treatment with ASA inhibits the pro-calcific differentiation of VIC and this effect might be partly due to the action of ATL. The anti-calcific effect of FPR2 activation can offer the opportunity to develop novel therapeutic strategies for CAVD.

## EFFICACY AND SAFETY OF BEMPEDOIC ACID: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF PHASE 2 AND 3 RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS

F. Fogacci<sup>1</sup>, M. Banach<sup>2</sup>, A.V. Hernandez<sup>3</sup>, A.F.G. Cicero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Bologna; <sup>2</sup>Medical University of Lodz, Lodz, Poland;

<sup>3</sup>University of Connecticut/Harford Hospital Evidence-based Practice Center, Hartford, CT, USA

E-mail: federica.fogacci@gmail.com

**Background.** Bempedoic acid (ETC-1002) is a first-in-class, small-molecule inhibitor of ATP-citrate lyase (ACLY), a key enzyme that supplies substrate for cholesterol and fatty acid synthesis.

**Objectives.** To assess the efficacy and safety of bempedoic acid through a systematic review and meta-analysis of phase 2 and phase 3 randomized controlled trials (RCTs).

**Methods.** A systematic literature search in SCOPUS, PubMed-Medline, Web of Science and Google Scholar databases was conducted up to August 5th, 2019, in order to identify RCTs assessing the efficacy of bempedoic acid on selected biochemical parameters and safety outcomes. Effect sizes for changes in lipids and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) serum concentration were expressed as mean differences (MD) and 95% confidence intervals (CI). For safety analyses, odds ratios (OR) and 95%CI were calculated using the Mantel-Haenszel method.

**Results.** We included 10 RCTs (n=3786) comprising 26 arms (active arm [n=2460]; control arm [n=1326]. Bempedoic acid significantly reduced total cholesterol (TC) [MD: -14.94%, 95%CI: -17.31, -12.57,  $p<0.001$ ], non high-density lipoprotein cholesterol (non HDL-C) [MD: -18.17%, 95%CI: -21.14, -15.19,  $p<0.001$ ], LDL-C [MD: -22.94%, 95%CI: -26.63, -19.25,  $p<0.001$ ], LDL particle number [MD: -20.67%, 95%CI: -23.84, -17.48,  $p<0.001$ ], apolipoprotein B (Apo B) [MD: -15.18%, 95%CI: -17.41, -12.95,  $p<0.001$ ], HDL-C [MD: -5.83%, 95%CI: -6.14, -5.52,  $p<0.001$ ], HDL particle number [MD: -3.21%, 95%CI: -6.40, -0.02,  $p=0.049$ ], and hsCRP [MD: -27.03%, 95%CI: -31.42, -22.64,  $p<0.001$ ]. Bempedoic acid did not modify triglycerides (TG) level [MD: -1.51%, 95%CI: -3.75, 0.74,  $p=0.189$ ], very-low-density lipoprotein (VLDL) particle number [MD: 3.79%, 95%CI: -9.81, 17.39,  $p=0.585$ ] and Apo A-1 [MD: -1.83, 95%CI: -5.23, 1.56,  $p=0.290$ ]. Treatment with bempedoic acid was positively associated with an increased risk of discontinuation to treatment (OR: 1.37, 95%CI: 1.06, 1.76,  $p<0.05$ ), serum uric acid (OR= 3.55, 95%CI: 1.03, 12.27,  $p<0.05$ ), liver enzymes (OR=4.28, 95%CI: 1.34, 13.71,  $p<0.05$ ), and creatine kinase elevations (OR: 3.79, 95%CI: 1.06, 13.51,  $p<0.05$ ), but was associated with a decreased risk of new onset or worsening diabetes (OR: 0.59, 95%CI: 0.39, 0.90,  $p=0.01$ ).

**Conclusions.** Bempedoic acid has favourable effects on lipid profile and hsCRP levels. Further well-designed studies are needed to explore its longer-term safety.

## EFFICACY AND SAFETY OF VOLANESORSEN (ISIS 304801): A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF PHASE 2 AND 3 CLINICAL STUDIES

F. Fogacci<sup>1</sup>, G.D. Norata<sup>2</sup>, P. Toth<sup>3</sup>, M. Arca<sup>4</sup>, A.F.G. Cicero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical and Surgical Sciences Department, University of Bologna;

<sup>2</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences,

Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>The Ciccarone Center for the

Prevention of Cardiovascular Disease, Johns Hopkins School of

Medicine, Baltimore, MD, USA; <sup>4</sup>Department of Internal Medicine

and Medical Specialties, Sapienza University of Rome

E-mail: federicafogacci@gmail.com

**Aim.** To assess the efficacy and safety of volanesorsen (ISIS 304801) through a systematic review of the literature and a meta-analysis of the available phase 2 and phase 3 clinical studies.

**Methods.** A systematic literature search in SCOPUS, PubMed-Medline, ISI Web of Science and Google Scholar databases was conducted up to August 13th, 2019, in order to identify clinical trials assessing the effect of volanesorsen on laboratory parameters and its safety profile. Effect sizes for changes in lipids were expressed as percentage mean differences (MD) and 95% confidence intervals (CI). For safety analysis, odd ratios (OR) and 95%CI were calculated using the Mantel-Haenszel method.

**Results.** Data were pooled from 3 clinical studies comprising 11 arms, which included overall 156 subjects, with 95 in the active-treated arm and 61 in the placebo one. Meta-analysis of data suggested that volanesorsen significantly affected plasma levels of triglycerides (TG) [MD=67.90%, 95%CI: -85.32,-50.48, P<0.001], high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) [MD=40.06%, 95%CI: 32.79,47.34, P<0.001], very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) [MD=72.90%, 95%CI: -82.73,-63.07, P<0.001], apolipoprotein B (Apo B) [MD=8%, 95%CI: 2.17,13.84, P=0.007], Apo B-48 [MD=-64.63, 95%CI: -105.37,-23.88, P=0.002], Apo C-III [MD=-74.83%, 95%CI: -85.93,-63.73, P<0.001], and VLDL ApoCIII [MD=-83.69%, 95%CI: -94.08,-73.29, P<0.001], without significantly impacting plasma total cholesterol (TC) [MD=-0.65%, 95%CI: -10.70,9.40, P=0.900], non HDL-C [MD=-18.89%, 95%CI: -40.96,3.19, P=0.094], and LDL-C [MD=47.01%, 95%CI: -1.31,95.33, P=0.057] levels. Treatment with volanesorsen was positively associated with a higher risk of injection site-reaction (OR=32.89, 95%CI: 7.97,135.74, P<0.001) and with an increased risk of upper respiratory tract infections (OR=10.58, 95%CI: 1.23,90.93, P<0.05).

**Conclusion.** Volanesorsen has favourable effects on lipid profile. Further well-designed studies are needed to explore its longer-term safety.

## IMPACT OF A SHORT-TERM SYMBIOTIC SUPPLEMENTATION ON METABOLIC SYNDROME AND SYSTEMIC INFLAMMATION IN ELDERLY PATIENTS: A RANDOMIZED PLACEBO-CONTROLLED CLINICAL TRIAL

F. Fogacci, A.F.G. Cicero, M. Bove, M. Giovannini, C. Borghi

University of Bologna

E-mail: federicafogacci@gmail.com

**Purpose.** The connection between gut microbiota imbalance, inflammation and its role in the pathogenesis of metabolic syndrome (MetS) clustering factors has been increasingly recognized. However, data on the efficacy of probiotics supplementation on MetS components are few and almost lacking in the elderly. To address this issue, we conducted a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, clinical study on a large sample of MetS elderly patients.

**Methods.** After 14 days of diet and physical activity standardization, 60 elderly patients were randomized to treatment with a symbiotic formula of Lactobacillus plantarum PBS067, Lactobacillus acidophilus PBS066 and Lactobacillus reuteri PBS072 with active prebiotics or placebo. Patients were evaluated anamnestically and by the execution of a physical examination and laboratory and haemodynamic analyses at the baseline and after 60 days of treatment. At enrollment and at the end of the trial, all enrolled patients complete the EuroQol- 5 Dimension (EQ-5D) questionnaire.

**Results.** Through the 2-months period of treatment, patients who received active treatment experienced a statistically significant improvement in waist circumference and in fasting plasma insulin, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, non-HDL-C, triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol, high sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor alpha serum levels, compared both to the baseline and the control group. Visceral adiposity index improvement in the symbiotic treatment group was significantly greater than in placebo group. Compared to baseline, treatment with symbiotics also significantly reduced mean arterial pressure and fasting plasma glucose. All treatment groups demonstrated a significant decrease in TG. TG reduction in the symbiotic group was significantly greater than in the control group. The EQ-5D VAS questionnaire significantly improved only in probiotics-treated subjects.

**Conclusion.** Treatment with a symbiotic formula of Lactobacillus plantarum PBS067, Lactobacillus acidophilus PBS066 and Lactobacillus reuteri PBS072 with active prebiotics decreased MetS syndrome prevalence, several cardiovascular risk factors and markers of insulin resistance in elderly patients.

## GENDER DIFFERENCE IN FAMILIAL CHYLOMICRONAEMIA SYNDROME

F. Forte<sup>1</sup>, I. Calcaterra<sup>1</sup>, G. Iannuzzo<sup>1</sup>, A. Buonaiuto<sup>1</sup>, M. Gentile<sup>1</sup>, M.D. Di Taranto<sup>2</sup>, C. Giacobbe<sup>2</sup>, M.N.D. Di Minno<sup>3</sup>, P. Rubba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Naples; <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine e Medical Biotechnologies, Federico II University, Naples; <sup>3</sup>Department of Translational Medical Sciences, Federico II University, Naples  
E-mail: dr.fortefrancesco@gmail.com

**Introduction.** Familial Chylomicronaemia Syndrome (FCS) is a subgroup of severe hypertri-glyceridemia disease, characterized by fasting high levels of chylomicrons associated with an increased risk of life-threatening pancreatitis. FCS is caused by homozygous or compound heterozygous mutations in the gene encoding: lipoprotein lipase (LPL), ApoC-II, ApoA-V, LMF1, GPI-HBP1 and GPD1.

**Objective.** The aim of our study is to evaluate difference in clinical picture of FCS and in response to therapy stratifying population according to gender and genotype.

**Methods.** we evaluated: maximum Triglycerides (maxTG), Triglycerides post-therapy (POST-TG), number of pancreatitis, presence of chronic abdominal pain in consecutive patients with FCS.

**Results.** Thirteen patients [8 males and 5 females, mean age 36±15 years] with FCS were included in the analysis. All patients followed a low-fat diet, 10 received fibrates+fish oils and 3 fish oils alone. We performed genetic test to assess causative mutation of FCS. We found: homozygous LPL gene mutation in 50% of males and 50% of females, compound heterozygous LMF1 gene mutations in 25% of males, heterozygous status in APOA-V gene in 13% of males and heterozygous status in LPL gene in 20% of females. No deleterious variants in the aforementioned genes were identified in 13% of males and 20% of females but their phenotype is similar to FCS. Despite, there were no difference in maxTG between female and males ( $p=0.114$ ), the TG % reduction was significantly higher in males than in females (49% vs 5%,  $p=0.044$ ). A history of pancreatitis was reported by 80% of females and 37.5% of males, with chronic abdominal pain being reported by 40% of females and 25% of males.

**Conclusions.** Despite maxTG and genetic profile were similar between males and females, the TG% reduction was higher in males proving less response to therapy in women.

## PREVALENCE OF POTENTIALLY INAPPROPRIATE MEDICATIONS ASSOCIATED WITH RISK OF MAJOR ADVERSE CARDIOVASCULAR EVENTS IN THE ELDERLY

F. Galimberti<sup>1</sup>, E. Olmastroni<sup>1</sup>, M. Casula<sup>2</sup>, E. Tragni<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano  
E-mail: federica.galimberti@unimi.it

**Background.** Cardiovascular diseases are among the leading causes of death worldwide and are an important cause of morbidity in the elderly. As a result of inappropriate prescribing, this population is more prone to drug related problems, including adverse drug reactions. Therefore, it is crucial to identify potentially inappropriate medications (PIMs) with risk of cardiovascular adverse events in this population.

**Aim.** We aimed to evaluate the prevalence of PIMs associated with risk of major adverse cardiovascular events (MACE) using Regional administrative databases of the outpatient drug prescriptions (reimbursable by the National Health Service) in 2014, 2015 and 2016.

**Methods.** The study population was composed by all patients aged ≥65 years followed by a general practitioner of eight local health units (LHUs) in Lombardy (Bergamo, Lecco, Mantova, Monza-Brianza) and Campania (Avellino, Caserta, Napoli-1, Napoli-2). We estimated the prevalence of older patients exposed to selected classes of PIMs to be avoided in the elderly due to their cardiovascular risk, based on drug lists already published in the literature: NSAIDs, antipsychotics, calcium channel blockers with mainly vascular effects, and antiarrhythmics (Class I and III).

**Results.** For LHUs in Lombardy, the prevalence of PIMs with MACE risk ranged from 34% to 44%. For LHUs in Campania, these values were about two times higher (between 59% and 75%). NSAIDs was the most prescribed class (in 2016, the prevalence ranged between 40.8-44.5% in Lombardy and between 55.9-59.9% in Campania), followed by selective calcium channel blockers (in 2016, 41.2-46.0% in Lombardy and 29.9-33.3% in Campania).

**Conclusions.** These results show that the prescription of PIMs with MACE risk in older patients is widespread in our national setting, with some remarkable geographical differences. It is therefore necessary to implement local strategies and future interventions to enhance safe prescribing practices in elderly patients.

## APOLIPOPROTEIN B AND CARDIOVASCULAR DISEASE RISK: A META-ANALYSIS OF RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS

F. Galimberti<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>2</sup>, J.L. Katzmann<sup>3</sup>, A.J. Cupido<sup>4</sup>, A.C. Keech<sup>5</sup>, A.D. Snidermann<sup>6</sup>, B.A. Ference<sup>7</sup>

<sup>1</sup>MRC/BHF Cardiovascular Epidemiology Unit, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, IRCCS MultiMedica, Milano; <sup>3</sup>MRC/BHF Cardiovascular Epidemiology Unit, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; Department of Cardiology, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany; <sup>4</sup>MRC/BHF Cardiovascular Epidemiology Unit, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Department of Vascular Medicine, Meibergdreef 9, Amsterdam, Netherlands; <sup>5</sup>National Health and Medical Research Council Clinical Trials Centre, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia; <sup>6</sup>McGill University Health Centre, Royal Victoria Hospital, 1001 Decarie Boulevard, Montreal, Quebec, H4A 3J1, Canada; <sup>7</sup>MRC/BHF Cardiovascular Epidemiology Unit, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom  
E-mail: federica.galimberti@unimi.it

**Background and Aim.** Several novel therapies that potently reduce plasma triglyceride levels by targeting the lipoprotein lipase (LPL) pathway are currently in development. Recent evidence from Mendelian randomization studies suggest that lowering plasma triglyceride levels through the LPL pathway and lowering low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol through the LDL receptor pathway are associated with very similar proportional reductions in the risk of cardiovascular (CV) events for the same reduction in apolipoprotein B (apoB) containing lipoproteins. This finding implies that the clinical benefit of any lipid-lowering therapy should be proportional to the absolute change in apoB. Therefore, we sought to compare the clinical benefit of different classes of lipid-lowering therapies per unit reduction in apoB, and to estimate the magnitude of the expected clinical benefit of lowering apoB for each class of therapy to inform the design of future randomized trials evaluating novel lipid-lowering therapies.

**Methods.** We conducted a study-level meta-analysis of randomized trials evaluating 6 different classes of lipid-lowering therapies (statins, ezetimibe, PCSK9-inhibitors, CETP-inhibitors, niacin, and fibrates). We included all randomized trials that reported apoB levels for the entire study population, enrolled at least 1000 participants, had a least 1-year median follow-up and were designed to evaluate CV outcomes. The primary outcome for this meta-analysis was major CV events - defined as the first occurrence of CV death, non-fatal myocardial infarction, stroke or coronary revascularization. We estimated the relative risk (RR) of major CV events standardized for a 30 mg/dl reduction in apoB using fixed effect inverse-variance weighted meta-analysis (adjusted for study duration) separately for each class of therapy and in a combined analysis including all classes of lipid-lowering therapies. Heterogeneity of the observed clinical benefit per unit reduction in apoB between the different classes of lipid-lowering therapies was measured with the I<sup>2</sup> statistic.

**Results.** A total of 25 trials that enrolled 285,241 participants (mean age: 63.3 years; female sex: 24.7%) who experienced 40,244 first major CV events were included in the analysis. Among the included trials, the mean baseline LDL-cholesterol level was 100.7

mg/dL and the mean baseline apoB level was 93.9 mg/dL. The mean absolute difference in apoB between the treatment and comparison groups at one year was 24.1 mg/dL. Among all included trials, the overall RR per 30 mg/dL reduction in apoB levels was 0.79 (95% confidence intervals (CI) 0.77-0.81) for major CV events. Examining separately the components of the composite endpoint, the risk of non-fatal myocardial infarction was reduced by 24% (RR 0.76, 95% CI 0.73-0.79), the risk of coronary revascularization and of stroke by 21% (RR 0.79, 95% CI 0.76-0.81 and RR 0.79, 95% CI 0.74-0.83, respectively), and the risk of CV death by 13% (RR 0.87, 95% CI 0.82-0.92). There was no significant heterogeneity in the clinical benefit per 30 mg/dl reduction in apoB among the six different lipid-lowering therapies, either for the primary composite outcome or for any of the individual components of the primary composite outcome.

**Conclusions.** Statins, ezetimibe, PCSK9-inhibitors, CETP-inhibitors, niacin, and fibrates are all associated with very similar reductions in the risk of major CV events per unit change in apoB, suggesting that the clinical benefit of all lipid-lowering therapies may be proportional to the achieved absolute reduction in apoB, regardless of the observed changes in other lipids. This study also demonstrates that each 30 mg/dl absolute reduction in plasma apoB concentration is associated with an approximately 20% reduction in the risk of major CV events. These findings can be used to inform the design of randomized trials evaluating novel lipid-lowering therapies.

## INTIMA MEDIA THICKNESS AND ACHILLE'S TENDON IN FH CHILDREN

A. Giammanco, C.M. Barbegalio, M. Trevisin, A.M. Cardella, R. Spina, C. Scrimali, F. Brucato, G.I. Altieri, F. Fayer, V. Ingrassia, V. Valenti

Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" - ProMISE - University of Palermo  
E-mail: agiamman@gmail.com

**Background.** Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant inherited metabolic disorder characterized by high low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels from birth and premature coronary heart disease (CHD). Lifetime exposure to LDL-C correlates with increased risk of cardiovascular disease. Although children with heterozygous FH rarely present with identifiable clinical features, carotid ultrasound and the measure of carotid intima media thickness (cIMT) is useful tool for the evaluation of development of atherosclerosis through childhood.

**Objective and Methods.** We evaluated the effect of the exposure to LDL-C plasma levels on carotid intima media thickness (cIMT) and Achille's tendon thickness (ATT) in a group of FH children (mean age 10.9±4.9) at the Lipid Clinic in Palermo. Non-FH subjects matched for age and gender were enrolled as controls. Anthropometric measures, clinical and biochemical parameters, life style (physical activity), cIMT and ATT were recorded.

**Results.** A total of 38 subjects (n=20 FH and n=18 controls) were enrolled. ADH subjects were clinically and genetically characterized. Only n=10 FH subjects were on standard lipid lowering therapy (LLT) with statins and/or ezetimibe. Although no differences were found in terms of cIMT and ATT between the two groups, in FH children LDL cholesterol, BMI and age correlated to cIMT.

**Conclusions.** The finding of our study supports the view that atherosclerosis starts early in life and justifies treatment also beginning early in life.

## THE LIPIGEN PAEDIATRIC GROUP: CHARACTERIZATION OF CHILDREN AND ADOLESCENTS AFFECTED BY FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA IN ITALY

M. Gazzotti<sup>1</sup>, M. Casula<sup>2</sup>, A.L. Catapano<sup>2</sup>, E. Olmastroni<sup>1</sup>,  
F. Bonaiti<sup>1</sup>, M.E. Capra<sup>3</sup>, C. Pederiva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP),  
Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences,  
University of Milan; <sup>2</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology  
Service (SEFAP), Department of Pharmacological and  
Biomolecular Sciences, University of Milan, IRCCS MultiMedica,  
Sesto S. Giovanni, Milano; <sup>3</sup>Centro Dislipidemie in Età Evolutiva  
U.O. Pediatria e Neonatologia, Ospedale G. da Saliceto, Piacenza;  
<sup>4</sup>U.O. Clinica Pediatrica, Servizio Clinico Dislipidemie per lo  
Studio e la Prevenzione dell'Aterosclerosi in Età Pediatrica,  
Ospedale San Paolo, Milano

E-mail: marta.gazzotti@unimi.it

**Background.** Familial hypercholesterolemia (FH) is a common genetic disorder characterized by elevated LDL cholesterol (LDL-c) concentrations from birth, predisposing to early atherosclerotic lesions and premature coronary heart disease (CHD). Early detection and treatment in childhood or adolescence are crucial to achieve a normal life expectancy.

**Aim and Methods.** In 2018, the LIPIGEN paediatric group was constituted within the LIPIGEN Network, to improve detection, diagnosis, and management of paediatric FH patients. In this preliminary analysis, we selected LIPIGEN patients <18 years to evaluate clinical characteristics, biochemical parameters, and genetic profile.

**Results.** The analyses were carried out on 1200 LIPIGEN patients (47.3% males) with valid data. At diagnostic visit, the study population was composed by 16.6% of subjects with age 0-5 years, 41.7% with 6-10 years, 24.7% with 11-13 years, and 17.0% with 14-17 years. The mean age at diagnosis was 9.0±3.7 years. Excluding subjects with missing data, the family history of early CHD was positive in 12.5% of cases, while the prevalence of LDL-c >190 mg/dL among first-degree family members was 68.1%. The mean LDL-c levels among untreated subjects (N=1116), stratified by the four age classes, were 205.5±77.5, 175.9±71.7, 166.8±59.5, and 192.4±59.2 mg/dL, respectively. Among the subjects with genetic testing (N=1023), 53.6% had a positive genetic diagnosis of FH: 95.8% heterozygous for mutations on LDL receptor gene (LDL-R) and one homozygous subject (2 years old with LDL-c 877 mg/dL).

**Conclusion.** This preliminary analysis offers a general view of all paediatric data collected until now in the LIPIGEN study, providing a characterization of the clinical and genetic features of paediatric FH. This evidence sets the stage to plan an in depth data collection to better understand the specific diagnostic approach required for paediatric patients.

\*Heads of centers of LIPIGEN paediatric group: Francesco Angelico (Roma), Marcello Arca (Roma), Maurizio Averna (Palermo), Andrea Bartuli (Roma), Giacomo Biasucci (Piacenza), Claudio Borghi (Bologna), Paolo Calabro (Napoli), Francesca Carubbi (Modena), Francesco Cipollone (Chieti), Nadia Citroni (Trento), Giuliana Fortunato (Napoli), Ornella Guardamagna (Torino), Arcangelo Iannuzzi (Napoli), Lorenzo Iughetti (Modena), Graziana Lupattelli (Perugia), Giuseppe Mandrappino (Messina), Lorenzo Maroni (Varese), Giuliana Mombelli (Milano), Sandro Muntoni (Cagliari), Cristina Pederiva (Milano), Fabio Pellegatta (Sesto San Giovanni (MI)), Livia Pisciotta (Genova), Arturo Pujia (Catanzaro), Francesco Purrello (Catania), Paolo Rubba (Napoli), Carlo

Sabbà (Bari), Riccardo Sarzani (Ancona), Giovanni Battista Vigna (Ferrara), José Pablo Werba (Milano), Sabina Zambon (Padova), Maria Grazia Zenti (Verona) LIPIGEN Steering Committee: Marcello Arca (Roma), Maurizio Averna (Palermo), Stefano Bertolini (Genova), Sebastiano Calandra (Modena), Alberico L. Catapano (Milano), Patrizia Tarugi (Modena) Centralized laboratory: Veronica Zampolieri (Cinisello Balsamo (MI))

## APPLICATION OF A NEXT-GENERATION-SEQUENCING PANEL FOR THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF DYSLIPIDEMIAS

C. Giacobbe, D. Palma, M.D. Di Taranto, G. Maione,  
G. Cardiero, G. Fortunato

Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology,  
University of Naples Federico II Naples, and CEINGE S.C.a r.l.  
Advanced Biotechnology, Naples  
E-mail: giacobbe@ceinge.unina.it

**Introduction.** Dyslipidemias are common clinical conditions involved in cardiovascular diseases. Dyslipidemias have often a strong genetic component, even if secondary factors play a key role in a clinical expression. The aim of this study was to evaluated the usefulness of a wide next-generation-sequencing panel of 28 genes for molecular diagnosis of Familial Hypercholesterolemia (FH) and Severe Hypertriglyceridemia (HTG).

