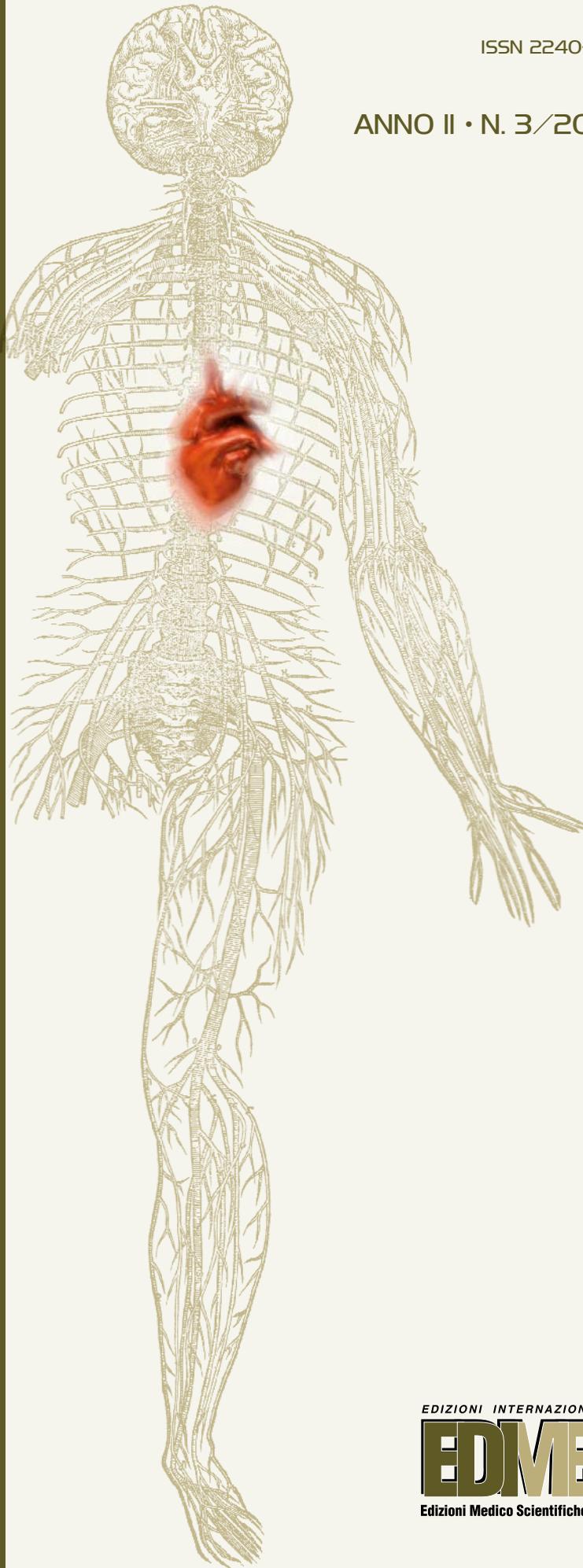


GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI

ISSN 2240-4821

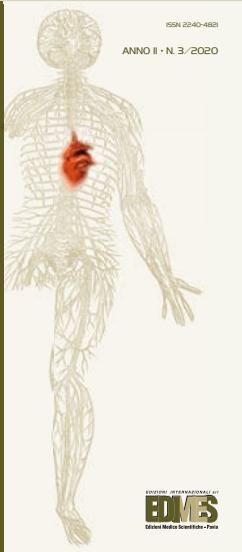
ANNO II • N. 3/2020



EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia



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

Direttori emeriti

M. Averna
G. Crepaldi
R. Fellin
E. Mannarino
E. Manzato
A. Mezzetti
G.F. Salvioi
A. Ventura

Direttore scientifico

M. Arca (Roma)

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 – S. Panico (Napoli)

Comitato di Redazione

A. Baragetti (Milano)
C.M. Barbagallo (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. Pisciotta (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

■ **STUDI SISA**

Studio Lipigen: apertura a nuove dislipidemie genetiche 5
LIPIGEN Study: opening to new genetic dyslipidaemias
Gruppo Lipigen

■ **MECCANISMI DI MALATTIA**

Long non-coding RNA e aterosclerosi 10
Long non-coding RNAs and atherosclerosis
*Bianca Papotti, Cinzia Marchi, Marcella Palumbo,
Franco Bernini, Nicoletta Ronda*

Disbiosi intestinale ed infarto del miocardio:

nuovi meccanismi di aterosclerosi 27
**Intestinal dysbiosis and myocardial infarction:
new mechanisms of atherosclerosis**
Roberto Carnevale, Vittoria Cammisotto, Cristina Nocella, Francesco Violi

■ **MARCATORI DI RISCHIO**

**Fibrosi epatica nei pazienti con naflid: un marcatore
non lipidico di rischio cardiovascolare residuo?** 42
**Hepatic fibrosis in patients with NAFLD:
a non-lipid residual cardiovascular risk marker?**
*Francesco Baratta, Daniele Pastori, Nicholas Cocomello,
Domenico Ferro, Francesco Angelico, Maria Del Ben*