**Materials and Methods.** We preliminary reported data about analysis of 26 patients with different clinical suspect: FH (n=21) and HTG (n=5). These patients were previously analyzed with Sanger sequencing researching pathogenic variants in candidate genes. MLPA was also performed for LDLR and LPL genes in FH and HTG patients respectively. Among FH and HTG, we selected patients carring different type of variants in different genes (single nucleotide variants (SNV) and copy number variations (CNV)). DNA libraries were prepared using Agilent SureSelect target enrichment, and the sequencing was performed using Illumina MiSeq Reagent Micro Kit V2. Sequencing results were analyzed using Agilent SureCall and Agilent Alissa Align&Call and Interpret.

**Results.** The average read depth was >200X. All previously identified SNV and CNV variants were confirmed by NGS and 8/21 FH patients and 4/5 HTG patients were positive for pathogenic variants. No additional pathogenic variants in the causative genes were found in patients negative at previous screening. However, in all patients rare variants, in genes not previously analyzed, were found. In some cases, these additional variants were never associated with dyslipidemias and their pathogenicity evaluation is still in progress.

**Conclusions.** Our results confirm that this NGS-based method is able to detect different type of variants, including CNV. Moreover the simultaneous analysis of many genes involved in lipid metabolism, could be useful to better understand the genetic basis of dyslipidemias and to explain the presence of complex phenotypes.

## LIPA GENE MUTATIONS AFFECT THE COMPOSITION OF LIPOPROTEINS: ENRICHMENT IN ACAT-DERIVED CHOLESTERYL ESTERS

M. Gomaraschi<sup>1</sup>, L. Arnaboldi<sup>2</sup>, A. Ossoli<sup>1</sup>, E. Giorgio<sup>1</sup>, L. Pisciotta<sup>3</sup>, T. Lucchi<sup>4</sup>, L. Grigore<sup>5</sup>, C. Pavanello<sup>1</sup>, A. Granata<sup>2</sup>, A. Pasta<sup>3</sup>, B. Arosio<sup>6</sup>, D. Azzolino<sup>6</sup>, A. Baragetti<sup>2</sup>, S. Castelnovo<sup>7</sup>, A. Corsini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova; <sup>4</sup>Unità di Geriatria, IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Milano; <sup>5</sup>Centro SISA per lo Studio dell'Arteriosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; <sup>6</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano; <sup>7</sup>Centro Dislipidemie, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

E-mail: monica.gomaraschi@unimi.it

**Background and Aims.** Cholesteryl ester storage disease (CESD), due to mutations in the LIPA gene, is characterized by hepatic steatosis, hypercholesterolemia and hypoalphalipoproteinemia, which expose affected patients to an increased cardiovascular risk. Further insights into the impact of LIPA gene mutations on lipid/lipoprotein metabolism are limited. Aim of the study was to investigate the effect of carrying one or two mutant LIPA alleles on lipoprotein composition and function.

**Methods.** Lipoproteins from 6 CESD patients, 5 relatives carrying one mutant LIPA allele (carriers) and 12 sex/age matched controls were isolated and characterized. Carotid IMT, lipid/lipoprotein profile, LCAT activity and HDL ability to promote nitric oxide release by endothelial cells were also evaluated.

**Results.** Despite the lipid-lowering therapy, total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides were increased in CESD patients, while HDL-cholesterol was reduced. Carriers also displayed elevated total and LDL-cholesterol. Mean carotid IMT was higher in CESD patients compared to controls. Very low and intermediate density lipoproteins from CESD patients and carriers were enriched in cholesteryl esters (CEs) compared to the control ones, with a concomitant reduction of triglycerides. Fatty acid composition of CEs in serum and lipoproteins showed a depletion of linoleate content in CESD patients, likely due to the reduced LCAT activity. In CESD HDL, fatty acid distribution of CEs was shifted towards saturated ones, if compared to control HDL. The changes in HDL composition did not affect HDL ability to promote nitric oxide release by endothelial cells.

**Conclusions.** LIPA gene mutations significantly affected plasma levels and lipid composition of lipoproteins, thus likely contributing to the increased cardiovascular risk of affected patients.

## GENETIC DETERMINANTS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: WHAT ELSE BEYOND LDLR GENE?

A. Kura<sup>1</sup>, E. Sticchi<sup>1</sup>, A. Volta<sup>1</sup>, R. De Cario<sup>1</sup>, A. Murri<sup>1</sup>, A. Magi<sup>2</sup>, S. Suraci<sup>1</sup>, A.M. Gori<sup>1</sup>, R. Marcucci<sup>3</sup>, B. Giusti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence; <sup>2</sup>Department of Information Engineering, University of Florence; <sup>3</sup>Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence

E-mail: ada-kura@hotmail.it

**Background.** Familial Hypercholesterolemia (FH) represents an autosomal disorder due to pathogenic variants in LDLR or APOB or PCSK9 (dominant form), and in LDLRAP1 (recessive form). Nevertheless, many subjects (about 60%) with FH did not demonstrate functional mutations in these four genes. Aim of the present study was to assess the genetic profile of patients with FH, through targeted 55 genes panel high-throughput sequencing (HTS), thus allowing to delineate the contribution of further major or modifier genes.

**Methods.** We analyzed 38 subjects with possible/probable or definite FH, according to the most common diagnostic algorithm, the Dutch lipid score. Targeted HTS (55 genes panel, including loci involved in lipid metabolism, genes supposed to be involved in dyslipidemia, pharmacogenetics of statins, genes related to higher susceptibility for the polygenic forms of FH, HDL and triglycerides related diseases) was performed. DNA libraries were prepared using Agilent HaloplexHS enrichment system, and sequencing was assessed using Illumina MiSeq technology.

**Results.** Thirteen out of 38 patients investigated showed pathogenic or likely pathogenetic mutations in LDLR gene. Three out 13 LDLR mutation-positive patients also carried likely pathogenetic/uncertain significance mutations in APOB and LDLRAP1 genes. In patients without LDLR mutations (n=25), at least 2 rare variants were identified in 16 patients (64%), and at least 3 rare variants were identified in 9 patients (36%). Patients with or without pathogenetic mutations in LDLR gene were comparable for age, sex, and LDL cholesterol levels, whereas Dutch score was significantly higher in LDLR mutation positive patients. In these 25 patients, a total of 58 rare variants with uncertain significance/conflicting interpretation of pathogenicity have been identified: 7 (12%) in APOB, 5 (8.6%) in CELSR2, 5 (8.6%) in GHR, 4 (6.9%) in ABCG5, 3 (5.2%) in LMF1, 3 (5.2%) in SLC22A1, 3 (5.2%) in GCKR, 2 (3.4%) in CREB3L3, 2 (3.4%) in ABCB1, 2 (3.4%) in LRP1, 2 (3.4%) in APOA4, 2 (3.4%) in ITIH4, 2 (3.4%) in PON1, 2 (3.4%) in LIPC, 2 (3.4%) in SCARB1, 1 (1.7%) in PCSK9, 1 (1.7%) in DAB2, 1 (1.7%) in PPP1R17, 1 (1.7%) in SREBF1, 1 (1.7%) in SREBF2, 1 (1.7%) in HFE, 1 (1.7%) in LCAT, 1 (1.7%) in LPL, 1 (1.7%) in ABCG2, 1 (1.7%) in NYNRIN, 1 (1.7%) in SLCO1B1, 1 (1.7%) in LIPI genes. These genes are known to be involved in FH, hypertriglyceridemia, other forms of familial dyslipidemia, polygenic FH or pharmacogenetics.

**Conclusions.** Results from the present study suggest the possible effect of multiple rare variants on the clinical phenotype, thus supporting the contribution of a polygenic predisposition to lipid profile alteration. Conversely, even if significant, our preliminary data support a less severe weight of cardiovascular manifestations and family history in patients with polygenic forms of FH.

## THROMBUS AND PERIPHERAL VENOUS BLOOD GLOBAL GENE EXPRESSION PROFILES IN ACUTE ISCHEMIC STROKE: COMPLEMENTARY OR PARALLEL REALITIES?

A. Kura<sup>1</sup>, A. Sodero<sup>2</sup>, E. Sticchi<sup>1</sup>, A. Sereni<sup>1</sup>, S. Galora<sup>1</sup>, A. Magi<sup>3</sup>, S. Suraci<sup>1</sup>, R. De Cario<sup>1</sup>, A. Consoli<sup>4</sup>, A. Rosi<sup>4</sup>, S. Nappini<sup>4</sup>, L. Renieri<sup>4</sup>, N. Limbucci<sup>4</sup>, B. Piccardi<sup>2</sup>, C. Sartì<sup>2</sup>, D. Inzitari<sup>2</sup>, S. Mangiafico<sup>4</sup>, A.M. Gori<sup>1</sup>, R. Marcuccì<sup>1</sup>, B. Giusti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence; <sup>2</sup>Stroke Unit, Careggi Hospital, Florence; <sup>3</sup>Department of Information Engineering, University of Florence; <sup>4</sup>Interventional Neuroradiology Unit, Careggi Hospital, Florence

E-mail: ada-kura@hotmail.it

**Background.** Ischemic stroke remains a major cause of death and disability worldwide. Tissue plasminogen activator and mechanical thrombectomy (MT) represents the standard treatment of acute ischemic stroke (AIS) for recanalization of the occluded intracranial vessel. The use of MT in patients with AIS has allowed for histopathological analysis of clots. Few previous studies suggested a correlation between the composition of thrombus (e.g fibrin percentage and different cellular components such as red blood cells, white blood cells) and pathophysiological mechanisms and outcomes. Further histological and transcriptomic analysis of thrombi obtained during MT may be important in order to acquire useful information about the pathophysiological causes, determinants of clinical outcomes of stroke and to develop therapies in the future. Aim of this study was to evaluate, by using Affymetrix technology, the global gene expression profiles of RNA extracted from thrombus and peripheral venous blood of AIS patients undergoing MT.

**Methods.** Thirty three consecutive AIS patients (16 males/17 females, mean age $\pm$ SD 74.5 $\pm$ 13.7) undergoing endovascular treatment were collected and followed-up for at least 3 months. The thrombus obtained during MT was collected in RNA later. Blood samples were collected before and 24 hours after MT in tubes with anticoagulants (plasma EDTA and citrated), as well as in tubes without anticoagulant (serum) and with liquid for RNA stabilization. Biological materials were stored for present and future analyses. RNA was extracted by PAX gene blood miRNA kit. The global gene expression was assessed by Affymetrix technology using GeneChip Human Trascriptome 2.0 Array allowing the analysis of 44,699 genes, >285,000 full-length transcripts coverage. Data analysis was performed with TAC 4.0 software (Affymetrix) and in R environment with dedicated pipelines. For statistical analysis we used SPSS v.25 software.

**Results.** We processed 33 thrombi and 17 peripheral venous blood samples. In order to evaluate the biological processes, the molecular functions and the cellular component that characterize the genes expressed in the biological samples under analysis, we performed a GeneOntology enrichment analysis. In particular, as regards biological processes, 363 terms are significantly enriched ( $p<0.01$ ). In peripheral venous blood samples the biological processes enriched with a  $p<0.01$  amount to 1058. The number of probe sets, miRNAs, lncRNAs and genes annotated with an expression greater than 26 is higher in RNA obtained from thrombus than from peripheral venous blood. The GeneOntology enrichment analysis in thrombus highlights among the most significant a series of terms related to activation and mediated immunity of neutrophils, activation of T lymphocytes and platelets, regulation of leukocyte differentiation and apoptosis. These data are consistent with the crucial role reported or suggested in the literature of

these processes at various stages of ischemia/reperfusion injury. Although, at peripheral level, differences can be observed in significantly enriched terms, many of the most significant biological processes are common with those observed in thrombi.

**Conclusions.** Few data are, at present, available on whole gene expression profiles of thrombi and peripheral venous blood of AIS patients after MT. Upon completion of analyses in all enrolled patients, in addition to this important picture that allowed us to obtain important and new data on gene expression profiles in thrombi and peripheral blood of the same AIS patients, we will correlate/associate these profiles with the different pathophysiological mechanisms of AIS, response to treatment and clinical outcomes (eg hemorrhagic transformation, disability, death). It will be interesting to evaluate if the associations observable at the level of injury are the same as those observable at peripheral level. Better understanding of molecular and cellular changes in AIS patients will be useful to acquire information about the pathophysiological bases and outcomes determinants in order to identify and validate new diagnostic/prognostic and therapeutic markers.

## THE TREATMENT OF PRIMARY DYSLIPIDEMIA IN PEDIATRICS

G. Massini, R. Buganza, A. Beccaria, L. de Sanctis, O. Guardamagna

Department of Public Health and Pediatrics, University of Turin  
E-mail: giulia.massini@unito.it

**Introduction.** Dyslipidemia in pediatric patients represents a cardiovascular risk factor and the atherosclerotic process progresses if adequate treatment is not started. The aim of the study was to evaluate the impact of different therapeutic approaches on the lipid profile in pediatric patients with primary dyslipidemia.

**Material and Methods.** Patients with familial hypercholesterolemia (FH) and polygenic hypercholesterolemia, associated or not with hypertriglyceridemia were recruited in the period 2005-2018. The subjects of the study were put on a diet for 6-12 months, then added with food supplements. Consistently with international guidelines, drug therapy was reserved for FH patients. Auxological parameters, food diary and lipid profile were evaluated in basal conditions and after each specific treatment.

**Results.** Out of the 672 subjects recruited, the efficacy of the diet was considered in 343 compliant patients who achieved a reduction in total cholesterol (CT) and LDL-cholesterol (LDL-C) of 7.3% and 9.8%, respectively. The use of glucomannan (36 cases) led to a significant drop in TC and LDL-C of 6.8% and 9.5% and the drop was higher with the use of phytosterols (130 cases) equal to 11.2% and 14.3%, respectively. The administration of phytosterols significantly reduced apolipoprotein B (13.8%). Administration of pravastatin 20 mg/day, which was well tolerated, reduced LDL-C by 25.4%. LDL-C target of 130 mg/dl was achieved by 18% of patients.

**Conclusions.** The present study demonstrates the efficacy of diet and supplement intake and confirms the need for early intervention. However, to improve the achievement of the therapeutic target in subjects with high cardiovascular risk is important to evaluate the use of statins.

## ASSOCIATION BETWEEN SIZE OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL PARTICLES AND CARDIOVASCULAR EVENTS IN TYPE 2 DIABETES SUBJECTS

G. Lo Coco<sup>1</sup>, J. Sanz Molina<sup>1</sup>, F. Luciani<sup>1</sup>, C.M. Semprini<sup>1</sup>, E. Dalla Nora<sup>1</sup>, G. Zuliani<sup>2</sup>, G.B. Vigna<sup>1</sup>, A. Passaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Science, University of Ferrara;

<sup>2</sup>Department of Morphology, Experimental Medicine and Surgery, University of Ferrara

E-mail: lccgtn@unife.it

**Background.** Type 2 diabetes (T2D) is an established independent risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD), particularly coronary heart disease (CHD). Moreover, a large number of studies have suggested that diabetic patients are prone to a higher risk of death from ASCVD, such as CHD and stroke, when compared with nondiabetes patients. Until now, however, the incremental cardiovascular risk in diabetic individuals has not been explained fully by hyperglycaemia. Diabetic dyslipidaemia is characterized by elevated fasting and postprandial triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (c-LDL) and decreased high-density lipoprotein cholesterol (c-HDL). However, the characteristics of lipoprotein subfractions distribution in patients with type 2 diabetes (T2D) have not been fully investigated. In addition, guidelines argue about intensive hypolipidemic treatment among T2D patients without CHD as much as those with CHD.

**Objective.** The aim of present study was to evaluate the distribution of lipoprotein subfractions and the association between size of LDL and HDL particles and cardiovascular events in T2 diabetes patients

**Methods.** A total of 385 subjects were consecutively enrolled in this study, selected from the database of Emilia Romagna Research Centre of dyslipidemia, whereas controls were selected from general population. Patients were divided into T2D without CHD group (n=116), T2D with CHD group (n=36) and control group (n=233, without T2D and CHD). Both low- and high-density lipoprotein cholesterol (c-LDL and c-HDL) subfractions were analysed using the Quantimetrix Lipoprint System. The distributions of lipoprotein subfractions were evaluated in each group. Subfractions were correlated with selected clinical and biochemical parameters including risk factors for atherosclerotic cardiovascular disease and with cardiovascular events. Variables were analysed with parametric or non-parametric statistical tests as necessary.

**Results.** Among patients without hypolipidemic treatment serum total-cholesterol, c-LDL, c-HDL and triglycerides distribution differ significantly between groups ( $p<0.05$ ), whereas patients ongoing hypolipidemic treatment only differ significantly in serum total cholesterol ( $p=0.074$ ), but not in c-LDL, c-HDL and triglycerides serum distribution ( $p<0.05$ ). In addition, among patients without hypolipidemic treatment small-dense c-LDL, large-buoyant c-LDL, c-HDL large subfraction and c-HDL small subfraction distribution differ significantly between groups ( $p<0.05$ ); moreover, lipoprotein subfractions distribution differ significantly between groups also in patients with hypolipidemic treatment ( $p<0.05$ ).

**Conclusions.** Hypolipidemic treatment in Type 2 diabetes patients, with or without CHD, does not modify lipoprotein subfractions distribution in comparison to control group. Further studies are needed to confirm our results and we ipotize that other therapeutic approaches are necessary to modify lipoprotein subfractions distribution in order to reduce cardiovascular risk. Therefore, our observation provides additional information concerning diabetic dyslipidaemia, which might be useful for future prevention and therapy in patients with Type 2 diabetes.

## THE CLINICAL RELEVANCE OF GENETIC VARIANTS OF UNCERTAIN SIGNIFICANCE IN FAMILIAL HYPERCOLESTEROLEMIA

S. Lugari, A. Cavicchioli, A. Mondelli, P. Vita, E. Pellegrini, F. Carubbi, F. Nascimbene

Unit of Internal and Metabolic Medicine, Civil Hospital, A.O.U. of Modena and University of Modena and Reggio Emilia  
E-mail: simonetta.lugari@libero.it

**Introduction.** Next-generation sequencing has resulted in rapid genetic diagnosis of patients with suspected familial hypercholesterolemia (FH); however, genetic variants of uncertain significance (VUS) with an unknown causal link to the disease are being increasingly identified. We aimed at evaluating the clinical significance of VUS in our FH cohort.

**Methods.** 191 consecutive patients with suspected FH from the Lipid Clinic in Modena underwent comprehensive evaluation, including genetic analysis, within the LIPIGEN Project. Patients were categorized in four groups according to the detection of "pathogenic"/"likely pathogenic" mutations (M) and/or VUS in autosomal dominant FH-causing genes (LDLR, APOB, PCSK9, STAP1, APOE) as follows: M/VUS-, M-/VUS+, M+/VUS-, M+/VUS+.

**Results.** M and/or VUS were detected in 162 (84.8%) patients (147 M and 50 VUS). The vast majority of M affected LDLR (95.9%), whereas VUS were more heterogeneously distributed across FH-causing genes (LDLR 24%, APOB 60%, PCSK9 14%, APOE 2%). M-/VUS- (n=29) and M-/VUS+ (n=18) patients did not significantly differ for age, LDL cholesterol (LDL-c) and Lp(a) levels, Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) score, duration of statin therapy, family and personal history of cardiovascular disease, presence of arcus cornealis or Achilles tendon xanthomas. M-/VUS+ patients showed significantly lower LDL-c levels ( $p<0.001$ ), DLCN score ( $p<0.001$ ) and duration of statin therapy ( $p=0.034$ ) and were less likely to have Achilles tendon xanthomas ( $p=0.038$ ) and a positive family history of cardiovascular disease ( $p=0.031$ ) than M+/VUS- patients (n=116). Of note, polygenic LDL-c score was similar between M-/VUS- and M-/VUS+ ( $p=0.134$ ), but significantly higher in M-/VUS+ than M+/VUS- patients ( $p=0.008$ ). No significant differences were found between M+/VUS- and M+/VUS+ patients (n=28). Restricting the analyses to VUS in LDLR yielded to similar results.

**Conclusions.** In our FH cohort, VUS carriers had a biochemical and clinical profile similar to that of mutation-negative patients. Moreover, the coexistence of VUS did not increase the phenotype severity in mutation-positive patients.

## STUDY OF THE ASSOCIATION BETWEEN CARDIOVASCULAR EVENTS AND SIZE OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN AND HIGH DENSITY LIPOPROTEIN PARTICLES IN PATIENTS WITH FAMILIAR HYPERCHOLESTEROLEMIA

F. Luciani, J. Sanz Molina, C. Bosi, G. Lo Coco, A. Colangiulo, M. Dall'Agata, E. Dalla Nora, A. Passaro, G.B. Vigna  
*Department of medical science, University of Ferrara*  
*E-mail: lcnfmc@unife.it*

**Background.** Familial Hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease, characterized by extremely elevated levels of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and a propensity to early onset Arteriosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD). Low density lipoproteins (LDL) do not show in humans a normal distribution and comprise two different main fractions: large, buoyant (phenotype pattern A) and small, dense (phenotype pattern non-A) particles, that differ not only in size and density but also in physicochemical composition, metabolic behaviour and atherogenicity. On the other hand, HDL particles are also heterogeneous in composition and structure, which may relate to differences in antiatherogenic potential. The aim of present study was to evaluate the distributions of lipoprotein subfractions in FH patients and their role as an important predictor of cardiovascular events and progression of Coronary Artery Disease (CAD).

**Methods.** A total of 183 patients were enrolled in this study. Based on the evidence of Familial Hypercholesterolemia, patients were divided into FH group (n=61) and non-FH group (n=122). Controls were taken from the general population and matched with FH patients for age, sex and BMI with a 2: 1 ratio. Both low-and high-density lipoprotein cholesterol (LDL-and HDL-C) subfractions were analysed using the Quantimetrix Lipoprint System®. The distributions of lipoprotein subfractions were evaluated in patients with and without FH. Subfractions were correlated with selected clinical-biochemical parameters including risk factors for atherosclerotic CVD and with cardiovascular events. Variables were analysed with parametric or non-parametric statistical tests as necessary.

**Results.** Compared with non-FH individuals, the LDL-C levels and TG levels of the FH patients were substantially higher, whereas the levels of HDL-C were almost equal in the two groups. Most FH patients enrolled in the study were already on lipid-lowering treatment. The FH group presented a significant increase in large LDL and small LDL cholesterol subfraction concentration when compared with the non-FH group; the Small-dense LDL-C/Large-buoyant LDL-C ratio is greater in the FH group than in non-FH group, even if the difference is not statistically significant. The pattern of HDL subfractions showed higher levels of large HDL, both in concentration and percentage, in non-FH patients. There were no difference in concentration of small HDL in the two groups. We have also analyzed the correlation between the size of lipoproteins subfractions and the hypolipidemic treatment. There are no significative differences in concentration and percentage of HDL subfractions both in patients not in treatment and in patients in treatment. The situation is different for LDL subfractions. There is a significative difference in concentration, but not in percentage, of LDL subfractions, both small and large, in patients not in treatment ( $p=0.009$  and  $p=0.001$  respectively). Instead the treated patients present a significative difference only for large LDL subfractions ( $p=0.001$ ); the small LDL subfractions were almost equal in the two group ( $p=0.292$ ). Eventually we have studied the correlation between the lipoprotein size and the cardiovascular events in

patients FH. The small LDL subfractions were higher in patient FH with cardiovascular events ( $p=0.037$ ). There were not significative differences of HDL subfractions in patient not FH and FH with cardiovascular events.

**Conclusions.** Small LDL particles are more associated with CVD. The lipid-lowering treatment can reduce the concentration of more atherogenic LDL subfractions.

## LIPID ACCUMULATION IMPAIRS LYSOSOMAL ACID LIPASE ACTIVITY IN HEPATOCYTES: EVIDENCE IN NAFLD PATIENTS AND CELL CULTURES

M. Gomaraschi<sup>1</sup>, A.L. Fracanzani<sup>2</sup>, P. Dongiovanni<sup>3</sup>, C. Pavanello<sup>1</sup>, E. Giorgio<sup>1</sup>, L. Da Dalt<sup>4</sup>, G.D. Norata<sup>4</sup>, L. Calabresi<sup>1</sup>, D. Consonni<sup>3</sup>, R. Lombardi<sup>2</sup>, A. Branchi<sup>5</sup>, S. Fargion<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Milano; <sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>5</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano  
*E-mail: monica.gomaraschi@unimi.it*

**Aims.** It has been hypothesized that the activity of lysosomal acid lipase (LAL), a key enzyme involved in lipid metabolism, is involved in the NAFLD phenotype. To clarify the role of LAL in NAFLD, we studied 164 consecutive patients with biopsy-proven NAFLD and fat-loaded HepG2 cells.

**Methods.** LAL activity was measured:

- 1) on dried blood spots (DBS) from NAFLD patients and dyslipidemic subjects without fatty liver;
- 2) on liver biopsies from NAFLD patients.

LAL activity and expression were evaluated in HepG2 cells cultured in the presence of free fatty acids (FAs), with or without a PPAR-alpha agonist.