■ **DISLIPIDEMIE IN PEDIATRIA**

Pratica clinica in ambulatorio pediatrico per le dislipidemie..... 53
Clinical approach to the pediatric patient with dyslipidemia
*Cristina Pederiva, Claudia Viggiano, Roberto Romano,
Rossella Lamberti, Marina Crosa, Giuseppe Banderali*

■ **MEDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ**

**L' "arteriosclerosi sperimentale" e la nascita dell'ipotesi
lipidica nella patogenesi dell'arteriosclerosi** 67
**The "Experimental Arteriosclerosis" and the birth of the lipid
hypothesis in the pathogenesis of arteriosclerosis**
Andrea Cozza, Gaetano Thiene

■ **NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI**

European Society of Cardiology 2020..... 72
Manuela Casula

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl



Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali srl

Divisione EDIMES
EDIZIONI MEDICO SCIENTIFICHE - PAVIA
Via Riviera 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 r.a. - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it



Consiglio Direttivo SISA

Marcello Arca - *Presidente*
Carlo M. Barbagallo
Anna Belfiore
Marco Bucci
Giulia Chiesa
Giuliana Fortunato
Luigi Gentile
Patrizia Tarugi
Maria Grazia Zenti
Enzo Manzato - *Past President*
Matteo Pirro - *Segretario*

Presidenti Sezioni Regionali SISA

Francesco Cipollone (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 (Siculo-Calabra)
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:

- revisioni critiche di argomenti di grande rilevanza nel campo dell'arteriosclerosi sia per quanto riguarda gli aspetti di base che gli aspetti clinico-applicativi;
- quesiti relativi agli argomenti trattati per una verifica di auto apprendimento;
- opinioni di esperti qualificati sui nuovi sviluppi delle conoscenze sull'arteriosclerosi;
- 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 dovranno 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 bibliografia)

ma incluso l'abstract, con un massimo di 4 figure o tabelle. Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo
- 2) Autori e loro affiliazione
- 3) Nome e affiliazione 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, Hubbart 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 anaphalipoproteinemia: Tangier disease. In "The metabolic and molecular bases of inherited disease", Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle I, eds, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001; 2937-60.

Rassegne

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo;
- 2) Autori e loro affiliazione;
- 3) Nome e affiliazione 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 auto-apprendimento 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 indicato 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

■ Meccanismi di malattia

Long non-coding RNA e aterosclerosi.

Solo l'1-2% del genoma umano ha funzione codificante; tecnologie di sequenziamento avanzate hanno portato all'identificazione dei trascritti non codificanti, *non-coding RNA*, tra cui i *long non-coding RNAs (lncRNAs)* rappresentano una classe eterogenea in grado di controllare l'espressione genica e i *pathways* di segnalazione. Chi legge, potrà aggiornarsi su espressione, funzione e meccanismo d'azione dei principali lncRNA ad oggi noti, coinvolti nella patologia aterosclerotica.

Disbiosi intestinale ed infarto del miocardio: nuovi meccanismi di aterosclerosi.

Il microbioma intestinale influenza, sia direttamente che indirettamente, i fattori di rischio dell'aterosclerosi, recitando così una parte di primo piano nelle malattie cardiovascolari. In questa rassegna vengono delineati il ruolo del microbioma intestinale nel processo aterosclerotico e i potenziali interventi terapeutici per modulare la disbiosi.

■ Marcatori di rischio

Fibrosi epatica nei pazienti con NAFLD:

un marcatore non lipidico di rischio cardiovascolare residuo?

Il rischio residuo è quello che permane dopo il trattamento ottimale dei fattori di rischio noti ed è particolarmente elevato nei soggetti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD). La rassegna esamina il ruolo della fibrosi epatica nei soggetti NAFLD, come marcatore indipendente di rischio cardiovascolare residuo.

■ Dislipidemie in pediatria

Pratica clinica in ambulatorio pediatrico per le dislipidemie.

Il lavoro evidenzia il ruolo dell'ambulatorio di pediatria nell'identificazione precoce dei bambini con ipercolesterolemia su cui intervenire, già prima della pubertà, con alimentazione, stili di vita corretti e, a partire dagli 8-10 anni di età, con statine.

■ Medicina, Scienza e Società

L'“arteriosclerosi sperimentale” e la nascita dell'ipotesi lipidica in Italia.

Storia dell'aterosclerosi in Italia attraverso la presentazione dei modelli sperimentali ideati per la comprensione dell'aterosclerosi umana e del ruolo dei lipidi nella sua patogenesi.

■ Notizie da Congressi Internazionali

Notizie dal congresso dell'European Society of Cardiology 2020.

34° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A. VIRTUAL EDITION DAL 22 NOVEMBRE 2020

SEGRETERIA S.I.S.A.