**Results.** LAL activity was significantly reduced in patients with NAFLD compared to dyslipidemic subjects. LAL activity measured in liver biopsies from NAFLD patients was highly correlated to that measured on DBS and was independent of LAL expression in the liver. In a fully adjusted model, LAL activity on DBS was associated only with platelets and, when normalized by platelet count, it did not differ according to fibrosis stage. *In vitro*, FA loading of HepG2 fully replicated the impairment of LAL activity observed in NAFLD patients. In these cells, the activation of PPAR-alpha receptors prevented and corrected FAs-induced LAL impairment, by stimulating FA oxidation and LAL expression. In a pilot study, fenofibrate significantly improved LAL activity in NAFLD patients.

**Conclusions.** LAL activity is reduced in NAFLD patients, independently from disease progression. *In vitro*, impaired LAL activity induced by FA loading was rescued by PPAR-alpha activation. These data suggest that the pharmacological modulation of LAL should be explored in the management of NAFLD patients.

## PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 ENHANCES VASCULAR CALCIFICATION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

M. G. Lupo<sup>1</sup>, E. Faggion<sup>2</sup>, M. Rattazzi<sup>2</sup>, M. Camera<sup>3</sup>, P. Poggio<sup>4</sup>, N. Ferri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>4</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano

E-mail: mariagiovanna.lupo@gmail.com

**Background.** In patients with chronic kidney disease (CKD), vascular calcification is associated with significant morbidity and mortality. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a pivotal player of cholesterol homeostasis, has been recently associated with a higher rate of calcification in hypercholesterolemic, diabetes and chronic kidney disease patients. In addition, carriers of the PCSK9 R46L loss-of-function variant have a low calcific aortic valve stenosis.

**Aim.** The aim of this study was thus to investigate the role of PCSK9 in vascular calcification process, under uremic condition, both on *in vivo* and *in vitro* experimental settings.

**Methods.** Sprague-Dawley rats were fed a standard diet (n=11) or uremic diet containing 0.5% adenine (n=11) for 6 weeks. Urine volumes were measured every two weeks by housing rats in metabolic cages for 24 h. At sacrifice, abdominal aortas, plasma, livers and kidneys were collected. Calcium crystals in tunica media of aortas were visualized by von Kossa staining and quantified by a colorimetric assay. Plasma creatinine and phosphate levels were evaluated by clinical standardized methods. PCSK9 expression in kidneys and liver was visualized by western blotting (WB). The overexpression of PCSK9 in vascular smooth muscle cells (VSMCs) was attempted by retroviral infection. PCSK9 overexpression was determined by both ELISA and WB analyses. Wild-type (wt) and PCSK9-overexpressing VSMCs were cultured with low-FCS/high-phosphate media (2.5% FCS in the presence of 2.0 mM or 2.4 mM of Pi) for 7 days, and media were replaced every two days. Evolocumab (Evo) 82 µg/mL was used in combination with 2.4 mM Pi for 7 days. Moreover, wt VSMCs were treated for 7 days with 5 µg/mL recombinant human PCSK9 (recPCSK9). Hydroxyapatite deposition by VSMCs was measured by a calcium colorimetric assay. Matrix GLA protein (MGP) expression was evaluated by WB. Extracellular vesicles (EVs) were determined by flow cytometry.

**Results.** *In vivo* experiments: The uremic condition, in Sprague-Dawley rats, was documented by increased urine volume (26 mL/day vs 58 mL/day), plasma creatinine (25.7 µM vs 208 µM) and phosphate levels (2.64 µM vs 6.11 µM). High phosphate concentration was associated to aortic calcification determined by measuring aorta Ca<sup>2+</sup> concentrations (0.34 mg/g tissue vs 2.48 mg/g tissue) and by von Kossa staining. This pathological condition was associated to a significant increase of total cholesterol (from 75.3 mg/dL to 107.6 mg/dL) and PCSK9 levels (from 40.1 ng/mL to 109.7 ng/mL). Higher expression of PCSK9 was also observed in kidney (+4.8 fold) and liver (+1.5 fold). *In vitro* experiments: The overexpression of PCSK9 in VSMCs (from 0.02 ng/mL to 11.3 ng/mL) induced a significant increase of extracellular calcification in response to 7 days exposure to 2.4 mM Pi (+39% compared to control VSMCs). The overexpression of PCSK9 led to a significant dose-response reduction in MGP protein, an important inhibitor of the calcification process, in comparison to wt VSMCs (-30%, -60%, -90% vs control, 2.0 mM Pi and 2.4

mm Pi, respectively), and to an increase in the release of EVs in response to 2.4 mM Pi (+7-fold vs control). The concomitant treatment with 2.4 mM Pi and Evo showed no improvements in the extracellular calcium deposition and the incubation of VSMC with recPCSK9 (5 µg/ml) produced no increase in extracellular calcium deposition. **Conclusions.** The present study indicates a direct role of PCSK9 on vascular calcification associated to a CKD condition. We identified MGP as one of the possible mediators of this process. Moreover, we suggest an intracellular-mediated mechanism of action of PCSK9 which promotes the production of EVs.

## THE ROLE OF CHEMERIN IN VASCULAR DAMAGE OF MORBIDLY OBESE PATIENTS

S. Ministrini<sup>1</sup>, M.A. Ricci<sup>1</sup>, E. Nulli Migliola<sup>1</sup>, S. De Vuono<sup>2</sup>, M. D'Abbondanza<sup>1</sup>, M.T. Paganelli<sup>3</sup>, A.R. Roscini<sup>4</sup>, D. Siepi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Perugia;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Perugia;

<sup>3</sup>Chirurgia Generale, Ospedale Santa Maria della Misericordia;

<sup>4</sup>Medicina Interna, Ospedale Santa Maria della Misericordia

E-mail: stefano.mns@gmail.com

**Background and Aims.** Adipokines have been claimed in the progression of atherosclerotic disease progression in obese subjects. Chemerin is an adipokine that affects adipogenesis and glucose homeostasis in adipocytes, whose levels increase with BMI. The aim of this study is to investigate the correlation between circulating levels of chemerin and vascular damage.

**Methods.** Two-hundred-eighty obese subjects eligible for laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) were enrolled in the study. The following parameters were evaluated: body mass index (BMI), glycemia, insulinemia, HOMA-IR, glycated hemoglobin, lipid pattern, plasma chemerin levels, flow mediated vasodilation (FMV) and intima-media thickness (IMT). One-hundred and twenty-eight underwent LSG and were evaluated 10 months after the intervention.

**Results.** The study showed a significant association between chemerin and cardiovascular damage. Univariate analysis of chemerin showed a direct and significant correlation with waist circumference ( $Rho=.276$ ,  $p=.039$ ), HOMA-IR ( $Rho=.299$ ,  $p=.025$ ), glycated hemoglobin ( $Rho=.428$ ,  $p=.001$ ), maximum left IMT ( $Rho=.300$ ,  $p=.025$ ) and maximum right IMT ( $Rho=.270$ ,  $p=.044$ ). At baseline we found that chemerin significantly predicts maximum left IMT according to an exponential model ( $R^2=.082$ ,  $Beta=.001$ ,  $p=.032$ ). On analysis with the ROC curve we have identified a threshold of chemerin of 150 ng/ml able to predict cardiovascular risk using IMT as an outcome.

**Conclusion.** Obese patients show increased chemerin values that correlate with metabolic syndrome and vascular damage expressed by IMT. Patients with plasma chemerin values >150 ng/ml have a higher probability of developing early vascular damage. Bariatric surgery is an effective therapeutic instrument able to decrease cardiovascular risk through reduction of the IMT and of chemerin plasmatic levels, with a concomitant improvement in insulin resistance.

## DEPRESSIVE SYMPTOMS AND PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEKIN TYPE 9: EVIDENCE FROM THE SPHERE COHORT

C. Macchi<sup>1</sup>, C. Favero<sup>2</sup>, M.F. Greco<sup>1</sup>, A.C. Pesatori<sup>2</sup>, L. Vigna<sup>3</sup>, A. Ceresa<sup>4</sup>, N. Ferri<sup>5</sup>, A. Corsini<sup>6</sup>, C.R. Sirtori<sup>7</sup>, M. Buoli<sup>4</sup>, V. Bollati<sup>2</sup>, M. Ruscica<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>EPIGET Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan; <sup>3</sup>Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milan; <sup>4</sup>Department of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan; <sup>5</sup>Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padua; <sup>6</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>7</sup>Centro Dislipidemie, A.S.S.T. Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan  
E-mail: chiara.macchi@unimi.it

**Background.** Among less frequently evaluated clinical conditions linked to the cardiovascular (CV) risk, anxiety and depression are highly prevalent. Depressed patients are more likely to eventually develop CV disease, with risk of events that raising according to severity of depression. Epidemiological evidence strongly suggests an association between obesity and depressive mood, an evidence which may describe the 50% raised risk of onset of depression in the obese. Proprotein convertase subtilisin/kekexin 9 (PCSK9), regulating the number of cell-surface of low-density lipoprotein receptors, may play a major role in CV diseases. Thus, aim of the present study was to verify whether in a population of obese subjects, depression could have an impact on PCSK9 levels and on their association with the Framingham Risk Score (FRS), a well-established predictor of CV events.

**Methods.** 310 obese subjects were selected among participants of the cross-sectional SPHERE (Susceptibility to Particle Health Effects, miRNAs and Exosomes) study. This was originally aimed at investigating possible molecular mechanisms underlying the effects of particulate matter exposure on health outcomes. All participants were >18 years at enrollment, with a BMI between 25 and 30 kg/m<sup>2</sup> or ≥30 kg/m<sup>2</sup>. Depression symptoms were evaluated according to the Beck Depression Inventory II (BDI-II). Univariate and multivariable linear regression models were used to test the relation between circulating PCSK9 levels and BDI-II score. The best models selected to predict these associations were adjusted for age, gender, BMI, smoking habits, non-HDL cholesterol (non-HDL-C), triglycerides, QUICKI, HOMA-IR, % eosinophils, thyroid stimulating hormone (TSH) and use of statins and antihypertensive drugs. A linear regression model was also applied to verify the association between FRS and circulating PCSK9 levels, adjusted for BDI-II and BMI.

**Results.** Standard laboratory tests (AST, ALT and gamma-glutamyltransferase) were in the normal range as well as glycemic targets, e.g. glycemia, 93.7±15 mg/dL and glycated hemoglobin, 39.6±6.1 mmol/mol. Participants were moderately hyperlipidemic with mean values of total cholesterol, LDL-C and non-HDL-C of 214.5±38.4 mg/dL, 133.1±33.9 mg/dL and 155.8±38.8 mg/dL, respectively. HDL-C and TG levels were in the normal range, being 58.3±14.4 mg/dL and 118.6±78.9 mg/dL, respectively. Thyroid functionality was also normal (TSH=1.8±1.1 U/mL). PCSK9 levels followed a Gaussian distribution and were significantly associated with BDI-II ( $p=0.049$ ). In individuals with a BDI-II score below 20, the association was positive and statistically significant. For every unit increase of BDI-II, there was an increment of 1.57 ng/mL of PCSK9 levels ( $\beta=1.57$ , SE= 0.80,  $p=0.049$ ); the opposite being found

in individuals with a severe depression, with BDI-II scores above 20 ( $\beta=-5.26$ , SE=1.95,  $p=0.007$ ). PCSK9 mean concentrations rose in a stepwise manner from the minimal depressive group (252 ng/mL; 95% CI 243;262) to the mildly (264 ng/mL; 95% CI 239; 288) and moderately depressed (276 ng/mL; 95% CI 248; 304). The severe depressive group had a lower PCSK9 levels compared to the others (182 ng/mL; 95% CI 125; 240). Multivariable linear regression analysis showed a 20% rise in FRS for every 100 ng/ml increase in PCSK9 levels ( $\Delta=20.69$ , 95%CI: 5.60-35.81,  $p=0.004$ ), independent of BDI-II score and BMI, both not associated with FRS.

**Conclusions.** In obese subjects, PCSK9 levels rise in a stepwise manner up to a certain severity of mood symptoms and remain an independent predictor of CV risk, as assessed by the FRS.

## RESIDUAL VASCULAR RISK IN PATIENTS WITH LIPOPROTEIN(A) HYPERLIPOPROTEINEMIA ON PCSK9 INHIBITORS THERAPY

E. Paiola, V. Sanga, C. Conforti, C. Maneschi, D. Travia, L. Santi, E. Bonora, M.G. Zenti

Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolic Diseases, AOUI Verona  
E-mail: elen.paiola@gmail.com

**Introduction.** Despite significant progress in the identification and treatment of cardiovascular risk (CVR) factors, residual risk represents a challenge to effective prevention. In particular, Lp(a) is involved in processes of vascular damage, its levels cannot be modulated with lifestyle interventions and drugs developed "ad hoc" able to reduce Lp(a) levels are not available yet. PCSK9 inhibitors (PCSK9i) showed only a modest reduction in Lp(a) levels (average -20-30%), with unclear impact in patients with hyperLp(a). Our study estimated the prevalence of patients with hyperLp(a) in a cohort of subjects with high CVR on PCSK9i therapy and assessed the related effects on Lp(a) plasma concentration. **Methods:** Monocentric observational cohort study involving 77 patients on PCSK9i therapy.

**Results.** The cohort included 77 patients (36 women, 41 men), aged 64±10 years; 19 in therapy with alirocumab 75 mg/week, 22 with alirocumab 150 mg/week, 36 with evolocumab 140 mg/week. All subjects had high CVR: 64,9% had a history of CVD, 67,5% had a PVD, 32,5% had a Familial Hypercholesterolemia. 40 patients were statin intolerant (51,9%); 12 subjects (15,6%) were diabetics. At baseline LDL-cholesterol was 174±86,82 mg/dl and Lp(a) median was 58 mg/dl (interquartile range 15-85,3). 38 patients (49,35%) presented hyperLp(a) (>30 mg/dL). After one year, LDL was 68,74±49,27 and Lp(a) 45,2 mg/dl [16-11] in the whole cohort, while in the hyperLp(a) sub-group Lp(a) median was 106 mg/dl [59,75-146].

**Discussion.** In our experience PCSK9i-therapy has a very heterogeneous effect over Lp(a) serum levels. Intensive management of risk factors (i.e. LDL-C, glucose-metabolism and blood pressure) significantly reduces CVR; however atherogenic dyslipidemia, in particular hyperLp(a), remains an untreated factor. Therefore it would be important to focus on new specific therapies for Lp(a); in the meantime lipoprotein apheresis, which is the golden standard treatment, should be considered.

## A NEW VARIANT IN LIPA GENE CAUSATIVE OF LYSOSOMAL ACID LIPASE DEFICIENCY

G. Maione<sup>1</sup>, G. Massini<sup>2</sup>, C. Giacobbe<sup>3</sup>, D. Palma<sup>3</sup>, G. Cardiero<sup>1</sup>, M.D. Di Taranto<sup>1</sup>, O. Guardamagna<sup>2</sup>, G. Fortunato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II e CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Università degli Studi di Torino;

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, e CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli

E-mail: maione@ceinge.unina.it

**Introduction.** Lysosomal Acid Lipase Deficiency (LALD) is an autosomal recessive disorder caused by variants in the LIPA gene leading to the complete or partial deficiency of lysosomal acidic lipase (LAL). This enzyme hydrolyzes cholesteryl esters and triglycerides (TG) internalized after endocytosis of plasma lipoproteins. Patients with LALD are characterized by hyperlipidemia, altered liver function, namely increased aminotransferases, hepatic steatosis and hepatomegaly. The prevalence of LALD is not known because the disorder is severely underdiagnosed worldwide.

**Patient and Methods.** A 55-years-old woman with hypercholesterolemia and high transaminase levels since the age of 22 years (total cholesterol 315 mg/dl, LDL-C 255 mg/dl, HDL-C 39 mg/dl, TG 105 mg/dL, AST 64 UI/L, ALT 125 UI/L) was referred to the lipid clinic of Turin. Liver biopsy revealed the presence of hepatic fibrosis, foamy histiocytes and hepatocytes with foamy and enlarged cytoplasm. The LAL activity resulted decreased <0.02 nmol/punch/hour (n.v. 0.37-2.30 nmol/punch/hour). Treatment with ezetimibe 10 mg/die and Rosuvastatin 10 mg/dL allowed to decrease lipid and transaminase levels. To confirm the clinical suspect of LALD the genetic analysis was performed by a next-generation-sequencing panel of 28 genes involved in lipid metabolism, including LIPA. The rare variants identified were confirmed by Sanger sequencing.

**Results.** Two rare variants were identified in the LIPA gene, one is the most frequent variant causative of LALD - c.894G>A - an apparent synonymous variant that actually leads to skipping of exon 8 - p.(Ser275\_Gln298del). The other variant is the c.260G>A - p.(Gly87Asp) that was never reported as causative of LALD both in HGMD or ClinVar databases. Bioinformatics (Mutation Assessor, SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster and PROVEAN) predict that the variant is pathogenic. According to the ACMG guidelines the variant can be classified as "likely pathogenic".

**Conclusions.** Genetic diagnosis allowed to confirm the LALD disease in the patient and to identify a new causative variant enlarging the spectrum of LIPA pathogenic variants.

## ASSOCIATION BETWEEN HIGHER LEVELS OF DISTINCT PLASMA CERAMIDES AND CARDIOVASCULAR MORTALITY IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE: RESULTS FROM A SUBSET ANALYSIS OF THE GISSI-HF TRIAL

A. Mantovani<sup>1</sup>, G. Lunardi<sup>2</sup>, J. Meessen<sup>3</sup>, S. Bonapace<sup>4</sup>, P.L. Temporelli<sup>5</sup>, L. Tavazzi<sup>6</sup>, A.P. Maggioni<sup>7</sup>, R. Latini<sup>3</sup>, G. Targher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Department of Medicine, University and Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata of Verona; <sup>2</sup>Medical Analysis Laboratory, "IRCCS Sacro Cuore - Don Calabria" Hospital, Negar, Verona; <sup>3</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Milano; <sup>4</sup>Division of Cardiology, "IRCCS Sacro Cuore - Don Calabria" Hospital, Negar, Verona; <sup>5</sup>Division of Cardiology, Istituti Clinici Scientifici Maugeri, IRCCS, Veruno;

<sup>6</sup>Maria Cecilia Hospital, GVM Care & Research, Ettore Sansavini Health Science Foundation, Cotignola; <sup>7</sup>ANMCO Research Center, Florence

E-mail: alessandro.mantovani24@gmail.com

**Background.** Ceramides exert several biological activities that may contribute to the pathophysiology of cardiovascular disease and heart failure (HF). However, the association between plasma levels of distinct ceramides (associated with increased cardiovascular risk) and cardiovascular mortality in patients with chronic HF has received little attention.

**Methods.** In a post-hoc ancillary analysis of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nella Insufficienza Cardiaca-Heart Failure (GISSI-HF) trial, we randomly selected a sample of 200 patients with chronic HF who died for cardiovascular causes during the follow-up of the trial and 200 patients who did not. In these patients, we measured baseline plasma levels of six previously identified high-risk ceramide species [Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0), Cer(d18:1/24:0) and Cer(d18:1/24:1) and their individual plasma ratios with Cer(d18:1/24:0)].

**Results.** Of the six measured plasma ceramides, higher plasma levels of Cer(d18:1/16:0) (adjusted hazard ratio [HR] 1.34, 95% CI 1.13-1.59; p=0.001), Cer(d18:1/20:0) (adjusted-HR 1.23, 95% CI 1.05-1.43; p=0.012) and Cer(d18:1/24:1) (adjusted-HR 1.27, 95% CI 1.08-1.50, p=0.004) were associated with increased risk of cardiovascular mortality, even after adjustment for multiple established cardiovascular risk factors, important comorbidities, medication use, left ventricular ejection fraction and other potential confounding variables. Similarly, increasing plasma ratios of each measured ceramide with Cer(d18:1/24:0) were also independently associated with increased risk of cardiovascular mortality.

**Conclusions.** In this sub-study of the GISSI-HF trial, we show for the first time that higher levels of specific plasma ceramides [especially when used in ratios with Cer(d18:1/24:0)] are significantly associated with greater cardiovascular mortality in ambulatory patients with chronic HF.

## CASE OF A PATIENT WITH ANTI-PHOSPHOLIPID SYNDROME AND SEVERE THROMBOCYTOPENIA UNDERGOING LOWER LIMB REVASCULARIZATION

D. Menichelli, A. Maccarone, P. Pignatelli, E. Rossi, F. Violi,  
D. Pastori

Sapienza University, Roma

E-mail: danilo.menichelli@uniroma1.it

**Background and Aim.** Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease characterized by arterial and/or vein thrombosis or miscarriage in patients with high levels of specific antiphospholipid antibodies (aPL). Anticoagulant therapy with Vitamin K antagonists (VKA) and antiplatelet drugs are commonly used in APS patients with thrombotic events. Here we report the management of antithrombotic therapy in a patient with APS and severe thrombocytopenia undergoing iliac-femoral revascularization.

**Case.** A 49-year-old male patient with personal medical history of peripheral artery disease (stage IV of Lerche-Fontaine classification), deep venous femoral thrombosis associated with caval thrombosis and pulmonary embolism after appendectomy (1989). After this thrombotic event, a positivity for Lupus anticoagulant (LAC) and anticardiolipin antibodies (aCL) IgM and IgG were found. Thus, the patient was diagnosed with APS and prescribed on VKA with INR range of 2.0-3.0. The patient was not taking any other medications. During VKA therapy, the patient experienced bleeding episodes such as epistaxis, hematoma, massive haemorrhage of the lower limb due to varicose rupture) associated with new-onset severe thrombocytopenia, treated with corticosteroids, cyclosporine, vincristine, cyclophosphamide and rituximab. However, platelet count persistently remained below <50.000 mm<sup>3</sup>. Other comorbidities were psoriasis, rheumatoid arthritis and chronic obstructive pulmonary disease. At physical examination, there were pallor, paraesthesia, a weak pulse at the right lower limb associated with claudication intermittens that occurred at a walking distance <50 meters. During the pre-operative tests, triple positivity for aPL antibodies was found: aCL IgG and IgM were 466 GPL/ml and 293.50 MPL/ml (normal values <15 GPL/ml and <15 MPL/ml), LAC was 2.44 ratio (normal value <1.35) and anti-beta 2 glycoprotein I IgM and IgG were 256.50 and 867 UA/ml respectively (normal values <15 UA/ml). Other laboratory tests evaluated showed haemoglobin 9.4 g/dL, mean corpuscular volume 68.5 fL, mean corpuscular haemoglobin 21.7 pg, platelet 58.000/mm<sup>3</sup>, creatinine 0.88 mg/dL. As part of the pre-surgical work-up, a coronary angiography was performed, showing a stenosis of 80% of the right coronary artery, for which a drug eluting stent was placed. A stent was also placed on the right iliac artery. After stents placement, patient was started on double antiplatelet therapy including aspirin 100 mg/die and clopidogrel 75 mg/die. We decided to not start oral anticoagulation given the high risk of bleeding and the very low platelet count. In the post-surgical period, we observed a worsening of thrombocytopenia, with platelet count reaching a value of 5000 mm<sup>3</sup>, which was treated with methylprednisolone 40 mg/die. After 15 days, given the persistence of severe thrombocytopenia (<10.000 mm<sup>3</sup>), immunoglobulins were administered (1 g/kg), with platelets increasing to 60.000 mm<sup>3</sup>. After 1 month, clopidogrel was discontinued and fondaparinux 5 mg/die was added to Aspirin. No bleeding and thrombotic events occurred during the hospitalization and the following month of follow-up. Patient is currently under clinical observation and VKA therapy has been restarted instead of fondaparinux.

**Conclusion.** The case describes the difficulty in managing patients with high thrombotic risk such as those with APS and triple antibody positivity, associated with a high risk of bleeding (i.e. severe thrombocytopenia). These patients represent a clinical challenge requiring a tailored therapeutic approach to balance thrombotic and bleeding risk.

## LIPOPROTEIN METABOLISM AND FUNCTION ARE ALTERED IN PATIENTS WITH ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM

C. Marchi<sup>1</sup>, M.P. Adorni<sup>1</sup>, F. Zimetti<sup>1</sup>, F. Bernini<sup>1</sup>, I. Hollan<sup>2</sup>, J. Moláček<sup>3</sup>, V. Treska<sup>3</sup>, N. Ronda<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Drug, University of Parma;

<sup>2</sup>Lillehammer Hospital for Rheumatic Diseases, M. Grundtvigs veg 6, Lillehammer, Norway and Brigham and Women's Hospital, Cardiology Division, Boston, USA;

<sup>3</sup>Department of Vascular Surgery, Faculty of Medicine and University Hospital in Pilsen, Charles University, Plzen, Czech Republic; <sup>4</sup>Department of Food and Drug, University of Parma  
E-mail: cinzia.marchi2@studenti.unipr.it

**Aims.** The pathophysiology of abdominal aortic aneurysm (AAA) development is still unclarified and insufficient tools are available for prevention, diagnosis and early treatment. Serum lipoproteins are known to exert several regulatory functions in tissues in addition to lipid transport. In particular, high density lipoproteins (HDL) are a family of particles undergoing complex metabolism and known for their protective role through the control of cell cholesterol content and intracellular signaling. This study aimed at evaluating lipoprotein functions and metabolism in patients with AAA, independently of the atherosclerotic process.

**Material and Methods.** We enrolled 30 patients with AAA and 21 control patients with no aortic aneurysm but with the same cardiovascular comorbidities. HDL Cholesterol efflux capacity (CEC) was measured by standardized radioisotopic techniques specific for the membrane transporters ATP-binding cassette G1 (ABCG1) and A1 (ABCA1). Serum cholesterol loading capacity (CLC) was measured by fluorimetric measurement of intracellular cholesterol content in human macrophages. LCAT and CETP activity was evaluated by specific functional assay.

**Results.** HDL CEC was lower for the ABCG1- (-16%; p<0.001) and higher for the ABCA1-pathway in AAA patients (+31.7%; p<0.0001) as compared to control patients. Stratification of AAA patients by smoking indicates that smoke contributes to the observed modifications. Altered HDL metabolism was demonstrated by the increased LCAT (+23%; p<0.0001) and CETP (+49%; p<0.0001) activity in AAA sera. CLC revealed no differences between the two groups. However, the exclusive correlation of this parameter with CEC and CETP only in AAA confirms the relevance of HDL modifications in this pathological condition.

**Conclusions.** In AAA patients, specific alterations of plasma lipoprotein metabolism and function, possibly involved in tissue inflammation and damage of aortic wall typically occurring during aneurysm formation, were detected. Our data might lead the way to future studies aimed at clarifying the possible causal relationship and validating HDL-related parameters as diagnostic markers or therapeutic targets.

## OBESITY-RELATED HYPERPARATHYROIDISM: A NEW PATHOLOGICAL ENTITY WITH POSSIBLE EFFECTS ON CARDIOVASCULAR RISK

S. Ministrini<sup>1</sup>, M.A. Ricci<sup>1</sup>, G. Daviddi<sup>1</sup>, M. Scavizzi<sup>1</sup>, S. De Vuono<sup>1</sup>, M.T. Paganelli<sup>2</sup>, M. Boni<sup>3</sup>, A.M. Scarponi<sup>4</sup>, G. Lupattelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Perugia;

<sup>2</sup>Chirurgia Generale, Ospedale Santa Maria della Misericordia;

<sup>3</sup>Chirurgia Generale, Ospedale S. Giovanni Battista; <sup>4</sup>Medicina Interna, Ospedale Santa Maria della Misericordia

E-mail: stefano.mns@gmail.com

**Background.** Obesity is a risk factor for hypovitaminosis D (HypoD) and hyperparathyroidism (hPTH). Hypo-D is only partially responsible for hPTH and a possible direct effect of leptin on parathyroid glands has been claimed. Hyperparathyroidism could exert a negative effect on glucose metabolism and on vascular function, but evidence about the role of hPTH in morbid obese subjects is lacking. The aim of the study was to evaluate the relationship among parathyroid hormone (iPTH), vitamin D status, leptin, glycometabolic status and markers of early vascular damage in a group of morbid obese subjects before and after laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

**Materials and Methods.** We evaluated the levels of iPTH, 25(OH) vitamin D (25(OH)D) and leptin, together with markers of insulin sensitivity and early cardiovascular disease in a cohort of 160 morbid obese patients eligible for a LSG intervention. Sixty-one patients were evaluated again 1 year after the intervention.

**Results.** Ninety-seven percent of subjects had HypoD and 72% of them had hPTH. After correction for possible confounders, we found a correlation between iPTH levels and carotid intima-media thickness, as well as with HOMA index. Independent predictors of iPTH were age, waist circumference and 25(OH)D. After the LSG, 25(OH)D levels were significantly increased, while iPTH levels were significantly reduced. The reduction of iPTH was significantly correlated with the reduction of BMI, diastolic blood pressure and leptin, which was the independent predictor of iPTH reduction.

**Conclusions.** Our data confirm the high prevalence of HypoD and hPTH in morbid obese patients. Hyperparathyroidism in obese subjects seems to have a multi-factorial origin, a peculiar calcium-phosphate asset and potential negative effects on glucose metabolism and atherosclerotic disease progression. Therefore, we propose the definition of "obesity-related hyperparathyroidism" as a definite complication of morbid obesity, together with other endocrine and metabolic disorders affecting obese subjects.

## ROLE OF MCT1 LACTATE TRANSPORTER IN T LYMPHOCYTES FATE DURING OBESITY

A. Moregola, C. Macchi, M.F. Greco, F. Bonacina, M. Ruscica, G.D. Norata

Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences,  
University of Milan

E-mail: annalisa.moregola@unimi.it

**Introducion.** Recent studies have shed light on the interconnection between metabolism and immunity in multicellular organisms and their functional coordination for an effective establishment and resolution of immune responses. Imbalance of this delicate signaling network might lead to non-resolving inflammation and consequently to the development of obesity associated chronic inflammation (ObCI). T lymphocytes (T cells) accumulate in the adipose tissue during obesity and their activation lead to a switch in their metabolism from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis which involves the production of elevated amount of lactate. MCT1 is a lactate transporter expressed in different type of cells including T lymphocytes. Aim of this project is to investigate the relevance of T cells lactate transport by MCT1, in the context of adipose tissue inflammation during obesity.

**Materials and Methods.** MCT1f/f CD4-cre mice, with specific deletion of MCT1 in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and MCT1f/f littermates were generated and fed with an high-fat diet (HFD; 45% Kcal from fat) for 20 weeks. Body weight was measured weekly; glucose metabolism (glucose-tolerance test (GTT) and insulin-tolerance test (ITT)) was checked at 10 and 20 weeks. Immunophenotyping of different tissues (blood, lymphnodes, adipose tissue, thymus) was performed at 20 weeks by flowcytometry.

**Results.** T cells activation results in the increase of MCT1 expression in both human and mouse T lymphocytes. Following high fat diet feeding, MCT1f/f CD4-cre mice in spite of a similar weight gain and insulin response compared to MCT1f/f, present a decreased visceral (VAT) and subcutaneous (SCAT) fat accumulation. Moreover, MCT1 deficiency in T cells results in a reduction of CD8+ T lymphocytes number in visceral and subcutaneous adipose tissue (VAT MCT1f/f mice 48098 cells/g±36587, MCT1f/f CD4-cre 18497 cells/g±14508, p<0.05; SCAT MCT1f/f 2738 cells/g±1189, MCT1f/f CD4-cre 1669 cells/g±684, p<0.05); this profile was associated with a different T cell subsets distribution (T effector memory (Tem) CD8+ VAT: MCT1f/f 84.20%±5.72, MCT1f/f CD4-cre 57.29%±8, p<0.001; Tem CD8+ SCAT: MCT1f/f 72.2%±14.16, MCT1f/f CD4-cre 44.93%±14.25, p<0.001), but a similar number of innate immune cells (monocyte and macrophages) infiltrating adipose depots. The difference in T cells was not the consequence of increased T cell death in MCT1f/f CD4-cre mice.

**Conclusions.** Our data suggest that MCT1 transporter impacts T lymphocytes activation, in particular CD8+ T lymphocytes, during obesity, independently from systemic metabolism. Whether this difference can affect adipose tissue inflammation during obesity is under investigation.

## RESPONSE TO PCSK9-INHIBITORS AMONG PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: A REAL WORD OBSERVATIONAL STUDY - A YOUSISANET PROJECT

M.L. Morieri<sup>1</sup>, L. D'Erasmo<sup>2</sup>, C. Pavanello<sup>3</sup>, A. Buonaiuto<sup>4</sup>, E. Paiola<sup>5</sup>, R. Scicali<sup>6</sup>, I. Rossi<sup>7</sup>, N. Cocomello<sup>2</sup>, M.R. Mannarino<sup>8</sup>, G. Mandraffino<sup>9</sup>, M.A. Salvati<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Sapienza, Università degli Studi di Roma; <sup>3</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>4</sup>Dipartimento di Medicina e Chirurgia Clinica, Università Federico II, Napoli; <sup>5</sup>AOUI Verona, Dipartimenti di Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo, Verona; <sup>6</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania; <sup>7</sup>Università degli Studi Gabriele d'Annunzio" di Chieti; <sup>8</sup>Medicina Interna, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Perugia; <sup>9</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Messina; <sup>10</sup>Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Magna Graecia, Catanzaro

E-mail: morieri.ml@gmail.com

**Background.** Despite the well-known efficacy and safety of PCSK9-inhibitors (PCSK9i) few data are available on their effectiveness in a real-world clinical setting. Aims of this study were to describe, in a population of subjects with Familial Hypercholesterolemia (FH), the response to PCSK9i and to assess the prevalence of those experiencing a lower-than-expected-response (LTER) in LDL-cholesterol reduction.

**Methods.** We conducted an observational, retrospective study, involving 10 clinical Italian centers (part of LIPIGEN network). Patients with clinical or genetic diagnosis of FH and with at least 6 months of follow-up after initiation of PCSK9i were included. Hypo-responders and non-responders subjects were defined by LDL-c reduction from baseline to follow-up <25% and ≤5%, respectively.

**Results.** 320 subjects initiating either Evolocumab (N=131, 41%) or Alircumab (N=189, 59%) were included, 144 (45%) were female and mean age was 56±12 years. Among 280 subjects with genetic analyses, 239 subjects were Heterozygous (HeFH) and 19 Homozygous (HoFH). Baseline LDL-c levels were 178±64 mg/dl, most patients were receiving statins (84%) and ezetimibe (86%). Over a median follow-up of 5.7 months, almost all patients continued the treatment (N=317, 99.1%), with a significant reduction of LDL-c (58%, 44-68%, P<0.0001), with 26 subjects (8.1%) being hypo-responders and 11 (3.4%) non-responders. Similar results were obtained among those 189 subjects with available data after 12 months of treatment. When the analyses were restricted to the 239 subjects with genetic HeFH diagnosis, the median LDL-c reduction was 59% (46-69%), with 14 (5.9%) hypo-responders and 3 (1.3%) non-responders.

**Conclusions.** In a real-world clinical setting, PCSK9i were confirmed as being highly effective in reducing LDL-c in FH. However, we showed that a small, but consistent, proportion of subjects with FH had a LTER. Further studies are needed to dissect whether the LTER to PCSK9i is linked to modifiable (e.g. adherence) or to unmodifiable (e.g. genetic) factors.

## LIPOPOLYSACCHARIDE INDUCES PLATELET ACTIVATION IN HIV PATIENTS: THE ROLE OF DIFFERENT VIRAL LOAD PATTERNS

C. Nocella, I. Mezzaroma, V. Cammisotto, V. Castellani, S. Bartimoccia, P. Pignatelli, D. Pastori, R. Carnevale  
Sapienza University of Rome  
E-mail: cristina.nocella@uniroma1.it

**Introduction.** Platelets are key mediators in the pathogenesis of cardiovascular diseases, contributing to the inflammatory process and leading to atherosclerosis and cardiovascular complications. Recent experimental and clinical studies discovered that intestinal microbiota is implicated in the atherosclerotic process. As a product of gut microbiota, lipopolysaccharide (LPS), which is a major component of the outer layer of Gram-negative bacteria, may be involved in the atherothrombotic process. However, the effect of LPS on platelet activation is still controversial. Cardiovascular disease is of clinical importance among individuals with Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection and the risk is higher still for those taking antiretroviral therapy (ART). Although ART has suppressed viremia to below the limit of detection of clinical viral load assays, it cannot eliminate viremia completely even after prolonged treatment. Residual viremia could reflect various clinical scenarios such as chronic inflammatory and immunological processes that may contribute to additional risk for cardiovascular events. In HIV patients, gut epithelial integrity is compromised, resulting in enhanced transit of microbial products such as bacterial LPS that can activate immune cells such as monocytes, dendritic cells and other cells including platelets.

**Objectives.** This study aimed to assess in HIV-1 patients with persistent viremia if gut-derived LPS could affect platelet function and the underlying mechanism. **Methods:** In a population comprised of HIV treated patients, HIV naïve patients and control subjects, LPS-mediated platelet activation and oxidative stress were assessed. *In vitro*, platelets from uninfected donors were exposed to plasma from HIV-infected treated and untreated patients. Platelet activation and the underlying mechanism of activation were evaluated.

**Results.** To evaluate the role of platelet activation during HIV infection, 39 HIV-1 treated patients, 13 naïve patients, and 50 healthy controls were enrolled to study platelet activation and oxidative stress. The results showed that platelet activation and oxidative stress biomarkers were still high in treated HIV-1 patients with persistent viremia, compared to control subjects. Similarly, serum LPS and zonulin were high in HIV-1-infected subjects compared to controls with a significant correlation with platelet activation and oxidative stress. To better understand the link between LPS and persistent viral load in the mechanism of platelet activation, *in vitro* experiments were performed. The exposure of platelets to plasma from HIV patients with different viral load and plasma from naïve patients increases platelet activation and oxidative stress compared to the exposure to plasma from healthy subjects. This effect was blunted in platelet pre-treated with TLR4 or TLR7 inhibitors.

**Conclusions.** These data suggest that in HIV patients the combined exposure to HIV-1 itself and LPS derived from the gut might drive platelet toward an increased activation that could lead to atherosclerotic progression. Intervention to modulate endotoxemia could be evaluated to assess if this therapeutic approach, added to conventional HIV therapy, may reduce platelet activation in HIV patients.

## ANALYSIS OF A COURT OF DYSLIPIDEMIC SUBJECTS TESTED FOR THE DETECTION OF CAUSATIVE MUTATIONS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

F. Nota, R. Senkeev, C. Frascaroli, F. Cavalot, K. Bonomo  
*SSD Malattie Metaboliche e Diabetologia,  
 AOI San Luigi Gonzaga di Orbassano*  
 E-mail: fabio.nota@unito.it

**Introduction.** Familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most common hereditary metabolic diseases. The Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) is the clinical risk score predominantly used to help in the diagnosis of FH. The purpose of this analysis was to evaluate the frequency and type of causative mutations of FH in dyslipidemic subjects with possible (DLCNS 3-5), probable (DLCNS 6-7) or certain (DLCNS ≥8) clinical diagnosis of FH. It is also intended to highlight the main clinical aspects in relation to the genotype.

**Materials and Methods.** Our Lipid Clinic participates to the LIPIGEN network of the SISA Foundation and the genetic analyses were conducted in the frame of the LIPIGEN project. Genetic analysis was performed to find mutations responsible for FH (mutations of LDL-R, APO-B, PCSK9, STAP1, APOE and LDLRAP1) in 101 subjects with DLCNS ≥3. Since the DLCN score target for the genetic analysis had not been set in the earlier phases of the Lipigen project, we had the chance to examine subjects with relatively low DLCN scores in whom the genetic analysis was equally performed.

**Results.** Genetic analysis showed the presence of causative mutations for FH in 54% of patients, while in 46% no mutation of the mentioned genes was found. In particular, 24/35 (69%) subjects with DLCNS ≥8 were positive, as well as 13/24 (54%) subjects with DLCNS 6-7 and 17/42 (40%) subjects with DLCNS 3-5. All positive subjects (100%) had a heterozygous mutation in the LDL-R gene. In 3 cases mutations in the PCSK9 gene were associated and in one case a mutation in the LDLRAP1 gene was found (compound heterozygotes). The positive subjects were compared with the negative subjects for the following parameters: age at diagnosis, BMI, fasting blood glucose, total cholesterol, HDL-C, triglycerides and pre-treatment LDL-C. Statistically significant differences in age at diagnosis (positive/negative: 31±15 vs 39±14 years, p=0.05), LDL-C (positive/negative: 270±80 vs 236±58 mg/dL, p=0.02) and triglycerides (positive/negative: 102±45 mg/dL vs 145±74 mg/dL, p=0.001) were found. The BMI was instead superimposable between the two groups (positive/negative: 25.3±4 vs 25.9±4 kg/m<sup>2</sup>, p=0.504) as well as the fasting blood glucose (97±16 vs 100±21 mg/dL, p=0.661). HDL-C values were lower in the group of subjects with mutations (54±14 vs 60±16 mg/dL p=0.068); however, for the interpretation of this data, the different distribution of the sexes in the two groups must be considered (positive: 30 M+24 F; negative: 24 M+23 F). The two groups were finally compared for the presence of comorbidity and the response to hypolipidemic therapy. Among subjects with causative mutations of FH there was a significantly higher incidence of CV events compared to subjects without mutations (9/54 vs 2/47, p<0.03). The prevalence of arterial hypertension, DMT2 and peripheral arteriopathy was significantly higher in subjects negative for mutations. Subjects with a documented mutation were more frequently treated with polytherapy (high intensity statin + ezetimibe + PCSK9 inhibitors) than subjects without mutations (p=0.003). In particular, it was necessary to use PCSK9 inhibitors in 25/54 (46%) subjects with causative FH mutations, while the use of PCSK9 inhibitors occurred in 7/47 (14%) subjects with negative genetic analysis.

**Conclusions.** The typical phenotype of subjects with FH is characterized by a marked form of pure hypercholesterolemia with normal triglyceride and fasting blood sugar values; the diagnosis of FH is usually made earlier and the prevalence of CV events is definitely higher than in non familiar forms. Treatment with PCSK9 inhibitors is frequently needed and represents an excellent therapeutic opportunity for a considerable number of subjects with FH in order to achieve the desired therapeutic targets.

## A CASE OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA WITH SEVERAL RARE VARIANTS IN DIFFERENT LIPID-RELATED GENES

D. Palma<sup>1</sup>, G. Massimi<sup>2</sup>, M.D. Di Taranto<sup>1</sup>, C. Giacobbe<sup>1</sup>, G. Maione, G. Cardiero<sup>1</sup>, O. Guardamagna<sup>2</sup>, G. Fortunato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli e CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli; <sup>2</sup>Amb. Dislipidemie e Prevenzione Cardiovascolare, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino  
 E-mail: palmad@ceinge.unina.it

**Introduction.** Approximately 20% to 40% of clinically defined familial hypercholesterolemia (FH) patients do not show a causative variant in candidate genes (LDLR, APOB and PCSK9). Oligogenic FH is a condition in which the accumulation of multiple rare variants in different lipid-related genes could be causative of hypercholesterolemia in FH patients without pathogenic variants.

**Patient, Materials and Methods.** Here we report a 10-years-old boy affected by abdominal pain showing severe hypercholesterolemia (total cholesterol 251 mg/dL, LDL-c 184 mg/dL, triglycerides 76 mg/dL and HDL-c 52 mg/dL). The family history was positive for hypercholesterolemia and acute myocardial infarction. Patient was screened by next-generation sequencing (NGS) to detect variants in a panel of 28 lipid related-genes. Rare variants identified by NGS were confirmed by Sanger sequencing. Pathogenicity assessment was performed by ACMG guidelines.

**Results.** No clearly pathogenic variants in FH-causative genes were identified, although rare variants were identified: c.2312-59C>T in LDLR gene - predicted to not affect splicing and that should be considered as a variant of uncertain significance (VUS); and c.12382G>A - p.(Val4128Met) in APOB, previously described as benign. Other VUS were found in different genes: c.293C>G - p.(Ala98Gly) in ABCG5, a gene causative of sitosterolemia; and c.1232+20G>A in LMF1 gene, a gene causative of hypertriglyceridemia. The ABCG5 variant was previously identified in FH patients in an Argentine study. No copy number variations were found.

**Conclusion.** Our results supported the idea of an oligogenic basis of FH, i.e. that some patient without clearly pathogenic variants in causative genes can carry several variants in lipid-related genes giving rise to the FH phenotype. In the future, a large use of extended gene panels analyzed by NGS can help to identify oligogenic cases and to determine their frequency among FH patients.

## CUMULATIVE EXPOSURE TO BISPHOSPHONATES AND RISK OF CARDIO-CEREBROVASCULAR EVENTS: A POPULATION-BASED RETROSPECTIVE COHORT STUDY

E. Olmastroni<sup>1</sup>, M. Casula<sup>2</sup>, F. Galimberti<sup>1</sup>, E. Tragni<sup>1</sup>, G. Corrao<sup>3</sup>, L. Scotti<sup>4</sup>, A.L. Catapano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan & IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano; <sup>3</sup>National Centre for Healthcare Research & Pharmacoepidemiology, Milan, & Laboratory of Healthcare Research & Pharmacoepidemiology, Department of Statistics and Quantitative Methods, University of Milano-Bicocca, Milan; <sup>4</sup>Unit of Biostatistics, Epidemiology, and Public Health, Department of Statistics and Quantitative Methods, University of Milano-Bicocca, Milan  
E-mail: elena.olmastroni@unimi.it

**Background and Aim.** Since there is conflicting evidence for the protective role of bisphosphonates against atherosclerotic events, we aimed at investigating the effect of bisphosphonates on cardio-cerebrovascular events.

**Methods.** We carried out a retrospective cohort study selecting from administrative databases of Lombardy (Italy) all patients aged >40 years with a first prescription for bisphosphonates (index date) between 2003/01/01 and 2006/12/31. Subjects were followed from the index date until the date of the first hospitalization for cardio-cerebrovascular event, death, migration, or end of follow-up (2012/12/31), whichever occurred first. Exposure to bisphosphonates was characterized based on cumulative doses (proportion of days covered, PDC). Treatment's adherence was classified as low (PDC≤40%), intermediate (PDC 41%-80%), or high (PDC>80%). Cox models were fitted to estimate the association between time-dependent exposure to bisphosphonates and cardio-cerebrovascular events (adjusted hazard ratios [HRs] and 95% confidence intervals). The model was adjusted for age, sex, comorbidities, and concomitant treatments.

**Results.** Among 82,704 incident bisphosphonates users (females 87.0%; mean age±SD 70.7±10.6 years), we identified 13,337 individuals (16.1%) with a first hospitalization for cardio-cerebrovascular event, occurred on average (SD) 3.5 (2.3) years after the index date. Compared with individuals with an exposure ≤40% of follow-up, those exposed for 41-80% or more than 80% showed HRs of 0.95 [0.91-0.99] and 0.75 [0.71-0.81], respectively. In the sub-analysis based on type of event, a PDC>80% was associated with a reduction of both cardiovascular and cerebrovascular events (HRs 0.75 [0.68-0.83] and 0.76 [0.70-0.83], respectively). The protective effect was confirmed both in the analyses stratified by sex and age classes, and in those performed at 1 and 3 years of follow-up.

**Conclusions.** Although further studies to investigate possible mechanisms are warranted, it is important to consider bisphosphonates, and a strict adherence to this treatment, as having a potential effect also in the prevention of cardiovascular events.

## IMPACT OF CARDIAC SURGERY TIME-OF-THE-DAY AND FASTING METABOLISM ON PERIOPERATIVE SYSTEMIC INFLAMMATION

C. Panzavolta<sup>1</sup>, E. Woitrain<sup>2</sup>, S. Aghessaf<sup>2</sup>, H. Dubrulle<sup>2</sup>, S. Ninni<sup>2</sup>, T. Modine<sup>2</sup>, F. Pontana<sup>2</sup>, A. Coisne<sup>2</sup>, A. Zambon<sup>3</sup>, B. Staels<sup>2</sup>, D. Montaigne<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinica Medica 1, Department of Medicine - DIMED, University Hospital of Padua; <sup>2</sup>Department of Clinical Physiology and Echocardiography, Heart Valve Clinic, University Hospital CHU Lille & Univ. Lille & Institute Pasteur de Lille & EGID, France; <sup>3</sup>Clinica Medica 1, Department of Medicine - DIMED, University Hospital of Padua  
E-mail: panzavolta.chiara@gmail.com

**Background.** Patients undergoing cardiac surgery still face a significant incidence of postoperative complications. Aim: To investigate whether peri-operative systemic inflammation induced by cardiac surgery is impacted by of time-of-the-day (morning vs afternoon) of surgery and fasting metabolism.

**Materials and Methods.** Patients were included in the prospective POMI-AF Cohort Study (NCT03376165) referred to the University Hospital of Lille for coronary artery bypass grafting and/or valve surgery, from September 2018 to June 2019. Clinical data and blood samples were collected on surgery day (J0), after 24 h (J1) and after 7 days (J7), for standard metabolic profile and for PBMC (peripheral blood mononuclear cells) isolation. Moreover, Multiplex Assay for 29 serum cytokines and qPCR for NLRP3, IL1β, IL18 on PBMC at J0-J1-J7 were performed in a subgroup of 24 patients.

**Results.** 87 patients were split according to surgery time-of-the-day (morning 8-11am n=51 patients; afternoon 14-16pm n=36 patients). Despite no difference was observed regarding the two groups baseline characteristics, surgery was associated with higher CRP increase in the morning vs afternoon patients ( $p<0.001$  by two-way ANOVA). For 24 patients inflammatory cytokines were dosed at J1 after surgery, showing increased blood IL6, G-CSF ( $p<0.001$ ), IL-8 ( $p=0.0078$ ), IL-10 ( $p=0.0037$ ) and IL-18 ( $p=0.0025$ ). Metabolic profile of 47 patients revealed lower glucose and higher beta-hydroxybuturate (BHB) serum concentration on afternoon vs morning surgery ( $p=0.0043$  by post-hoc t test), as a result of the prolonged fasting. An inverse correlation was observed between fasting BHB concentration and post-operative peak plasma CRP concentration after surgery ( $r=-0.30$ ;  $p=0.041$ ).

**Conclusions.** Cardiac surgery induces a systemic inflammation with increase of CRP, IL6, G-CSF and IL-18. CRP levels observed after afternoon surgery might result from related prolonged fasting and subsequent increase in blood ketone bodies.

## ROLE OF SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE AND ITS RECEPTORS S1P1 AND S1P3 IN THE REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT

B. Papotti<sup>1</sup>, I. Zanotti<sup>1</sup>, E. Scalera<sup>1</sup>, D. Greco<sup>1</sup>, S. Battista<sup>1</sup>, F. Bernini<sup>1</sup>, J.-R. Nofer<sup>2</sup>, M. Simoni<sup>3</sup>, F. Potti<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Drug, University of Parma; <sup>2</sup>Center for Laboratory Medicine, University Hospital of Münster, Münster, Germany; <sup>3</sup>Department of Biomedical, Metabolic and Neural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena;

<sup>4</sup>Department of Medicine and Surgery, Unit of Neurosciences, University of Parma

E-mail: bianca.papotti@gmail.com

**Background and Aim.** Sphingosine 1-phosphate (S1P) is an integral constituent of High-Density Lipoprotein (HDL) particles and has been proposed to contribute to many of the cardiovascular and atheroprotective effects of HDL. Indeed, S1P is a bioactive lysosphingolipid, which binds to its 5 specific G protein-coupled receptors, particularly expressed in cardiovascular system. To date, we have no direct evidence connecting endogenous S1P with cellular and systemic cholesterol handling. This study aims to investigate the role of endogenous S1P in the modulation of reverse cholesterol transport (RCT), a relevant physiological anti-atherogenic process.

**Materials and Methods.** We evaluated the role of S1P receptors employing a transgenic mouse model overexpressing S1P1 or S1P3 receptor in myeloid lineage (S1P1-Lyz or S1P3-Lyz, respectively). In vivo RCT was measured through a radioisotope technique by injecting 3[H]-Cholesterol-enriched MPM isolated from both CTRL and S1P1-Lyz or S1P3-Lyz mice in C57BL/6 recipient. Cholesterol efflux from cultured MPM was evaluated in CTRL and S1P1 and S1P3-Lyz MPM through a radioisotope technique, adding HDL (12,5µg/ml) or murine plasma (0,5% and 2% v/v) as cholesterol acceptors.

**Results and Conclusions.** Mice injected with S1P1-Lyz MPM displayed an increased 3[H]-Cholesterol elimination in faeces compared to CTRL MPM-injected mice ( $0,38\%\pm0,009$  vs  $0,30\%\pm0,01$ ;  $p<0,001$ ). Upon incubation with acetylated LDL, S1P1-Lyz MPM are characterized by an increased cholesterol efflux to plasma compared to CTRL MPM ( $5,42\%\pm0,16$  vs  $4,33\%\pm0,38$ ;  $p<0,001$ ). S1P1-Lyz MPM stimulated with LXR/RXR agonists showed an increased cholesterol efflux to HDL ( $5,24\%\pm0,77$  vs  $4,34\%\pm0,38$ ;  $p<0,05$ ). In vivo total RCT resulted higher in S1P3-Lyz MPM injected mice compared to CTRL MPM-injected group, as 3[H]-Cholesterol found in plasma ( $0,99\%\pm0,32$  vs.  $0,60\%\pm0,12$ ;  $p<0,05$ ), liver ( $2,66\%\pm0,41$  vs  $1,99\%\pm0,35$ ;  $p<0,01$ ) and faeces ( $0,99\%\pm0,19$  vs  $0,66\%\pm0,10$ ;  $p<0,01$ ) was higher in the former. Consistently, acLDL-loaded S1P3-Lyz MPM displayed an increased cholesterol efflux to HDL ( $8,47\%\pm0,63$  vs  $5,93\%\pm0,46$ ;  $p<0,001$ ) and mouse plasma compared to CTRL ( $8,04\%\pm0,43$  vs  $10,49\%\pm1,2$ ;  $p<0,001$ , and  $22,99\%\pm1,2$  vs  $37,09\%\pm5,43$ ;  $p<0,001$ , to 0.1% and 2% mouse plasma, respectively). Similarly, S1P3-Lyz MPM stimulated with LXR/RXR agonists showed an increased cholesterol efflux to HDL ( $7,45\%\pm1,36$  vs  $5,31\%\pm0,37$ ;  $p<0,01$ ) and plasma ( $6,17\%\pm1,17$  vs  $3,76\%\pm0,46$ ;  $p<0,01$ ) compared to CTRL MPM. Endogenous S1P, through the interaction with its receptors S1P1 and S1P3 on macrophages, positively modulates cholesterol metabolism by improving RCT, thus exerts a potentially anti-atherogenic function in vivo.

## ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN LIVERS OF KNOCK-IN MOUSE MODELS BY MICROARRAY TECHNOLOGY

C. Parolini<sup>1</sup>, G.S. Ganzetti<sup>1</sup>, E. Rigamonti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>IRCCS Ospedale San Raffaele Scientific Institute, Milan

E-mail: cinzia.parolini@unimi.it

The natural variant of human apoA-I, i.e. the apoA-IMilano (A-IM), is the result of a point mutation, with an arginine to cysteine substitution at position 173. Carriers of this mutation exhibit hypertriglyceridemia with markedly reduced HDL and apoA-I plasma levels, a condition generally associated with a high risk of premature coronary disease. Evaluation of the cardiovascular status in A-IM carriers, compared with control subjects from the same kindred, did not reveal any evidence of increased CVD. In addition, whether A-IM may impart a “gain of function” compared to wild-type apoA-I still an open question. This study was aimed at investigating intrinsic differences in the livers of mice expressing human apoA-I or A-IM, by using the Affymetrix GeneChip Mouse Gene ST system. To this aim, previously generated A-I (A-I k-in) or A-IM knock-in mice (A-IM k-in) were crossed with transgenic mice expressing human apoA-II but lacking of murine apoA-I (hA-II) to generate hA-II/A-I k-in, and hA-II/A-IM k-in, respectively. hA-II/A-IM k-in mice were characterized by lower HDL cholesterol and A-I/A-IM plasma levels and by higher triglyceride concentrations compared to both hA-II/A-I k-in and A-IM k-in mice. The expression of 871 genes was significantly altered between the hA-II/A-I k-in and hA-II/A-IM k-in mouse lines, of which 373 up- and 498 down-regulated in hA-II/A-I k-in compared to hA-II/A-IM k-in mice. 1018 differentially expressed genes, 434 up- and 584 down-regulated, were instead found in A-IM versus hA-II/A-IM k-in animals. Comparison of the up-regulated genes by Venn diagrams revealed 46 genes in common to hA-II/A-I k-in, hA-II/A-IM and A-IM k-in mice. Among these, the Elov6 gene, a key lipogenic enzyme, has been discovered. Protein association networks (STRING database) of Elov6 highlighted that A-IM could be associated with a modulation of fatty acid (FA) metabolism (i.e. FAs synthesis and catalysis) and biosynthesis of unsaturated FAs.

## EFFECT OF THE RS1051338 POLYMORPHISM OF LIPA GENE ON LIPID PHENOTYPE, LIVER ASSESSMENT AND LYSOSOMAL ACID LIPASE ACTIVITY: POSSIBLE ASSOCIATION WITH NAFLD

A. Pasta<sup>1</sup>, A.L. Cremonini<sup>1</sup>, P. Borro<sup>2</sup>, A. Picciotto<sup>3</sup>, R. Fresa<sup>3</sup>, G. Tozzi<sup>4</sup>, L. Pisciotta<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, University of Genoa; <sup>2</sup>IRCCS S. Martino Polyclinic Hospital, Genoa; <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, University of Genoa; IRCCS S. Martino Polyclinic Hospital, Genoa; <sup>4</sup>Bambino Gesù Children's Hospital, Rome; <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, University of Genoa; IRCCS S. Martino Polyclinic Hospital, Genoa  
E-mail: andreapasta93@gmail.com

**Background.** Lysosomal Acid Lipase deficiency (LAL-D) is an autosomal recessive disease characterized by hypoalphalipoproteinemia, mixed hyperlipidemia and hepatic steatosis. The rs1051338 polymorphism in LIPA gene has been previously associated with increased risk of atherogenic dyslipidemia, metabolic syndrome, obesity and cardiovascular disease and, *in vitro*, could adversely affect the LAL activity (LAL-A). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the presence of fat in the liver (FL) after the exclusion of other secondary causes. The aim of the study was to value the impact of rs1051338 rare allele (c.46C) on lipid phenotype, hepatic steatosis and LAL-A. Hepatic fibrosis and liver transaminase were also evaluated.

**Materials and Methods.** We included 45 subjects with hypoalphalipoproteinemia and, at least, one of the following conditions:

hypertriglyceridemia, transaminase elevation or hepatic steatosis.

Demographic and anthropometric parameters, lipid and glycemic profiles and liver transaminases were evaluated for all patients. Genetic analysis was performed with the length of the restriction fragments method and LAL-A was measured on dry blood spot with standard technique. All included patients underwent ultrasonographic evaluation with the "Controlled Attenuation Parameter" (CAP) technique and hepatic stiffness evaluation with "shear wave" emitter. Statistical analysis was performed with IBM SPSS.

**Results.** The presence of rare c.46C (genotypes c.46AC or c.46CC) allele resulted in statistically higher levels of triglycerides and hepatic transaminase and lower levels of HDL cholesterol compared to wild type genotype (c.46AA). The rare c.46C allele is associated to higher values of CAP compared to controls (332 308 - 346 vs 295 275 - 325 between c.46AC+c.46CC vs c.46AA with p=0.033) and the multivariate analysis highlighted the independent association between the rare C allele and the severity of hepatic steatosis in subjects with NAFLD. Among genotypes none differences in the other parameter evaluated were identified. In conclusion, the rs1051338 is associated with NAFLD and atherogenic dyslipidemia.

## DIFFERENT CLINICAL MANIFESTATIONS DESPITE A COMMON LIPID PHENOTYPE IN THREE NOVEL CASES OF TANGIER DISEASE

C. Pavanello<sup>1</sup>, L. Pisciotta<sup>2</sup>, R. Spina<sup>3</sup>, C. Scrimali<sup>3</sup>, S. Castelnovo<sup>4</sup>, G. Mombelli<sup>4</sup>, A. Branchi<sup>5</sup>, E. Cassinero<sup>6</sup>, A. Baldassare Cefalu<sup>3</sup>, S. Bertolini<sup>2</sup>, M. Gomaraschi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova; <sup>3</sup>Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DIBIMIS), Università di Palermo; <sup>4</sup>Centro Dislipidemie, Dipartimento Cardiotoracovascolare, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano; <sup>5</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano; <sup>6</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Fondazione IRCCS Policlinico, Milano  
E-mail: chiara.pavanello@unimi.it

Tangier disease (TD) is a very rare autosomal recessive disorder caused by mutations in the ABCA1 gene. It is characterized by near absence of plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), accumulation of cholesterol in multiple tissues, peripheral neuropathy, and accelerated atherosclerosis. However, clinical manifestations have a high variability. Here we report three new cases of Tangier disease harboring both known and novel mutations in ABCA1 gene. Case 1, a 25-year old male of Iranian origin, is homozygote for a novel intronic variant, c.721-2A>G, predicted to produce a short truncated protein; case 2, a 45-year old male, is homozygote for the novel nonsense mutation W1526X. Interestingly, he is also heterozygous carrier of the common variant E8SJ in LIPA gene. Case 3, a 56-year old female, is compound heterozygote for two previously reported missense variants (Asn1800His/Arg1068His). All the patients show severe hypoalphalipoproteinemia with nearly absence of both apoA-I and apoA-II. Plasma LDL-C levels are also reduced; in addition, case 3 displays hypertriglyceridemia. None of them is receiving lipid-lowering treatment. Besides the common lipid abnormalities, subjects display different clinical manifestations. Indeed, thrombocytopenia and hepatosplenomegaly are present in case 1 and in case 2, consistent with the diagnosis of TD. However, neither of them displays signs of preclinical atherosclerosis. Conversely, case 3 has no signs of blood cells abnormalities and normal liver and spleen, but she has increased carotid IMT, with several stenotic plaques. Our findings provide insights into the diverse clinical phenotype of this rare disorder and suggest that ABCA1 deficiency must be considered in patients with low HDL-C, regardless the presence of other clinical manifestations.

## SYSTEMATIC LAB KNOWLEDGE INTEGRATION FOR MANAGEMENT OF LIPID EXCESS IN HIGH-RISK PATIENTS: RESULTS FROM THE SKIM LEAN PROJECT

C. Pavanello<sup>1</sup>, M. Parolini<sup>2</sup>, A. Alberti<sup>3</sup>, M. Carenini<sup>4</sup>,  
P. Maino<sup>4</sup>, G. Mombelli<sup>3</sup>, F. Pazzucconi<sup>1</sup>, G. Origgi<sup>5</sup>, F. Orsi<sup>5</sup>,  
M.G. Trivella<sup>2</sup>, L. Calabresi<sup>1</sup>, R. De Maria<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro E. Grossi Paletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Dipartimento Cardiotoracovascolare, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano; <sup>3</sup>SSD Diagnosi e Cure Territoriali per Malattie Cardiache, Dipartimento Cardiotoracovascolare, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano; <sup>4</sup>Dedalus S.p.A., Bologna; <sup>5</sup>Sistemi Informativi Aziendali, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano;

E-mail: chiara.pavanello@unimi.it

Despite the big improvements of the recent years in the clinical management of cardiovascular disease, the rate of underdiagnosed and undertreated high-risk subjects contributes to the still raised CVD burden worldwide. Implementation of a systematic approach in the management of CV risk may represent a strategy to reduce the social and economic impact of this disease. Methods: The SKIM LEAN project exploits the big data deriving from electronic health records of the Niguarda Hospital catchment area, integrated with clinical database and routine laboratory tests for the identification and early referral to specialist care of patients with hypercholesterolemia, who may be inadequately controlled according to their risk level. The project included a retrospective epidemiological analysis and a prospective assessment phase in subjects with suspected familial hypercholesterolemia and in patients with a previous atherothrombotic event (ASCVD). In addition, the population-level changes in lipid profile between the first (2016 and 2017) and second (2018) data extraction were assessed. A total of 617,793 laboratory records were processed between January and December 2016 and 25,248 patients (females 43.7%) with at least one valid LDL-C value available were identified. Seven hundred and fifty-eight subjects with suspected familial hypercholesterolemia and 2253 with previous ASCVD were eligible for the prospective phase.

Major findings:

- 1) At follow-up, 12% of FH patients achieved the recommend target of LDL-C <100 mg/dL or at least a 50% reduction from baseline.
- 2) At follow-up, the proportion of patients in secondary prevention with LDL-C levels <100 mg/dL increased from 39% to 69%.
- 3) In the overall population, a significant decrease in LDL-C concentrations was observed between 2017 and 2018.

**Conclusions.** The SKIM LEAN project provided evidence for the feasibility and usefulness of the use of a systematic approach in the identification and treatment of high-risk patients, finally improving prevention of costly CV events.

## VASCULAR ACCESS IN LIPOPROTEIN APERESIS: SAVE THE VEIN, SAVE THE LIFE

M. Pianelli, R. Luciani, F. Sbrana, B. Dal Pino,  
F. Bigazzi, T. Sampietro

Lipoapheresis Unit, Reference Center For Diagnosis And Treatment Of Inherited Dyslipidemias, Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa

E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

**Background.** Vascular access is life-saving for patients who depend on Lipoprotein Apheresis (LA), such as those suffering from inherited dyslipidaemias.

**Methods.** Since 1994, we performed more than 500 treatment/year and a total of 67 patients (male 73%) were treated in 25 years (34 current patient and 33 former patients). We revised data regarding vascular access in these patients.

**Results.** LA techniques were: dextran-sulphate absorption from plasma (Liposorber®-LA MA-03 systems; Kaneka, Osaka, Japan; 19/34 current patients), heparin-induced LDL precipitation apheresis (HELP®, B. Braun, Melsungen, Germany; 10/34 current patients), immunoabsorption (TheraSorb™ - LDL pro Adsorber, Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Germany; 5/34 current patients). Thirty-three patients discontinued LA because: therapeutic target was reach by PCSK9i therapy (17/33); treatment refusal (8/33), death (5/33), terminal renal failure requiring dialysis (2/33), lack of reliable vascular access (1/33). Only in 5 cases arteriovenous fistula were performed before LA treatment. It occurred in 4 female and in an 8-year-old child affect by Homozygous Familial Hypercholesterolemia who started LA 26-years ago. In this patient the venous arterial fistula was subsequently surgically closed due to a good development of brachial venous system. Out of 4 females, a patient had failure of arteriovenous fistula secondary to thrombosis; this patient discontinued LA for inability to obtain reliable vascular access and started PCSK9i drug. All the other patients chronically continued LA without significant long-term problems on vascular access.

**Conclusions.** In own Center we paid particular attention to nurse skills in vascular access management and in the chosen needle: we mostly used the Diacan® Set (B. Braun, Melsungen, Germany) because is extremely thin-walled (diameter 18G; length 20 mm), allow a laminar flow, ensures a high blood flow rate (90-95 ml/minute) with a minimal trauma to the vascular access. An incorrect management of vascular accesses can lead to discontinuation of a life-saving treatment as LA.

## USE OF COMPLEMENTARY MEDICINE IN A SAMPLE OF PATIENTS IN CARDIOVASCULAR PREVENTION CLINIC

M. Pulicano, A. Maretta, V. Spagnuolo

Lipid Center Cosenza

E-mail: vitalianos@yahoo.com

Complementary medicine (CM) can play a role improving health and well-being and can be integrated with traditional medicine. It is often self-prescribed and it can expose to potential risks from drug interactions with conventional medicine drugs. We evaluated, in a group of outpatients in a dedicated clinic to prevention of cardiovascular diseases, the use of CM. We enrolled the first hundred outpatients, aged over 50, of a Cardiovascular Prevention Clinic (Lipid Center Cosenza). All hundred patients were given a questionnaire (validated questionnaire proposed in an AARP/NCAAAM study) concerning use of CM in the last 12 months. Fifty-five were females. Average age was  $66.6 \pm 8.45$  years;  $68.2 \pm 6.4$  (females),  $64.7 \pm 10$  (males). Twenty-five patients reported use of CM approved by our legal system. Osteopathy and chiropractic were the most used (15 patients); posturology (5 patients), herbs (5 patients). Females were more prone to use CM (20 vs 5). The most frequently given motivation to use CM was to solve a certain pathological condition (77%) rather than prevent a disease. Regarding to full awareness in carrying out CM, 15 patients out of 25 fully knew the indication for use before starting it, and the same fifteen had received precise indications from their doctor. Seventy-five were already being treated with at least one drug before enrollment (average  $2.35 \pm 1.9$ ). Of the 25 patients who used CM, all took at least two drugs (average  $3.6 \pm 1.2$ ). The fact that they have taken substances without having informed a healthcare professional has potential for risk, given the possible interaction between medicines also in the field of CM. CM is widely used in our reality, but often without the patient informing the doctor. Better management of counseling is therefore necessary to improve the indication and safety of the use of CM.

## BARIATRIC SURGERY IMPROVES, BUT DOES NOT COMPLETELY RESTORE BETA CELL FUNCTION IN OBESE DIABETIC PATIENTS

E. Rinaldi<sup>1</sup>, M. Trombetta<sup>1</sup>, G. Ceradini<sup>1</sup>, A. Altomari<sup>1</sup>, M.L. Boselli<sup>1</sup>, L. Santi<sup>1</sup>, M. Battistoni<sup>2</sup>, R. Bonadonna<sup>3</sup>, E. Bonora<sup>1</sup>, M.G. Zenti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo, Università e AOUI Verona; <sup>2</sup>Chirurgia Generale e dell'Obesità, AOUI Verona; <sup>3</sup>Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università e Azienda Ospedaliera di Parma

E-mail: elisabettarinaldi@hotmail.com

**Background.** Impact of bariatric surgery (BS) on the different components of glucose homeostasis is a matter of active investigation. Aim of the study was to investigate the changes induced by BS on beta-cell function (BCF) insulin clearance (IC) and I-Sen during time in a group of type 2 diabetic (T2D) patients.

**Methods.** 10 T2D-obese patients ( $M/F=5/5$ , mean age: 54.3y) underwent BS (3 sleeve gastrectomy, 7 RYgastric bypass). We used a standardized 5h-mixed-meal-test (MMT: 186 Kcal; polenta plus parmesan cheese) at baseline (MMT0), at 1 month (MMT1) and at 12 months (MMT12) after surgery to assess:

- 1) glucose, lipid levels, insulin, C-peptide, GIP and GLP-1 concentrations;
- 2) BCF expressed as derivative (DC) and proportional control (PC);
- 3) I-Sen expressed as Oral Glucose Insulin Sensitivity index (OGIS);
- 4) IC. Then we analyzed the net effect of BCF, IC and I-Sen in determining variations of glucose tolerance over time. Glucose metabolism was also compared with 9 healthy subjects with normal glucose tolerance.

**Results.** BMI and waist circumference decreased at 1-month ( $\Delta$ weight: -13.5 kg;  $\Delta$ waist: -10 cm;  $p<0.01$  for both) and at 12-months ( $\Delta$ weight: -36.2 kg;  $\Delta$ waist: -31 cm;  $p<0.001$ ). Diabetes remission occurred in 80% of patients. The area under curve (AUC) of glucose was reduced by 23% (MMT1) and 32% (MMT12) ( $p=0.007$  for both) and the AUC insulin by 40% and by 56% during MMT1 ( $p=0.017$ ) and MMT12 ( $p=0.005$ ). The overall work of the beta-cell decreased by 14% ( $p=0.047$ ) and by 47% ( $p=0.007$ ), respectively. I-Sen significantly improved after surgery ( $p=0.005$ ). An improvement of the adaptation of the beta-cell secretion to the degree of I-Sen was observed, mainly one year after surgery. A complete restoration of the relation between I-Sen and I-Sec was not observed.

**Conclusions.** BS in T2D-obese subjects determines an improvement in I-Sen and a restoration of the dynamic of I-Sec after meal. The effect was more evident 1 year after surgery but already detectable after 1 month. However, the relation of insulin availability and I-Sen improved a little only in the long term and remained subnormal. This data highlights the necessity of a regular follow-up of patients in whom a remission is achieved.

## STATIN THERAPY IS ASSOCIATED WITH BETTER AMBULATORY BLOOD PRESSURE CONTROL: A PROPENSITY SCORE ANALYSIS

L. Ristori<sup>1</sup>, F. Spannella<sup>2</sup>, A. Filipponi<sup>2</sup>, F. Giulietti<sup>2</sup>, C. Di Pentima<sup>2</sup>, V. Bordoni<sup>2</sup>, R. Sarzani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Internal Medicine and Geriatrics, "Hypertension Excellence Centre" of the European Society of Hypertension, IRCCS INRCA, Ancona, Department of Clinical and Molecular Sciences, University "Politecnica delle Marche", Ancona; <sup>2</sup>Internal Medicine and Geriatrics, "Hypertension Excellence Centre" of the European Society of Hypertension, IRCCS INRCA, Ancona, Department of Clinical and Molecular Sciences, University "Politecnica delle Marche", Ancona*  
E-mail: letizia.ristori@gmail.com

**Objective.** Statin therapy was associated with lower blood pressure (BP) in some but not all studies. We evaluated the association between statin therapy and 24 h BP in a large hypertensive population using "propensity score matching".

**Methods.** Retrospective observational study on 1827 consecutive essential hypertensives evaluated with 24 h ambulatory BP monitoring. Anti-hypertensive treatment intensity (ATI) was calculated to compare different drug associations. We used a propensity score matching to compare two equally-sized cohorts of patients with similar characteristics according to statin therapy. Matching was performed on log-transformed propensity score in a 1:1 fashion with a caliper of 0.1, in order to account for the different baseline characteristics between statin and no-statin group.

**Results.** Mean age: 58.1±13.8 years; male sex: 55%. Patients on statin therapy: 402 (22%). These patients showed lower 24 h BP (-2.8/-7.1 mmHg), daytime (-3.3/-7.6 mmHg) and night-time BP (-2.5/-6.0 mmHg, all p<0.001). They also showed better ambulatory BP control, even after adjustment for confounding factors. The analyses on the groups derived from the "propensity score matching" (369 patients in each group) confirmed these results (OR 1.8 for 24 h BP control; OR=1.6 for daytime BP control; OR=1.7 for night-time BP control, all p<0.001).

**Conclusions.** Statin therapy is associated with better ambulatory BP control in essential hypertensives. This result is not affected by the intensity of anti-hypertensive treatment or by the several cofactors analyzed.

## 23-MONTHS FOLLOW-UP TO ASSESS THE EFFICACY AND TOLERABILITY OF EVOLOLCUMAB IN A YOUNG PATIENT WITH CHRONIC AND PROGRESSIVE ISCHEMIC ARTERIOPATHY

I. Rossi, D. D'Ardes, F. Vezzani, F. Cipollone, M. Bucci  
*Centro Ipertensione e Dislipidemie, Università di Chieti*  
E-mail: mbucci@unich.it

**Background.** PCSK9 inhibitors represent a revolution for patients who do not reach their LDL-C target and need invasive and expensive treatments such as LDL-apheresis.

**Aim.** We evaluated efficacy and tolerability of Evolocumab 140mg (E140) Q2W during a follow-up period of 23 months in a 57-yr patient with a history of early coronary heart disease (recurrent episodes of unstable angina and myocardial infarction treated with PTCA+ stent) and non-target LDL-C values despite standard lipid-lowering therapy (LLT) at the maximum tolerated dose (LDL-C consistently >100-120 mg/dL, Lp(a) >100 mg/dL).

**Case report.** E140 Q2W was added on top of the patient's LLT (rosuvastatin 20 and ezetimibe 10mg OD) in October 2017, when his LDL-C was 144 mg/dL and his Lp(a) 104 mg/dL. Lipid profile and liver function were constantly monitored. Target LDL-C was rapidly achieved (lowest LDL-C =1mg/dL in March 2019), with an average reduction of 92,9%. The average Lp(a) reduction was 65,55% (lowest value: 54 mg/dL). Symptoms related to coronary atherosclerosis were stabilized for the first time in the last 7 years, without need for additional revascularization procedures. The exercise stress test showed a good effort tolerance in June 2018. Adherence and tolerability were excellent. LDL-C remained between 1-23 mg/dl during the observation period without adverse events; this allowed to suspend ezetimibe and reduce the statin dosage. A genetic analysis was performed to confirm the existence of a familial hypercholesterolemia and polymorphisms of Lp(a) (DLCN=6): no mutations were detected; however the LDL-C score according to FerrerInCode (Lipigen Project) was 1.23, suggesting a high probability of a polygenic cause1.

**Conclusions.** In this difficult case E140 Q2W has led to an LDL and Lp(a) reduction much greater than expected according to literature2,3, symptoms' stabilization with a considerable improvement in QoL and also a relevant money saving for the National Health Service.

## References

- Pirillo A, et al. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atheroscler.* 2017; (Suppl. 29), 17-24.
- Ference BA, Cannon CP, Landmesser U, Lu TF. Reduction of low density lipoprotein-cholesterol and cardiovascular events with proprotein inhibitors and statins : an analysis of FOURIER, SPIRE, and the Cholesterol Treatment Trialists Collaboration. *Eur. Hear. J.* 2018; 39: 2540-2545.
- Qamar A, et al. Interindividual Variation in Low-Density Lipoprotein Cholesterol Level Reduction With Evolocumab An Analysis of FOURIER Trial Data. *JAMA Cardiol.* 2018; 2115: E1-E5.

## CHOLESTEROL LDL LEVELS AND ESTIMATION OF THE PREVALENCE OF FAMILY HYPERCHOLESTEROLEMIA IN A POPULATION OF THE AREA OF BOLOGNA

A. Rossolini<sup>1</sup>, A.F.G. Cicero<sup>1</sup>, F. Ventura<sup>1</sup>, E. Ramazzotti<sup>1</sup>, R. Mancini<sup>1</sup>, F. Tombariv<sup>3</sup>, D. Patron<sup>2</sup>, S. Palmisano<sup>1</sup>, C. Borghi<sup>1</sup>, S. D'Addato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università di Bologna; <sup>2</sup>Laboratorio Unico Metropolitano di Bologna; <sup>3</sup>Farmacia Clinica AOSP di S. Orsola, Bologna  
E-mail: arianna.rossolini@studio.unibo.it

**Objectives.** Although Familial hypercholesterolemia is the most common genetic cause of early coronary artery disease, its recognition only occurs in a few cases (<1% in Italy) and only 20% of the affected patients reach the recommended LDL cholesterol levels. The purpose of this work is to estimate the prevalence of probable and possible Familial Hypercholesterolemia according to the DLCN among people who have checked their lipid profile at Laboratorio Unico Metropolitano di Bologna between 01/06/2017 and 05/31/2018. Using DLCNs, we only have considered the levels of c-LDL as the analysis of these parameter alone is enough to define the diagnosis of possible or probable FH.

**Materials and Methods.** This is a retrospective observational study in which anonymous data from the biochemical exams included in the normal care procedure were used. Age, sex and total cholesterol, c-HDL, triglyceride and d-LDL c-levels were extrapolated for each patient. Patients with triglycerides >=300 mg/dL and / or aged <20 years were excluded. The calculated LDL cholesterol was derived through the Friedwald formula. Since DLCNs are based on pretreatment c-LDL values and the pharmacological history is missing in this study, each c-LDL value is increased by 3.45%. This correction consists in the dilution of the effect of cholesterol-lowering drugs on the entire population: the value was obtained by multiplying the defined daily dose of cholesterol-lowering drugs in the province of Bologna by the average capacity of this therapy to reduce the c-LDL; on the basis of lipid-lowering drugs mostly dispensed by the Sant'Orsola hospital pharmacy, the average lipid-lowering power is -40%. Calculated c-LDL values were analyzed by the DLCNs and the population was divided according to the probability of diagnosis of familial hypercholesterolemia (possible with 3 and 5 points: c-LDL =191-250 mg/dL and 251-325 mg/dL, probable with 8 points: c-LDL >325 mg/dL).

**Results.** The sample of patients considered is made by 109188 subjects with a maximum age of 109 years and a minimum of 20 years (mean: 62.6 years ± ds 16.4) and a maximum total cholesterol level of 621 mg/dL and minimum of 24 mg/dL (average: 199.8 mg/dL ± ds 44.2). Correcting the effect of the possible therapy shows that 77.14% of subjects have c-LDL <155 mg/dL, 17.63% have c-LDL =155-190 mg/dL, 4.94% has c-LDL =191-250 mg/dL, 0.27% has c-LDL =51-325 mg/dL and 0.03% has c-LDL >325 mg/dL. Applying the DLCN scores to these values we found out that, with only the analysis of calculated c-LDL levels, 5.23% of subjects meets the possible diagnostic requirements (of which 4.94% with 3 points and 0.27% with 5 points) and 0.03% those of probable diagnosis (with 8 points). Analyzing these results it is evident that 0.29% (1 on 340) of our sample has a high risk of being affected by Familial Hypercholesterolemia.

**Conclusions.** Our results confirm the prevalence of FH estimation emerged from other studies and can be reasonably extended to the entire Bologna's population aged >=20 years and with triglycerides <300 mg/dL.

## COMPARATIVE EFFECTS OF ADD-ON THERAPY WITH PCSK9 INHIBITORS OR EZETIMIBE ON LIPID PROFILE AND ON ARTERIAL STIFFNESS IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA PATIENTS WITH INADEQUATELY CONTROLLED LDL CHOLESTEROL DESPITE HIGH INTENSITY STATINS: TWO-CENTER EXPERIENCE

F. Savarino<sup>1</sup>, G. Mandrappino<sup>1</sup>, R. Scicali<sup>2</sup>, J. Rodriguez-Carrio<sup>3</sup>, F. Mamone<sup>1</sup>, M. Scuruchi<sup>1</sup>, M. Cinquegrani<sup>1</sup>, E. Imbalzano<sup>1</sup>, A. Di Pino<sup>2</sup>, S. Piro<sup>2</sup>, A.M. Rabuazzo<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine-University of Messina; <sup>2</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine-University of Catania; <sup>3</sup>Area of Immunology, Department of Functional Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain; Instituto de Investigacion Sanitaria del Principado de Asturias (Ispa), Oviedo, Spain  
E-mail: francescasavarino@hotmail.it

**Background.** FH is characterized by elevated LDL-C levels and high CV risk. Prognosis correlates with lifelong LDL-C levels, and therapy aims to achieve and maintain LDL-C target over years. Despite high intensity statins, only few FH patients achieve the recommended low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) targets. Vascular dysfunction occurs years before atherosclerosis is detectable by instrumental tests. PWV is considered an early, reliable marker and independent prognostic predictor for CV mortality.

**Aim.** We aimed to evaluate the efficacy of six-month add-on therapy with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors (PCSK9-i) or ezetimibe on lipid profile and on vascular arterial function, in a setting of LDL-C off-target HeFH patients (primary/secondary prevention).

**Methods.** We enrolled 98 genetically confirmed FH patients with an LDL-C off-target despite high-intensity statins; of these, 45 patients added ezetimibe (EZE group) and 53 added PCSK9-i (PCSK9-i group). At baseline and 6 months after add-on treatment we tested for blood chemistry, arterial stiffness (SphygmoCor) and anthropometric parameters.

**Results.** After 6 months of add-on therapy, the majority of patients achieving LDL-C targets were in the PCSK9-i group (77.3% PCSK9-i group vs 37.8% EZE group, p<0.001). The PCSK9-i group also achieved a significant PWV reduction compared with the EZE group [-51% vs -22.8%, p<0.001 and -15% vs -8.5%, p<0.01, respectively]. In a linear regression analysis we showed a beta index of 0.334 for the relationship between ΔPWV and ΔLDL (p<0.05); particularly, this relationship was stronger in FH patients without cardiovascular events ( $\beta=0.422$ , p<0.01).

**Conclusions.** The addition of PCSK9-i or ezetimibe to high intensity statin therapy significantly improves lipid and PWV profiles in FH patients; moreover, ΔPWV is associated with ΔLDL. Our study confirms the additional beneficial role of these novel therapies in FH subjects.

## A LARGE ITALIAN COHORT ON PCSK9-INHIBITORS: A SINGLE CENTER EXPERIENCE

F. Sbrana, B. Dal Pino, F. Bigazzi, A. Ripoli, E. Volpi, M.P. Fogliaro, G. Lo Surdo, M. Pianelli, R. Luciani, S. Biagini, T. Sampietro

*Lipoapheresis Unit, Reference Center for Diagnosis and Treatment of Inherited Dyslipidemias, Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa*

E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

**Background.** PCSK9-inhibitors (PCSK9i) represents a breakthrough in the treatment of hypercholesterolemia as efficiently and safely reduce LDL-C and cardiovascular events. Aim of this study was to perform a single-center retrospective analysis on the effects of PCSK9i, introduced in Italy on 2017.

**Methods.** During an observation period 122 patients affected by primary hypercholesterolemia (mean age 60±11 years, male 75%) add PCSK9i (evolocumab 83/122; alirocumab 39/122) to the maximally tolerated lipid-lowering therapy. Patient's clinical characteristics, lipid value modification, acute cardiovascular events (ACVE) and adverse events (AEs) reported during the follow-up were analysed.

**Results.** 49/122 patients had previously participated in the PROFICIO program of evolocumab and the other 73/122 patients started PCSK9i therapy in accordance with Italian prescription rules. Lp(a)-hyperlipoproteinemia was present in 40/122; 86/122 had ischemic heart disease (IHD) and 34/122 subject were chronically on Lipoprotein Apheresis (LA). At the end of follow-up (13±6 months), a significant decrease in total cholesterol (-38%, p<0.001), triglycerides (-15%, p<0.001), LDL cholesterol (-52%, p<0.001) and Lp(a) levels (-8%, p=0.006) was observed. PCSK9i therapy allow the discontinuation of LA in 16/36 patients but only 27/86 (31%) of patients with IHD reached an LDL cholesterol below 55 mg/dl. A sub analysis on HeHF patients with IHD, do not reveal significant difference on lipid modification in subjects treated, every 14-days, with alirocumab 150 mg or evolocumab 140 mg. During the follow-up 10/122 patients had an ACVE and 33/122 had an AEs which led, in 4 cases, to discontinuation of PCSK9i therapy. Furthermore, other 4 subjects discontinued PCSK9i therapy: 2 patients due renal failure worsening and 2 patients were lost in the follow-up.

**Conclusions.** Our data are in agreement with the large evidence on tolerability, effectiveness and cardiovascular event reduction.

## ASSOCIATION BETWEEN ACHILLES TENDON XANTHOMAS AND CARDIOVASCULAR DISEASE IN HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: A PILOT STUDY

P. Scarinzi<sup>1</sup>, M. Biolo<sup>1</sup>, P. Bigolin<sup>2</sup>, C. Panzavolta<sup>1</sup>, M.V. Rabuini<sup>1</sup>, R. Marin<sup>1</sup>, D. Vianello<sup>1</sup>, S. Bertocco<sup>1</sup>, F. Fabris<sup>1</sup>, E. Manzato<sup>1</sup>, S. Zambon<sup>1</sup>, L. Previanto<sup>1</sup>, A. Zambon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova;

<sup>2</sup>Ospedale di Castelfranco Veneto

E-mail: scarinzi.paolo@gmail.com

**Background.** Patients with familial hypercholesterolemia (FH) have an increased lifetime risk of cardiovascular disease (CVD) due to high levels of plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). Achilles tendon xanthomas (ATX) are acknowledged clinical diagnostic criteria of FH. Despite recent studies analyze the association between ATX and atherosclerotic cardiovascular disease, their clinical predictive value remains unknown.

**Aim.** To investigate ATX clinical significance and their possible association with CVD.

**Methods.** From January 2016 to July 2018, 95 subjects with FH were included: 83 with FH genetically confirmed, 12 with clinical diagnosis based on Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) score >8. For each patient we collected: clinical examination, blood lipid profile, familial and personal medical history considering CVD risk factors and adverse cardiovascular events including acute coronary syndrome, angina, coronary intervention, stroke and peripheral arterial disease. The presence of ATX were detected also with bilateral ultrasonography (US), considering as US positive sign hypoechogetic formations or a tendon's maximum diameter thickness >6.0 mm (Sensitivity 72%, Specificity 70%).

**Results.** ATX was observed in 71 patients (M=26, F=45). These patients showed higher mean age (48.1±14.8 vs 40.3±16.7 years, p<0.05) and LDL-C concentration (320.9±107.5 vs 235.9±50.7 mg/dl, p<0.05) compared to the group without ATX. These characteristics could explain the greater DLCN score (9.1±4.6 vs 5.0±2.7, p<0.05) and the longer treatment time (88.8±92.5 vs 35.8±57.5 months, p<0.05) observed in these patients. By the way traditional CV risk factors in the two groups did not show any significant difference. Moreover, in multivariate logistic regression analysis the AT thickness was positively associated with CVD (OR 1.39, 95% C.I. 1.10-1.75, p<0.05).

**Conclusion.** In FH subjects we observed the association between Achilles tendon thickness and CVD, that seems to be independent of other known risk factors. These results emphasize the importance to explore the presence of tendon xanthomas and their implication in the setting of atherosclerotic cardiovascular disease.

## ANALYSIS OF HDL-MICRORNA PROFILE IN HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA SUBJECTS WITH LDL RECEPTOR NULL OR DEFECTIVE MUTATION

R. Scicali<sup>1</sup>, A. Di Pino<sup>1</sup>, C. Pavanello<sup>2</sup>, A. Ossoli<sup>2</sup>, A. Strazzella<sup>2</sup>, A. Alberti<sup>2</sup>, S. Di Mauro<sup>1</sup>, A. Scamporrino<sup>1</sup>, F. Urbano<sup>1</sup>,

A. Filippello<sup>1</sup>, S. Piro<sup>1</sup>, A. M. Rabuazzo<sup>1</sup>, L. Calabresi<sup>2</sup>, F. Purrello<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania; <sup>2</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

E-mail: robertoscicali@gmail.com

**Background and Aims.** In the last few years increasing attention has been given to the connection between genotype/phenotype and cardiovascular events in subjects with familial hypercholesterolemia (FH). MicroRNAs (miRs) bound to high-density lipoprotein (HDL) may contribute to better discriminate the cardiovascular risk of FH subjects. Our aim was to evaluate the HDL-miR profile in heterozygous FH (HeFH) patients with an LDLR null or defective mutation and its association with pulse wave velocity (PWV).

**Methods.** We evaluated lipid panel, HDL-miR profile and PWV in 32 LDLRnull mutation (LDLR-null group) and 35 LDLR defective variant (LDLRdefective group) HeFH patients. All subjects were on statin treatment at the time of enrollment.

**Results.** The LDLR-null group exhibited a significant increase of HDL-miR486 and 92a than the LDLR-defective group ( $p<0.001$  for both). When we further stratified the study population into three groups according to both the LDLR genotype and history of ASCVD (LDLR-null, LDLRdefective and LDLR-ASCVD group), both the LDLR-ASCVD and the LDLR-null groups had a higher expression of HDL-miR 486 and 92a than the defective group (for LDLR-ASCVD versus LDLR-defective group  $p<0.05$  for both; for LDLR-null versus LDLR-defective group  $p<0.05$  for both). Finally, HDL-miR 486 and 92a were independently associated with PWV ( $p<0.01$  for both).

**Conclusion.** The LDLR-null group exhibited an increase of HDL-miR 486 and 92a with respect to the LDLR-defective group. Further studies are needed to evaluate these HDL-miRs as predictive biomarkers of cardiovascular events in FH patients.

## MUTATION IN CANDIDATE GENES ACCOUNT FOR A SMALL MINORITY OF HYPOBETALIPOPROTEINEMIAS AND NGS ANALYSIS SUPPORT POLYGENICITY IN MUTATION-NEGATIVE PATIENTS

C. Scrimali, R. Spina, V. Ingrassia, F. Brucato, V. Valenti, A.B. Cefalù, G. Misiano, G.I. Altieri, F. Fayer, D. Noto,

A. Giannanco, C.M. Barbagallo, A. Ganci, M.R. Averna  
*Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties (PROMISE) University of Palermo*

E-mail: chiara.scrimali@libero.it

**Introduction.** Hypobetalipoproteinemias (HBL) represent an heterogeneous group of disorders characterized by plasma levels of total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and apolipoprotein B (apoB) below the 5th percentile of the distribution in the population. Two major monogenic forms of HBL are well characterized:

- 1) FHBL1 (familial hypobetalipoproteinemia 1, OMIM#615558), a co-dominant disorder due to mutations in APOB gene or, less frequently, in PCSK9 gene.
- 2) FHBL2 (familial hypobetalipoproteinemia 2, OMIM#605019) due to mutations in ANGPTL3 gene.

The approach to molecular diagnosis of HBL has changed in the last years with Next-generation sequencing approach (NGS) replacing the traditional Sanger Sequencing method.

**Materials and Methods.** In this study, we described a novel diagnostic workflow for molecular characterization of HBL disorder by NGS approach. We designed a custom panel in order to analyze known genes involved in HBL by Ion Torrent PGM. The analysis was conducted on 23 patients.

**Results.** The HBL-custom panel allowed to identify 4 novel pathogenic APOB gene mutations in four probands. In 19 patients, targeted next generation DNA sequencing revealed several rare variants (MAF≤0.005) predicted by informatics tools to be possible/probably damaging allowed to filter different significant variants in APOB, PCSK9 and ANGPTL3 genes and in other genes known to regulate LDL-C levels through different pathways (ie, ANGPTL8, LDLR, MYLIP, PEMT, SORT1). In several patients the HBL phenotype could be due to the oligogenic interaction involving multiple rare variants in different genes, each of which may contribute to determine the clinical and biochemical phenotype.

## SERUM ENDOCAN LEVELS IN CARDIOVASCULAR RISK CLINICAL CONDITIONS

M. Scuruchi<sup>1</sup>, A. D'Ascola<sup>1</sup>, G.M. Campo<sup>1</sup>, S. Campo<sup>2</sup>,  
A. Avenoso<sup>2</sup>, J. Rodríguez Carrio<sup>3</sup>, A. Saitta<sup>4</sup>, G. Mandraffino<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine,  
Internal Medicine Unit, University of Messina; <sup>2</sup>University  
of Messina, Department of Biomedical and Dental Sciences  
and Morphofunctional Images, University of Messina; <sup>3</sup>Area  
of Immunology, Department of Functional Biology, Faculty of  
Medicine, University of Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria  
del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain; <sup>4</sup>Department  
of Clinical and Experimental Medicine, Internal Medicine Unit,  
University of Messina

E-mail: mscuruchi@unime.it

**Background.** Endocan is a small soluble proteoglycan produced and secreted by human endothelial cells, detectable in peripheral circulation, considered an indicator of angiogenesis and endothelial cell activation. Studies have shown that Endocan levels increase in cancer and sepsis; its increase during chronic inflammatory conditions is under evaluation so far, because its expression may be influenced by VEGF- and TNF-, cytokines involved in pathogenic pathways in chronic inflammatory disease.

**Aim.** To evaluate plasma Endocan levels in patients with different degree of vascular and/or systemic inflammation; here we present the results of an extensive evaluation of serum Endocan in different clinical conditions characterized by chronic inflammatory status and increased endothelial reaction.

**Methods.** We measured Endocan in healthy controls (10), statin-treated hypercholesterolemic (HC) patients (28), untreated scleroderma (SSc) patients (30), patients with refractory (as considered after six months of conventional therapy with CCS plus mesalazine) IBD (20), by a commercially available ELISA kit. CRP levels were also measured by routine methods.

**Results.** Endocan levels in controls were  $337.73 \pm 64.01$  pg/ml; in statin treated HC we found a mean value of  $183.1 \pm 59.41$ ; in SSc patients  $497.15 \pm 281.43$ ; in refractory IBD patients  $348.9 \pm 196.63$ . HC patients presented with lower Endocan levels with respect to controls ( $p < 0.0001$ ). Endocan levels in SSc and IBD patients did not differ from controls. Endocan correlates to CRP levels in HC patients ( $r = 0.515$ ), while no significant relationship we found in controls, in IBD and in SSc patients.

**Conclusions.** Endocan is involved in a variety of biological processes including cell proliferation, migration, and neovascularization. Its levels are reported to be correlated with inflammatory cytokines, and to be closely related to the development and progression of CVD. However, while in statin-treated HC patients we found a significant correlation between CRP and Endocan plasma levels, we cannot confirm this relationship in controls, IBD and SSc patients.

## EFFECT OF ENDURANCE TRAINING AND HIGH INTENSITY INTERVAL TRAINING ON BODY COMPOSITION AND CARDIO-METABOLIC RISK FACTORS IN A POPULATION OF OBESE ADULTS: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

C.M. Semprini<sup>1</sup>, A. D'Amuri<sup>1</sup>, J. M. Sanz<sup>1</sup>, F. Vaccari<sup>2</sup>, S. Lazzera<sup>2</sup>,  
E. Capatti<sup>1</sup>, F. Di Vece<sup>1</sup>, E. Dalla Nora<sup>1</sup>, G. Zuliani<sup>3</sup>, A. Passaro<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Sciences, Section of Internal and Cardio  
Respiratory Medicine, University of Ferrara; <sup>2</sup>Department of  
Medicine, University of Udine; <sup>3</sup>Department of Morphology,  
Surgery and Experimental Medicine, Section of Internal and  
Cardio Respiratory Medicine, University of Ferrara; <sup>4</sup>Department  
of Medical Sciences, Section of Internal and Cardio Respiratory  
Medicine, University of Ferrara  
E-mail: smpcrm@unife.it

**Aim.** The prevalence of obesity is constantly increasing and the mainstay of therapy remains the association of diet and exercise. The guidelines recommend 250-400 min/week of continuous aerobic exercise of moderate intensity (Endurance Training, ET) but the adherence remains generally low. High Intensity Interval Training (HIIT) allows shorter training sessions than ET, with the same energy expenditure, but its role in the treatment of obesity remains unclear. The aim of this study is to analyze the effects of two different exercise protocols (ET vs HIIT) on anthropometric parameters and cardiovascular risk factors, in a population of obese subjects.

**Patients and Methods.** 32 obese subjects (aged 18-45 years), with no history of cardiovascular and respiratory disease nor diabetes, were enrolled. Subjects were randomized into two iso-energetic exercise arms (3 times/week for 16 weeks): ET (60% training VO<sub>2</sub>MAX) and HIIT (3-7 series of 3 min repeats at 100% VO<sub>2</sub>MAX interspersed with 1,5 min at 50% of VO<sub>2</sub>MAX). Before and after intervention we evaluated: arterial pressure, anthropometry (weight, BMI, waist and hip circumference), body composition, lipids and glucose metabolism.

**Results.** In both arms we observed a statistically significant reduction of diastolic blood pressure, weight, waist and hip circumference. Impedance analysis showed a reduction in FM and an increase in FFM. There was a reduction in total cholesterol, C-LDL and ApoB100. There were no changes in HDL-C, triglycerides, glycemia, insulinemia or HOMA-IR index. In men, waist decreased more with HIIT than ET. The average duration HIIT was significantly shorter than ET.

**Conclusions.** HIIT is at least as effective as ET in the treatment of obesity and associated cardiovascular risk factors, although it requires smaller exercise volumes. This could result in higher compliance. Moreover, HIIT could be more effective in reducing visceral adipose tissue, at least in men.

## ENDOCAN LEVELS ARE ASSOCIATED TO CD34+ CIRCULATING CELL NUMBER IN SYSTEMIC SCLEROSIS

D. Sinicropi<sup>1</sup>, A. Lo Gullo<sup>1</sup>, M. Cinquegrani<sup>1</sup>, F. Savarino<sup>1</sup>, M. Scuruchi<sup>1</sup>, S. Loddo<sup>1</sup>, J. Rodriguez-Carrio<sup>2</sup>, A. Saitta<sup>3</sup>, G. Squadrato<sup>3</sup>, G. Mandrafino<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine, Internal Medicine Unit, University of Messina; <sup>2</sup>Area of Immunology, Department of Functional Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (Ispa), Oviedo, Spain; <sup>3</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine, Internal Medicine Unit, University of Messina

E-mail: sinicropidavide@gmail.com

**Background.** Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune chronic disease characterized by vascular alterations of small arteries and microvessels. Circulating CD34+ cell number is acknowledged to be associated to cardiovascular health status in several chronic conditions, including chronic immune-inflammatory disease. CD34+ cell number was found inconsistently reduced in SSc. Endocan is a proteoglycan expressed by endothelial cells likely interacting with white blood cells, recently suggested as a marker of vascular stress.

**Methods.** We selected 27 (26 female, 61±13.5 years) patients out of 36 SSc patients (35 female) we have previously enrolled; CD34+ cell number (2.6±0.73), CRP (0.59±0.97), ESR (22.09±17.57), serum uric acid (SUA, 3.90±1.05), creatinine (0.76±0.37), Vitamin D3 (27.26±10.98), Rodnan skin score (28.89±10.24) and two frozen plasma samples should be available for all of these patients. Then, we randomly selected 15 patients to determine plasma Endocan levels.

**Results.** We found no correlation between Endocan and Rodnan skin score, ESR, fibrinogen or SUA; we found a trend of correlation between Endocan and Vitamin D levels ( $r = -0.315$ ), red blood cells distribution width ( $r=0.310$ ), CRP ( $r=0.310$ ), but statistical significance was not reached due to the small sample size. We found an association between endocan levels and PAPs ( $\rho=0.442$ ,  $p=0.045$ ). The only significant (inverse) correlation we found was between Endocan and CD34+ cell number ( $\rho=-0.605$ ,  $p=0.017$ ).

**Conclusion.** In our study population, we found a significant correlation between CD34+ cell number and Endocan plasma levels; Endocan and CD34+ progenitor cells can be suggested as potential marker of disease status.

## PCSK9-D374Y MEDIATED LDL-R DEGRADATION CAN BE FUNCTIONALLY INHIBITED BY EGF-A AND TRUNCATED EGF-A PEPTIDES. AN IN VITRO STUDY

R. Spina, C. Scrimali, V. Ingrassia, F. Brucato, G.I. Altieri, D. Noto, V. Valenti, G. Misiano, A. Giannamico, F. Fayer, C.M. Barbagallo, A. Ganci, A.B. Cefalù, M.R. Averna

Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties (PROMISE) University of Palermo

E-mail: rossella.spina@libero.it

**Introduction.** PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) is a modulator of the cellular LDL receptor (LDL-R) and plasma cholesterol levels. Gain-of-function mutations of PCSK9 cause hypercholesterolemia and early-onset coronary heart disease therefore inhibition of PCSK9 is being used as an approach to reduce plasma LDL cholesterol levels. Although the molecular mechanism of action of PCSK9 is not yet completely clear, various approaches for inhibiting the PCSK9/LDL-R binding interaction have therefore investigated and developed. Different therapeutic approach as RNA interference, antisense DNA and monoclonal antibodies are not the most desirable for chronic asymptomatic conditions such as hyperlipidemia. Peptides are now emerging as therapeutic candidates to bridge the gap between small-molecule drugs (<500 Da in mass) and large biologics, including antibodies (>5,000 Da) and they may offer potentially more convenient routes of administration and lower costs.

**Materials and Methods.** In this study, we evaluated whether a synthetic EGF-A domain of LDL-R could inhibit LDL-R degradation mediated by the D374Y-PCSK9 mutant and restore LDL uptake using HuH7 liver cells as a model system. A similar set of experiments were performed by adding a shorter 25-amino acid truncated EGF-A analog (P1). HuH7 cells were treated with serum free media or media containing EGF-A peptide/P1 at three different concentrations. Western blot analysis and internalization assay were performed in order to evaluate the expression and the functionality of LDL-R. As control, we also tested the effect of treatment with alirocumab in cells transfected with PCSK9-D374Y.

**Results.** Transient transfection of cells with PCSK9-D374Y expression vector very effectively enhanced degradation of mature LDLR in Huh7. The treatment with both EGF-A and EGF-A truncated peptide (P1) inhibited this effect and showed increased LDLR protein in Huh7 cells transfected with PCSK9-D374Y in a clear concentration dependent manner. Huh7 transfected cells treated with increasing concentration of EGF-A analogs also showed an increase internalization of labeled Dil-LDL. In our in vitro system the treatment with EGF-A analogs appeared to be more effective in the inhibition of the degradation of LDL-R compared to the treatment with monoclonal antibody against PCSK9. The result of our study shows that EGF-A analogs are able to effectively hamper the enhanced degradation of LDLR in liver cells expressing PCSK9-D374Y. The binding between PCSK9 and LDL-R can be modulated by peptides administration and that our therapeutic approach is suitable for patients affected by familial hypercholesterolemia due to GOF mutations in PCSK9 gene.

## ROLE OF TALMUD POLYGENIC SCORE IN A TUSCANY COHORT OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA WITH AND WITHOUT LDLR GENE MUTATIONS

E. Sticchi<sup>1</sup>, A. Kura<sup>2</sup>, A. Volta<sup>2</sup>, R. De Cario<sup>2</sup>, A. Murri<sup>2</sup>, A. Magi<sup>2</sup>, S. Suraci<sup>2</sup>, A.M. Gorl<sup>1</sup>, R. Marcucci<sup>1</sup>, B. Giusti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence; <sup>2</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence; <sup>3</sup>Department of Information Engineering, University of Florence

E-mail: elenasticchi@hotmail.com

**Background.** Familial Hypercholesterolemia (FH) represents an autosomal disorder due to pathogenic variants in LDLR or APOB or PCSK9 (dominant form), and in LDLRAP1 (recessive form). Previous data showed that in about 60% of patients who are mutation-negative the clinical phenotype can be associated with an accumulation of common small-effect LDL-C-raising alleles using a 12-Single nucleotide polymorphisms (SNPs) score. Aim of this study was to evaluate Talmud (2013) genetic score in patients with FH with and without variants in LDLR gene.

**Methods.** We analysed 45 patients with clinically possible/probable or definite FH using the most common diagnostic algorithm, Dutch Lipid Clinic Network Score. SNPs included in Talmud score were detected through high-throughput (HTS) or Sanger sequencing. HTS was performed using Illumina MiSeq Reagent Kit. Sequencing results were analyzed using a pipeline optimized by the Florentine bioinformatics group. The possible pathogenicity of variants was evaluated using five different *in silico* tools. For statistical analysis we used SPSS v.25 software.

**Results.** Among 45 patients analyzed, 20 had a pathogenetic variant in LDLR and 25 did not carry mutations in this gene. Significantly higher Talmud score mean value in patients without LDLR mutation with respect to those with LDLR variant was observed [mean±SD: 1.015±0.140 vs 0.894±0.196, p=0.02]. Mean Talmud score value found in LDLR mutation negative group relates to a risk ratio (95% CI) of LDL-C>4.9 mmol/L 2.87 (2.04-4.05) (7th LDL-C gene score decile). Conversely, in patients carrying LDLR mutations mean score value relates to a risk ratio (95% CI) 2.21 (1.55-3.17) (5th LDL-C gene score decile).

**Conclusion.** The results suggest a possible contribution of common variants in modulating the lipid profile in FH patients. Further expansion of present data will allow to confirm the hypothesis that FH can also be caused by an accumulation of common small-effect LDL-C-raising alleles.

## ACCUMULATION OF PRE-β HDL IN GENETIC LECITHIN: CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE DEFICIENCY: ROLE IN RENAL DISEASE

A. Strazzella, A. Ossoli, M. Turri, L. Calabresi

*Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli studi di Milano*  
E-mail: arianna.strazzella@unimi.it

Genetic LCAT deficiency is a rare disorder due to “loss of function” mutations in the LCAT gene, which codifies for the only human enzyme able to esterify cholesterol in plasma. Carriers’ lipid and lipoprotein profile shows deep alterations, in particular a dramatic reduction in HDL-C, the accumulation of small, discoidal and immature preβ-HDL and the appearance of the abnormal lipoprotein, called LpX. The major cause of morbidity and mortality in LCAT deficient carriers is the kidney disease, and the renal damage has been described both at glomerular and tubular level. While the role of LpX in the onset of glomerular damage has been already demonstrated, the impact of the accumulation of preβ-HDL in the pathogenesis of the renal disease is still unknown; thus, the aim of the work is to evaluate the potential role of pre-β HDL in the onset of renal damage and to investigate the involved molecular mechanisms.

**Methods.** For *in vivo* study, Lcat-/- and Wild Type mice were injected with 0.05 mg of synthetic preβ-HDL every 48 hours for four weeks. The lipid profile and Blood Urea Nitrogen (BUN) were measured and the HDL subclasses distribution was evaluated by bidimensional electrophoresis. For the *in vitro* study in tubular kidney cells, HDL were isolated from LCAT deficient carriers and controls’ plasma by ultracentrifugation or synthesized (rHDL) starting from apoA-I and phospholipids. Oxidative stress and apoptosis were evaluated.

**Results.** After four weeks of treatment, Lcat-/- mice lipid profile showed deep alterations compared to WT mice, with an increase of total cholesterol (+14,64%, p=0,008 vs basal), triglycerides (+176%, p=0,008 vs basal) and phospholipids (+111,94%, p=0,002 vs basal). Moreover, the plasma renal damage marker BUN was enhanced (+19,07%, p=0,006 vs basal), and the urine albumin to creatinine ratio slightly increases. To further investigate the molecular mechanisms of the renal damage, tubular cells were incubated with homozygous carriers’ HDL and ROS production was evaluated; the result showed a significant increase of the oxidative stress (+28,57%, p=0,0489 vs HDL control) after the incubation with homozygous’ lipoproteins. Similar results were obtained with rHDL (+30,10%, p=0,028 vs control), resembling the endogenous preβ-HDL for shape and size, confirming the role of these particles in the increased ROS production. The evaluation of apoptosis, which is reported to be related to oxidative stress, highlighted an enhanced expression of the pro-apoptotic genes BAX and BAD (+169,44%, p=0,034 vs control; +83,6%, p=0,033 vs control, respectively) after the incubation with rHDL, suggesting an increase of this process; the result was confirmed also by the enhanced caspase-3 and -7 activity (+23,2%, p=0,034 vs control).

**Conclusion.** In conclusion, the accumulation of preβ-HDL is involved in the onset of tubular damage in LCAT deficient carriers and some possible nephrotoxic mechanisms could be represented by the increase in oxidative stress and apoptotic process.

## EFFECT OF WESTERN TYPE DIET ON PROTEOGLYCANS SIGNATURE IN THE AORTA OF LDL-R KO MICE

M. Svecla<sup>1</sup>, G. Garrone<sup>2</sup>, F. Fare<sup>2</sup>, P. Ubaldi<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,4</sup>, G. Beretta<sup>3</sup>, G.D. Norata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>Unitech Omics platform, University of Milan;

<sup>3</sup>Department of Environmental Science and Policy ESP, University of Milan; <sup>4</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milan  
E-mail: Monika.Svecla@unimi.it

**Introduction.** Proteoglycans (PG) are essential components of the extracellular matrix. They are composed from a protein core and glycosaminoglycans (GAGs, polysaccharides with repeatable disaccharide units). GAGs play an important role in pathogenesis of atherosclerosis as contribute to lipoprotein retention in the subendothelial matrix of the vascular wall. Aim of this work is to assess the protein expression of proteoglycans and the signature of GAGs N-glycosylation in the aorta of LDL-R KO mice fed with a western type diet (WTD).

**Materials and Methods.** 8 weeks old LDL-R KO mice were fed chow or western type diet (WTD, 0,15% of cholesterol) to induce atherosclerosis, then plasma and aorta were collected. Aorta was processed for shotgun proteomics analysis in Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer to profile the proteome and to identify N-glycoproteins differentially expressed. Glycopeptidase F allowed to compare N-glycosylated profile in the different samples. OpenMS, Proteome discoverer and MaxQuant software were used to perform protein interference and quantification while Network Analyst, KEGG pathway database and David 6.7 were used for gene ontology and pathway enrichment analysis.

**Results.** Plasma cholesterol and triglycerides levels chow were (Chol. 211,64±24,85 mg/dl, TG 126,76±0,92 mg/dl) and in WTD (Chol. 518,9±53,41 mg/dl, TG 266,16±56,86 mg/dl). Proteomics from aorta identified 1.166 proteins, n=592 proteins reached the minimum parameters established for quantification. Among them, 94 proteins were significantly modulated in the aorta of LDL-R fed a WTD (p-value <0,05, Log2FC >1). Among different GAGs identified there was an altered expression of dermatan sulfates (Decorin, downregulated, Biglycan, upregulated), chondroitin sulfate (Perlecan, downregulated) and keratan sulfate (Lumican, downregulated). Deamination in asparagine has shown more than 10 N-glycosylation sites for each of proteoglycans.

**Conclusions.** Our data suggest that hypercholesterolemia affects not only proteoglycans expression within the arterial but also impact their N-glycosylation signature. How a different glycans signature in GAGs correlates with atherosclerotic plaque development is under investigation.

## LOSS-OF-FUNCTION ABCG5 MUTATION IN A HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENT TREATED WITH COMBINATION THERAPY

C. Trenti, E.A. Negri, S. Canovi, L. Vecchia, T. Fasano

AUSL, IRCCS Reggio Emilia

E-mail: Tommaso.Fasano@asmn.re.it

A relevant proportion of patients clinically diagnosed as having familial hypercholesterolemia (FH) do not harbor causative mutations in FH-causing genes such as LDLR, APOB, and PCSK9. Recent findings suggest that rare and deleterious mutations in ABCG5/ABCG8 genes contribute substantially to mimicking the FH phenotype. We investigated a patient with clinical diagnosis of probable FH with no mutation in FH-causing genes. A 42 yo male patient presented to the lipid clinic with hypercholesterolemia (TC 310 mg/dl, LDL-C 243 mg/dl, HDL-C 41 mg/dl, TG 129 mg/dl) and a family history of premature CHD, with two sons (respectively 15 and 9 yo) having LDL-C above the 95th percentile for sex and age. Dutch score of the patient was 6. Next generation sequencing for a panel of FH-related genes was performed on patient's DNA. Lipid-lowering therapy was established and lipid profile monitored. Statin therapy was started (atorvastatin 20 and 40 mg/daily) with a modest LDL-C reduction (LDL-C 204 mg/dl, -16% compared to no therapy). Genetic analysis was negative for mutations in LDLR, APOB and PCSK9 genes. A heterozygous mutation in ABCG5 gene was discovered in patient's DNA (Exon 7, c.805G>A, Gly269Arg). The two sons were found to share the same ABCG5 mutation with the father. Ezetimibe (10 mg) was added to statin therapy and a robust LDL-C reduction was observed (LDL-C 118 mg/dl, -42% compared to atorvastatin alone). Surrogate markers of cholesterol absorption were not quantified. A dominant pattern of segregation for a deleterious ABCG5 mutation with hypercholesterolemic phenotype was found in the family described. In our patient, net LDL-C reduction was only modest with statin therapy. Based on the results genetic analysis, ezetimibe was added to therapy and a significant reduction of LDL-C was observed. Our data support the idea that genetic testing is important to establish a correct lipid-lowering therapy.

**LIPOPROTEIN (A), METABOLIC SYNDROME  
COMPONENTS AND CIGARETTE SMOKING  
ARE INDEPENDENT PREDICTORS  
OF CARDIOVASCULAR EVENTS  
IN MEDITERRANEAN WOMEN  
(PROGETTO ATENA)**

M. Tripaldella<sup>1</sup>, M. Gentile<sup>1</sup>, V. Simeon<sup>2</sup>, G. Iannuzzo<sup>3</sup>,  
A. Mattiello<sup>3</sup>, A. Buonaiuto<sup>3</sup>, F. Forte<sup>3</sup>, A. Iannuzzi<sup>4</sup>,  
M.D. Di Taranto<sup>5</sup>, S. Panico<sup>1</sup>, P. Rubba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università "Federico II" di Napoli; <sup>2</sup>Unità Statistica Medica, Dipartimento di Salute Mentale e Fisica e Medicina Preventiva, Università degli Studi della Campania 'Luigi Vanvitelli', Napoli; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università "Federico II" di Napoli; <sup>4</sup>UO Medicina Interna, AORN "A. Cardarelli" di Napoli; <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli and CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli

E-mail: mariatripaldella@gmail.com

**Background.** Cardiovascular disease (CVD) is the primary cause of mortality globally and ischaemic heart disease is responsible for one third of all female deaths.

**Methods.** Twenty-five years after a baseline visit, blood glucose and Lipoprotein a), (Lp [a]) were measured, in a group of 296 women participating in Progetto Atena (N=5062). Women were divided into a control group (group 1, N=147) and a group (group 2, N=148) who experienced cardiovascular events after the initial visit. Low density lipoprotein (LDL) diameter and LDL score, a marker of small dense LDL, were also determined.

**Results.** The two groups were of comparable age, group 1 (55.9±7.6 yrs), group 2 (55.8±7.6 yrs). LDL Cholesterol ( $p=0.014$ ), Triglycerides ( $p=0.006$ ), Systolic blood pressure ( $p=0.004$ ), Diastolic blood pressure ( $p=0.003$ ), LDL score ( $p=0.012$ ) and Lp(a) ( $p=0.026$ ) were higher in the group with cardiovascular events, while HDL-cholesterol ( $p<0.001$ ) and LDL diameter were lower ( $p=0.021$ ). There were more smokers ( $p=0.001$ ) in the group reporting cardiovascular events. In conditional logistic regression analysis, elevated Lp(a) (Rate ratio, RR 1.26,  $p=0.03$ ), smoking (RR 4.45,  $p<0.001$ ) and Metabolic Syndrome components were independently associated with increased risk of having CVD. Among individual Metabolic Syndrome components, low HDL cholesterol (RR 0.97,  $p=0.05$ ), high Systolic Blood pressure (RR 1.02,  $p=0.002$ ) and presence of diabetes mellitus (RR 4.8,  $p<0.05$ ) were independently related to CVD.

**Conclusions.** In this group of women, elevated Lp(a), smoking habits and Metabolic Syndrome components were independent predictors of CVD.

**CAN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA  
BE DIAGNOSED AT BIRTH?  
A CASE REPORT**

C. Viggiano, R. Stracquadaino, S. Paci, E. Verduci,  
G. Banderali, C. Pederiva

Clinica Pediatrica, Ospedale San Paolo, ASST-Santi Paolo e Carlo,  
Università degli Studi di Milano

E-mail: claudiaviggiano79@gmail.com

**Introduction.** Heterozygous Familial Hypercholesterolaemia (FH) is a common codominant monogenic dyslipidaemia associated with premature cardiovascular disease (CVD) due to lifelong elevation of plasma levels of LDL-C. Around 95% of FH cases are caused by mutations in LDL-R. Timely identification and treatment of children with severely elevated cholesterol levels, can be an important step in reducing cardiovascular events

**Aim.** It is increasingly recognised that childhood and early adolescence offer the most favourable timeframe for diagnosing FH as well as introducing and maintaining lifelong treatment and management strategies. We report a case of heterozygous familial hypercholesterolaemia diagnosed at birth.

**Results.** It is an Italian child, born in our Hospital, with important family history for hypercholesterolemia and premature CVD (father and first cousin with FH in drug therapy, grandfather with myocardial infarction at 34y) that was blood-sampled for lipid profile and genetic screening when it was four days old. The lipid profile was normal (mg/dl): TC: 98, LDL-C:34, HDL-C:29, triglycerides:109, Lp(a):2. The genetic screening showed a pathogenetic mutation in heterozygous in the LDL-R gene, exon 10, c.1466A>G (also present in the father and first cousin). At subsequent checks, the lipid profile remained normal up to 18 months of life when it reached atherogenic values (mg/dl): TC:212, LDL-C:150, HDL-C:40, triglycerides: 110. Diet intervention with less consumption of fat, more fruit, vegetables and whole grain, was started very early, with excellent compliance of the whole family. The stature-ponderal growth has always been within limits. At the last check (June 2019), LDL-C was very high (mg/dl): TC:250, LDL-C:195, HDL-C:43, triglycerides: 61 and we planned to start drug therapy.

**Conclusions.** Family history is one of the keys to early diagnosis, but the analysis of the candidate genes for FH helps in the clinical management and in the screening of affected family members, gives a definitive diagnosis and avoids delays in the diagnostic process and in the implementation of appropriate treatment.

## THREE NEW ITALIAN CASES OF LCAT DEFICIENCY

M. Turri<sup>1</sup>, B. Dal Pino<sup>2</sup>, F. Sbrana<sup>2</sup>, F. Bigazzi<sup>2</sup>, L. D'Erasmo<sup>3</sup>, M. Minicocci<sup>3</sup>, B. Arosio<sup>4</sup>, D. Azzolino<sup>4</sup>, C. Pavanello<sup>1</sup>, T. Lucchi<sup>5</sup>, M. Arcà<sup>6</sup>, T. Sampietro<sup>6</sup>, L. Calabresi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Lipoapheresis Unit and Reference Centre for Inherited Dyslipidaemias, Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa; <sup>3</sup>Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University of Rome; <sup>4</sup>Metabolic Disease Clinic-Geriatric Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan; <sup>5</sup>Metabolic Disease Clinic-Geriatric Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan; <sup>6</sup>Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University of Rome  
E-mail: marta.turri@icloud.com

**Background.** Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) is the unique human enzyme capable of catalysing the formation of cholesteryl esters in plasma. The reaction takes place both in HDL, preferential substrate for LCAT, and in LDL. LCAT deficiency is a rare recessive disorder caused by loss-of-function mutations in the human LCAT gene. More than 90 LCAT mutations have been described, which lead to two different syndromes, familial LCAT deficiency (FLD, OMIM #245900) and fish-eye disease (FED, OMIM #136120). Diagnosis of FLD and FED is based on biochemical parameters: in FLD subjects, the lack of LCAT activity is complete; in FED subjects, LCAT loses its ability to esterify cholesterol on HDL, but it retains its activity on LDL. Biochemical alterations in LCAT deficiency are characterized by very low HDL cholesterol levels with deep modifications of HDL subpopulation distribution, high triglyceride levels, and the presence of lipoprotein X, an abnormal lipoprotein absent in physiological conditions. Clinical manifestations are different in FLD and FED cases: they both show corneal opacity, while anemia and renal disease, the major cause of morbidity and mortality, affect mainly FLD carriers. The role of LCAT in atherogenesis is still debated; FLD carriers normally do not show subclinical atherosclerosis (measured as carotid Intima-Media Thickness, IMT), while FED cases show an increased carotid IMT.

**Methods.** Blood samples have been collected after an overnight fast and plasma separated by low-speed centrifugation at 4 °C. A complete lipid-lipoprotein profile, has been determined using a Roche Integra c311 analyzer. It includes plasma total and unesterified cholesterol, VLDL, LDL and HDL cholesterol, triglycerides, phospholipids, apoA-I, apoA-II and apoB. Plasma cholesterol esterification rate (CER) and LCAT activity, that reflect the ability of endogenous LCAT to esterify cholesterol within endogenous lipoproteins and exogenous HDL, respectively, have been assessed by using standardized methods. Genetic analysis have been performed on carriers' blood samples.

**Results.** Three new carriers of LCAT deficiency (1M/2F) have been recently identified and characterized. Two not related subjects (1M, 63 y.o.; 1F, 62 y.o.) are homozygotes for the Val309Met mutation, and one (1F, 20 y.o.) is a compound heterozygote for the Val139Ala stop 6 and Ile202Thr. Based on absence of LCAT activity and cholesterol esterification rate, the three cases have been diagnosed FLD. They all show very low HDL-C levels (7-9 mg/dL) and reduced apoA-I (28-30 mg/dL). Plasma LDL-C is also reduced in all of them (33-56 mg/dL). The unesterified to total cholesterol ratio is very high (76%-94%); one carrier shows high plasma triglyc-

erides (337 mg/dL). HDL subclasses analysis shows a high content of small native HDL particles, and absence of large HDL. The 3 carriers show corneal opacity and anemia. Two of them (1M/1F, carriers of the Val309Met mutation) present severe renal disease (serum creatinine 3.5 and 2.9 mg/dL) and they are waiting for kidney transplantation. The compound heterozygote display no sign of atherosclerosis, but unexpectedly the homozygous carriers for the Val309Met mutation, show dramatic multivessel atherosclerosis and have history of severe cardiovascular disease, contrary to what it has been described for FLD carriers, and despite the low LDL-C levels. This peculiar phenotype, which might be related to the specific LCAT mutation, is presently under investigation.

## A DOUBTFUL CASE OF RABDOMIOLYSIS

F. Vezzani, I. Rossi, D. D'Ardes, F. Cipollone, M. Bucci  
Centro Ipertensione e Dislipidemie, Università di Chieti  
E-mail: mbucci@unich.it

**Case report.** A 52-yo female patient, suffering from systemic atherosclerotic disease (aortic ulcer and common iliac artery stenosis), came to our Center 5 years ago for a diagnostic reassessment of a severe hypercholesterolemia. In her history there were a cerebellar cavernous angioma and a previous episode of rhabdomyolysis due to fluvastatin hesitated in a myotonic myopathy with a consequent absolute contraindication to statin use. Her family history was positive for premature cardio-cerebrovascular events. The genetic test we performed was positive for the LDLR variant c.661A>G (p.Asp221Asn) in heterozygosity. She was referred to the Transfusion Center of Pescara to perform LDL-apheresis Q2W from 2014 (without other lipid-lowering therapy) with only partial efficacy and persistence of moderately elevated LDL-C values. Ezetimibe, introduced in her therapy, was suspended due to an increase in CPK (3-4xUNL). In 2015 she had a stroke and a MI treated with PTCA+stent. In 2016 she started taking Alirocumab 150 mg Q2W in association with LDL-apheresis without reaching the LDL-C recommended target. To increase patient compliance, in 2018 she was directed to her home nearest Apheresis Center, but since her pre-apheresis LDL-C remained >150 mg/dL, with the patient's informed consent, we tried to reintroduce a low dose of pravastatin obtaining an improvement in LDL-C (80 mg/dL) with an asymptomatic slight increase in CPK.

**Discussion.** Patient's LDL-C target <55 ( $<40$ ) mg/dL, according to the current guidelines, is difficult to reach considering baseline values. However, with the current strategy, we have obtained a stable reduction from the basal values >50%. Meanwhile, we are evaluating and reconsidering the possibility of a genetic neurological disorder (mild neuromotor symptoms and a daughter with a neuromotor problematic not yet defined) perhaps responsible for the symptomatology and the rise in CPK. Despite the moderate increase in CPK during pravastatin, our patient is currently asymptomatic. The perspective is to titrate a well-tolerated and sufficiently effective statin and perhaps associate ezetimibe in order to limit the need for LDL-apheresis.

## Reference

- Society, E. et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. Eur. Heart. J. 2019; 0, 1.78.

## INTRAMUSCULAR INJECTION OF HD-AD VECTOR EXPRESSING A SECRETED LDLR/TF CHIMERIC PROTEIN AMELIORATES LIPID PROFILE IN LDLR-DEFICIENT MICE

M. Vitale<sup>1</sup>, E. Leggiero<sup>2</sup>, A. D'Agostino<sup>3</sup>, G. Labruna<sup>4</sup>, B. Lombardo<sup>1</sup>, L. Tripodi<sup>5</sup>, L. Pastore<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; <sup>2</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli; <sup>3</sup>SEMM-European School for Molecular Medicine, Naples; <sup>4</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli; <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli  
E-mail: leggiero@ceinge.unina.it

Familial hypercholesterolemia (FH) is an inherited disorder of lipid metabolism mainly due to mutations in the LDL receptor (LDLR) gene and is characterized by premature onset of cardiovascular disease due to high plasma LDL cholesterol concentrations. FH patients homozygous for LDLR mutations do not always respond to conventional therapies and have often a poor prognosis. Therefore, more effective therapeutic strategies, such as gene therapy, are still of main interest. We have recently developed a safe and effective gene therapy strategy based on liver expression of a secreted chimeric protein composed of the extracellular portion of the LDLR linked to a transferrin dimer using a helper-dependent adenoviral (HD-Ad) vector. This chimeric protein binds LDL and removes them from the bloodstream by receptor-mediated endocytosis through the transferrin receptor (TfR). As previously demonstrated, intravenous administration of this HD-Ad vector in LDLR-deficient mice resulted in an amelioration of the lipid profile and a reduction of aortic atherosclerosis. In order to increase safety of this strategy for a possible clinical application, we have recently generated a HD-Ad vector for a muscle-restricted expression of the mLDLR/mTF chimeric protein using a muscle-specific promoter and intramuscular administration of the vector. We observed expression of the chimeric protein after infection of myoblast C2C12 cell lines with our HD-Ad vector, whereas expression was absent after infection of other cell lines derived from different tissues. In preliminary experiments, expression of the chimeric protein after intramuscular administration in LDLR-deficient mice ameliorated the lipid profile compared to controls. In summary, we developed an innovative strategy for FH therapy based on the expression of a secreted chimeric protein after intramuscular administration of an HD-Ad vector. This approach reduces risks associated to systemic administration of viral vectors and, in principle, is applicable to other genetic diseases; collection of additional efficacy and safety data will further define its applicability in clinical settings.

## PREVALENCE OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA (FH) IN ITALIAN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE: THE POSTER STUDY

V. Zampoleri<sup>1,2</sup>, M. Casula<sup>3,10</sup>, D. Lucci<sup>1</sup>, G. Fabbri<sup>4</sup>, M.G. Abrignani<sup>5</sup>, M. Averna<sup>6</sup>, S. Calandra<sup>7</sup>, F. Colivicchi<sup>8</sup>, M.M. Gulizia<sup>4,9</sup>, A.P. Maggioni<sup>4</sup>, A.L. Catapano<sup>1,10</sup> on behalf of POSTER Investigators

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milano; <sup>3</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Centre (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences (DiSFeB), University of Milan; <sup>4</sup>ANMCO Research Center of the Heart Care Foundation, Florence; <sup>5</sup>Operative Unit of Cardiology, S. Antonio Abate Hospital, ASP Trapani; <sup>6</sup>Department of Health Promotion Sciences, Maternal and Infant Care, Internal Medicine and Medical Specialties, University of Palermo, Palermo, Italy; <sup>7</sup>Department of Biomedical, Metabolic and Neural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena; <sup>8</sup>Division of Cardiology, San Filippo Neri Hospital, Rome; <sup>9</sup>Cardiology Division, Ospedale Garibaldi-Nesima, Azienda di Rilievo Nazionale e Alta Specializzazione "Garibaldi" Catania; <sup>10</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano  
E-mail: veronica.zampoleri@unimi.it

**Background and Aims.** Familial hypercholesterolaemia (FH) is a risk factor for cardiovascular (CV) events. High levels of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) since birth are linked to the early onset of atherosclerotic disease. A genetic mutation determining FH is about in one subject out of 250; FH should be more represented among subjects with a documented diagnosis of coronary artery disease (CAD). The POSTER Study evaluated the prevalence of FH in Italian patients with recent cardiovascular event.

**Methods.** Eighty-two cardiology centers enrolled patients with a documented CAD event; CV risk profile, drug therapy and biochemical parameters were collected. Patients with a Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) score  $\geq 6$  underwent to a whole blood sample withdrawal to perform a genetic test based on full gene sequencing of genes involved in FH.

**Results.** Overall, 5415 patients were enrolled and the main index event was an acute coronary syndrome, myocardial infarction with or without ST-elevation, or a recent coronary revascularization (34.8%, 37.2% and 28% respectively). Mean age was  $66 \pm 11$  years, men were 78%; about 40% were already treated with statins, proportion that increased after the acute event (96.5%). Based on the DLCN score, the prevalence of potential FH (score  $\geq 6$ ) was 5.1%, 0.9% had a diagnosis of definite FH (score  $> 8$ ). These patients were younger than patients with a score  $< 6$  ( $56 \pm 10$  vs  $66 \pm 11$ ,  $p < 0.001$ ), and LDL-C levels were in most of them (~87%)  $> 190$  mg/dL. The genetic test has been performed in 259 patients: 37 patients (14.2%) were positive for the diagnosis of FH, in 63 (24.3%) patients there was a mutation, but the genetic diagnosis was defined as not-conclusive for FH.

**Conclusions.** Results underscore a prevalence of FH in patients with a recent CAD. Therefore, an early identification of these subjects may help to improve their high cardiovascular risk.

# INDICE DEGLI AUTORI

- A**
- Abrignani M.G., s52
  - Accattatis F.M., s1
  - Adorni M.P., s3, s33
  - Aghessaf S., s37
  - Agostini C., s21
  - Al Refaie A., s11
  - Alberti A., s40, s45
  - Alexander V.J., s19
  - Altieri G.I., s6, s24, s45, s47
  - Altomari A., s1, s41
  - Amadio P., s7
  - Angelico F., s2, s20
  - Arca M., s20, s22, s51
  - Arnaboldi F., s7
  - Arnaboldi L., s1, s15, s26
  - Arosio B., s26, s51
  - Arrigoni G., s21
  - Avenoso A., s46
  - Aventaggiato M., s1
  - Averna M.R., s6, s45, s47, s52
  - Azzolino D., s26, s51
- B**
- Balla A., s2
  - Banach M., s21
  - Banderali G., s50
  - Baragetti A., s2, s26
  - Baratta F., s2, s20
  - Barbagallo C.M., s6, s24, s45, s47
  - Barbieri S.S., s7
  - Bartimoccia S., s8, s35
  - Battista S., s38
  - Battistoni M., s1, s41
  - Beccaria A., s27
  - Beretta G., s49
  - Bergese P., s1
  - Bernini F., s33, s38
  - Bertacco E., s21
  - Bertocco S., s5, s44
  - Bertolini S., s39
  - Biagini S., s44
  - Bianconi V., s3, s14
  - Biancorosso N., s3
  - Biasucci G., s9
- C**
- Bigazzi F., s4, s16, s40, s44, s51
  - Bigolin P., s5, s44
  - Biolo M., s5, s44
  - Bolego C., s21
  - Bollati V., s31
  - Bonacina F., s2, s5, s7, s34, s49
  - Bonadonna R., s41
  - Bonaiti F., s4, s9, s25
  - Bonapace S., s32
  - Boni M., s34
  - Bonomo K., s36
  - Bonora E., s31, s41
  - Bordicchia M., s20
  - Bordoni V., s42
  - Borghi C., s12, s13, s19, s22, s43
  - Borro P., s39
  - Bortone E., s14
  - Bos C., s29
  - Boselli M.L., s41
  - Bove M., s22
  - Branchi A., s29, s39
  - Bressan A., s3
  - Brilli E., s3
  - Brucato F., s6, s24, s45, s47
  - Bruckert E., s19
  - Bucci M., s17, s42, s51
  - Buganza R., s8, s27
  - Buoli M., s31
  - Buonaiuto A., s6, s23, s35, s50
  - Busnelli M., s7
  - Busti F., s6
- C**
- Caffarelli C., s11
  - Calabresi L., s29, s40, s45, s48, s51
  - Calandra S., s52
  - Calcaterra I., s6, s23
  - Camarri S., s11
  - Camera M., s30
  - Cammisotto V., s8, s10, s35
  - Campana G., s7
  - Campo G.M., s46
  - Campo S., s46
  - Cangemi R., s10
  - Canovi S., s49
  - Capatti E., s16, s46
  - Cappello P., s15
  - Capra M.E., s9, s25
  - Cardella A.M., s24
  - Cardiero G., s10, s25, s32, s36
  - Cardillo C., s18
  - Carenini M., s40
  - Carnevale R., s8, s10, s35
  - Carrai P., s11
  - Carubbi F., s11, s28
  - Cassinerio E., s39
  - Castellani V., s8, s35
  - Castelnuovo S., s26, s39
  - Casula M., s4, s9, s23, s25, s37, s52
  - Catapano A.L., s2, s4, s5, s9, s15, s23, s24, s25, s37, s49, s52
  - Cavalot F., s36
  - Cavicchioli A., s11, s28
  - Cefalù A.B., s6, s39, s45, s47
  - Ceradini G., s41
  - Ceresa A., s31
  - Chen H., s3
  - Chiesa G., s7
  - Cicco S., s12
  - Cicero A.F.G., s12, s13, s19, s21, s22, s43
  - Cinquegrani M., s13, s43, s47
  - Cipollone F., s17, s42, s51
  - Coceani M., s4
  - Cocomello N., s2, s35
  - Coisne A., s37
  - Colangiulo A., s29
  - Colivicchi F., s52
  - Colombo A., s7
  - Colonna R., s14
  - Conforti C., s31
  - Consoli A., s27
  - Consonni D., s29
  - Corrao G., s37
  - Corsini A., s1, s26, s31
  - Cosentini E., s14
  - Costantino G., s13
  - Cremonesi M., s5
  - Cremonini A.L., s39
  - Crudele L., s12
  - Cupido A.J., s24
  - Curcio R., s3, s14

- D**
- D'Agostino A., s52
  - D'Abbondanza M., s15, s30
  - D'Addato S., s12, s13, s19, s43
  - D'Amati G., s10
  - D'Amuri A., s16, s46
  - D'Ardes D., s17, s42, s51
  - D'Ascola A., s46
  - D'Erasmo L., s19, s20, s35, s51
  - Da Dalt L., s2, s15, s29
  - Dal Pino B., s4, s16, s40, s44, s51
  - Dall'Acqua S., s3
  - Dall'Agata M., s29
  - Dalla Nora E., s14, s16, s28, s29, s46
  - Dammacco F., s12
  - Daviddi G., s34
  - De Cario R., s17, s26, s27, s48
  - De Maria R., s40
  - de Sanctis L., s8, s27
  - De Stefano A., s18
  - De Vuono S., s15, s30, s34
  - Del Ben M., s2, s20
  - Del Sole F., s18
  - Desideri G., s12
  - Di Costanzo A., s20
  - Di Daniele N., s18
  - Di Martino M., s20
  - Di Mauro S., s45
  - Di Minno M.D., s6
  - Di Minno M.N.D., s23
  - Di Pentima C., s20, s42
  - Di Pino A., s43, s45
  - Di Taranto M.D., s8, s10, s23, s25, s32, s36, s50
  - Di Vece F., s16
  - Di Veci F., s46
  - Digenio A., s19
  - Donato M., s21
  - Donetti E., s7
  - Dongiovanni P., s29
  - Dubrulle H., s37
- F**
- Fabbri G., s52
  - Fabris F., s5, s44
  - Faggion E., s3, s21, s30
  - Farcomeni A., s18
  - Fare F., s49
  - Fargion S., s29
  - Fasano T., s49
  - Favari E., s20
  - Favero C., s31
- Fayer F.**, s6, s24, s45, s47
- Ference B.A.**, s24
- Ferrari C.**, s19
- Ferri N.**, s1, s3, s30, s31
- Ferro D.**, s2
- Filippello A.**, s45
- Filipponi A.**, s42
- Fogacci F.**, s12, s13, s21, s22
- Fogliaro M.P.**, s44
- Forte F.**, s6, s10, s23, s50
- Forte M.**, s10
- Fortini P.**, s11
- Fortunato G.**, s6, s10, s25, s32, s36
- Fracanzani A.L.**, s29
- Frascaroli C.**, s36
- Frati G.**, s10
- Freedman S.D.**, s19
- Fresa R.**, s39
- Fries W.**, s13
- Fusaro J.**, s3
- G**
- Galimberti F., s23, s24, s37
  - Galli A., s15
  - Galora S., s17, s27
  - Galvan S., s1
  - Ganci A., s45, s47
  - Ganzetti G.S., s38
  - Garron G., s49
  - Gaudet D., s19
  - Gaudio C., s10
  - Gazzotti M., s4, s9, s25
  - Geary R.S., s19
  - Gelrud A., s19
  - Gentile M., s6, s23, s50
  - Gentileschi P., s18
  - Gerace A., s8
  - Giacobbe C., s6, s10, s23, s25, s32, s36
  - Giammanco A., s6, s24, s45, s47
  - Giorgio E., s26, s29
  - Giovannini M., s22
  - Girelli D., s6
  - Giulietti F., s20, s42
  - Giusti B., s17, s26, s27, s48
  - Gomaraschi M., s26, s29, s39
  - Gonnelli S.T., s11
  - Gori A.M., s26, s27, s48
  - Gouni-Berthold I., s19
  - Granata A., s1, s26
  - Grandi E., s12, s13
  - Greco D., s38
  - Greco M.F., s31, s34
  - Grigore L., s2, s4, s26
- Guarascio M.**, s12
- Guardamagna O.**, s8, s27, s32, s36
- Gulizia M.M.**, s52
- H**
- Hernandez A.V., s21
  - Hiatt W.R., s18
  - Hollan I., s33
  - Hsieh A., s19
  - Hughes S.G., s19
- I**
- Iannuzzi A., s7, s10, s50
  - Iannuzzo G., s6, s7, s10, s23, s50
  - Imbalzano E., s43
  - Ingrassia V., s6, s24, s45, s47
  - Inzitari D., s27
- K**
- Kallikourdis M., s5
  - Katzmann J.L., s24
  - Keech A.C., s24
  - Kura A., s17, s26, s27, s48
- L**
- Laaksonen R., s7
  - Labruna G., s52
  - Latini R., s32
  - Lazzer S., s16, s46
  - Leggiero E., s52
  - Leone P., s12
  - Licenziati M.R., s7
  - Limbucci N., s27
  - Lo Coco G., s28, s29
  - Lo Gullo A., s47
  - Lo Surdo G., s44
  - Locatelli S., s5
  - Loddo S., s47
  - Lombardi R., s29
  - Lombardo B., s52
  - Lucchi T., s26
  - Lucchi5 T., s51
  - Lucci D., s52
  - Luciani F., s28, s29
  - Luciani R., s4, s16, s40, s44
  - Lugari S., s11, s28
  - Lunardi G., s32
  - Lupattelli G., s15, s34
  - Lupo M.G., s1, s3, s30
- M**
- Maccarone A., s33
  - Macchi C., s31, s34

- Maggioni A.P., s32, s52  
 Magi A., s17, s26, s27, s48  
 Maino P., s40  
 Maione G., s10, s25, s32, s36  
 Mamone F., s43  
 Mancini R., s43  
 Mandraffino G., s13, s35, s43, s46, s47  
 Maneschi C., s1, s31  
 Manfredini M., s20  
 Mangiafico S., s27  
 Mannarino M.R., s3, s14, s35  
 Mantovani A., s32  
 Manzato E., s5, s44  
 Manzini S., s7  
 Marchi C., s33  
 Marcucci R., s17, s26, s27, s48  
 Maretta A., s41  
 Marin R., s5, s44  
 Martinelli N., s6  
 Martini E., s5  
 Martorelli E.E., s15  
 Massini G., s8, s27, s32, s36  
 Mattiello A., s50  
 Mazza S., s1  
 Meessen J., s32  
 Menichelli D., s18, s33  
 Mezzaroma I., s35  
 Milanese A., s18  
 Minicocci I., s51  
 Ministrini S., s15, s30, s34  
 Miselli M.A., s14  
 Misiano G., s6, s45, s47  
 Modine T., s37  
 Mojovic N., s14  
 Molácek J., s33  
 Mombelli G., s39, s40  
 Mondelli A., s11, s28  
 Mondovecchio G., s15  
 Montaigne D., s37  
 Moregola A., s2, s34  
 Morieri M.L., s35  
 Morlino D., s7  
 Murri A., s26, s48
- N**  
 Nappini S., s27  
 Nascimbeni F., s11, s28  
 Negri E.A., s49  
 Ninni S., s37  
 Nistri S., s17  
 Nocella C., s8, s10, s35  
 Nofer J.-R., s38
- Norata G.D., s2, s5, s15, s22, s29, s34, s49  
 Nota F., s36  
 Noto D., s6, s45, s47  
 Nour J., s5  
 Nulli Migliola E., s15, s30  
 Nuti R., s11
- O**  
 Olivieri O., s6  
 Olmastroni E., s4, s9, s23, s25, s37  
 Origi G., s40  
 Orsi F., s40  
 Ossoli A., s26, s45, s48
- P**  
 Paci S., s50  
 Paganelli M.T., s15, s30, s34  
 Paganini A.M., s2  
 Paiola E., s1, s31, s35  
 Palma D., s10, s25, s32, s36  
 Palmisano S., s19, s43  
 Paltrinieri S., s7  
 Panchetti L., s16  
 Panico S., s50  
 Panzavolta C., s5, s37, s44  
 Papa A., s16  
 Papotti B., s38  
 Parolini C., s38  
 Parolini M., s40  
 Passaro A., s14, s16, s28, s29, s46  
 Pasta A., s26, s39  
 Pastore L., s52  
 Pastorì D., s2, s8, s10, s18, s20, s33, s35  
 Patron D., s43  
 Pauletto P., s21  
 Pavanello C., s26, s29, s35, s39, s40, s45, s51  
 Pazzucconi F., s40  
 Pederiva C., s9, s25, s50  
 Pellegatta F., s2, s5  
 Pellegrini E., s11, s28  
 Pepe G., s17  
 Perego C., s15  
 Pesatori A.C., s31  
 Pianelli M., s4, s16, s40, s44  
 Piccardi B., s27  
 Picciotto A., s39  
 Pignatelli P., s8, s33, s35  
 Pirillo A., s2  
 Piro S., s43, s45  
 Pirro M., s3, s14  
 Pisciotta L., s26, s39
- Poggio P., s30  
 Polito L., s20  
 Pontana F., s37  
 Poti F., s38  
 Presta V., s13  
 Prete M., s12  
 Previato L., s5, s44  
 Puato M., s21  
 Pulicanò M., s41  
 Purrello F., s45
- R**  
 Rabuazzo A.M., s43, s45  
 Rabuini M.V., s5, s44  
 Racanelli V., s12  
 Ramazzotti E., s43  
 Rattazzi M., s3, s21, s30  
 Renieri L., s27  
 Renis M., s7  
 Ricci M.A., s15, s30, s34  
 Ridolfi A., s1  
 Rigamonti E., s38  
 Rinaldi E., s41  
 Ripoli A., s4, s44  
 Ristori L., s42  
 Rizzoli E., s12, s13  
 Rodriguez Carrio J., s13, s43, s46, s47  
 Romano M., s1  
 Ronca A., s20  
 Ronda N., s33  
 Roscini A.R., s15, s30  
 Rosi A., s27  
 Rossi E., s33  
 Rossi I., s17, s35, s42, s51  
 Rossolini A., s43  
 Rubba P., s6, s10, s23, s50  
 Ruscica M., s31, s34
- S**  
 Sahebkar A., s3  
 Saitta A., s13, s46, s47  
 Sala A., s21  
 Salvalaio M., s3  
 Salvati M.A., s35  
 Sampietro T., s4, s16, s40, s44, s51  
 Sandri D., s1  
 Sandrini L., s7  
 Sanga V., s31  
 Santi L., s31, s41  
 Sanyal A.J., s2  
 Sanz J.M., s14, s16, s46  
 Sanz Molina J., s28, s29

- Sarti C., s27  
 Sarzani R., s20, s42  
 Savarino F., s13, s43, s47  
 Sbrana F., s4, s16, s40, s44, s51  
 Scalera E., s38  
 Scamporrino A., s45  
 Scanziani E., s7  
 Scarinzi P., s5, s44  
 Scarponi A.M., s34  
 Scavizzi M., s34  
 Schinzari F., s18  
 Sciarretta S., s10  
 Scicali R., s35, s43, s45  
 Scolaro M., s13  
 Scotti L., s37  
 Scrimali C., s6, s24, s39, s45, s47  
 Scuruchi M., s13, s43, s46, s47  
 Semprini C.M., s14, s28, s46  
 Senkeev R., s36  
 Sereni A., s27  
 Sica G.S., s18  
 Siepi D., s15, s30  
 Simeon V., s50  
 Simoni M., s38  
 Sinicropi D., s47  
 Sirtori C.R., s31  
 Snidermann A.D., s24  
 Sodero A., s27  
 Soldati S., s7  
 Spagnuolo V., s41  
 Spannella F., s20, s42  
 Spina R., s6, s24, s39, s45, s47  
 Squadrito G., s13, s47
- Staels B., s37  
 Sticchi E., s17, s26, s27, s48  
 Stracquadaino R., s50  
 Strazzella A., s45, s48  
 Stroes E., s19  
 Suraci S., s17, s26, s27, s48  
 Susca N., s12  
 Svecla M., s49
- T**  
 Tanzilli G., s10  
 Tarantino G., s3  
 Targher G., s1, s32  
 Tavazzi L., s32  
 Temporelli P.L., s32  
 Tesauro M., s18  
 Tocci G., s13  
 Tombariv F., s43  
 Toth P., s22  
 Tozzi G., s39  
 Tragni E., s23, s37  
 Travia D., s31  
 Trenti C., s49  
 Treska V., s33  
 Trevisin M., s24  
 Tripaldella M., s6, s50  
 Tripodi L., s52  
 Trivella M.G., s40  
 Trombetta M., s41  
 Turri M., s48, s51
- U**  
 Ubaldi P., s49  
 Urbano F., s45
- V**  
 Vacca A., s12  
 Vaccari F., s16, s46  
 Valenti V., s24, s45, s47  
 Valerio G., s7  
 Vecchia L., s49  
 Ventura F., s13, s43  
 Verduci E., s50  
 Vergani E., s1  
 Vezzani F., s17, s42, s51  
 Vianello D., s5, s44  
 Viggiano C., s50  
 Vigna G.B., s28, s29  
 Vigna L., s31  
 Violi F., s2, s8, s10, s18, s33  
 Vita P., s11, s28  
 Vitale M., s52  
 Vivian G., s3  
 Volpi E., s44  
 Volta A., s17, s26, s48
- W**  
 Woitrain E., s37
- Z**  
 Zambon A., s5, s37, s44  
 Zambon S., s4, s5, s44  
 Zampoleri V., s2, s52  
 Zanotti I., s38  
 Zenti M.G., s1, s31, s41  
 Zimetti F., s33  
 Zito C., s13  
 Zuliani G., s14, s16, s28, s46