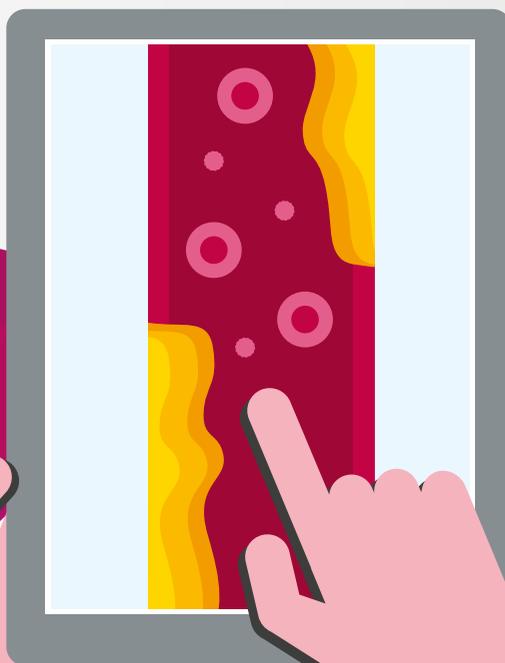


V.le Maresciallo Pilsudski, 118 • 00197 Roma
Tel. 06 845431 • Fax 06 84543700
E-mail info@sisa.it • Web www.sisa.it

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA



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



SOCIETA' ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ATEROSCLEROSI

SAVE THE DATE

STUDI SISA

STUDIO LIPIGEN: APERTURA A NUOVE DISLIPIDEMIE GENETICHE

LIPIGEN Study: opening to new genetic dyslipidaemias

GRUPPO LIPIGEN**SUMMARY**

Genetic dyslipidemias are a heterogeneous group of diseases characterized by alterations of lipid fractions, due to the presence of mutations in genes coding for proteins involved in synthesis, transport, and metabolism of plasma lipoproteins. To promote the clinical and genetic diagnosis of familial dyslipidemias, in 2012 the Italian Atherosclerosis Society (SISA) through its Foundation started the LIPIGEN study, initially focused on familial hypercholesterolemia. The recent progress in the field of rare dyslipidemias suggested the need to extend the LIPIGEN registry also to severe hypertriglyceridemias, in particular to familial chylomicronaemia syndrome (FCS). FCS is a rare, inherited disorder of triglyceride-rich lipoprotein (TRLs) metabolism, characterized by severe hypertriglyceridaemia (HTG), persistence of chylomicrons in plasma, TG levels higher than 885 mg/dL, and increased risk of recurrent episodes of potentially fatal pancreatitis. However, a diagnosis of FCS is present only in about 1-2% of subjects with hypertriglyceridemia, while multifactorial chylomicronemic syndrome (MCS) is more common.

Based on clinical experience in Italy, the LIPIGEN scientific committee has developed a score for the discrimination of adults with FCS or MCS from other dyslipidemias. It consists of point system that takes into account information related to personal clinical history and main clinical manifestations of these pathologies. Starting from autumn 2020, an *ad hoc* section will be available within the LIPIGEN register, to begin the data collection of subjects with FCS/MCS suspicion, representing the first step towards opening the register to other forms of familial dyslipidemias.

Key words: *Genetic dyslipidaemias, Pathology registry, Chylomicronemia syndrome, Severe hypertriglyceridaemias.*

Le dislipidemie genetiche sono un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate da alterazioni di alcune frazioni lipidiche, conseguenti alla presenza di mutazioni in diver-

si geni che codificano per proteine coinvolte nella sintesi, trasporto e metabolismo delle lipoproteine plasmatiche.

Alcune di queste dislipidemie familiari sono considerate malattie rare, altre invece interessano un numero maggiore di soggetti, risultando purtuttavia ancora sotto-diagnosticate e sotto-trattate nella popolazione generale (1, 2).

Per promuoverne e facilitarne la diagnosi clinica e genetica, dal 2009 la Società

Indirizzo per la corrispondenza

Marta Gazzotti
SEFAP, Dipartimento di Scienze Farmacologiche
e Biomolecolari – Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti, 9 – 20133 Milano
E-mail: marta.gazzotti@unimi.it

Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA) sostiene il Network LIPIGEN (acronimo in inglese di "*Lipid TransPort Disorders italian Genetic Network*"), una rete di centri con nota esperienza nella gestione di soggetti affetti da dislipidemie su tutto il territorio italiano. Altri obiettivi di questo progetto consistono nel contribuire ad aumentare la consapevolezza e favorire la ricerca consorziata nell'ambito delle dislipidemie genetiche in Italia. Sulla base di queste premesse e traendo vantaggio dalla rete così creata, nel 2012 la SISA, attraverso la sua Fondazione, ha avviato lo studio LIPIGEN, uno studio osservazionale, multicentrico, in parte retrospettivo e in parte prospettico, finalizzato alla creazione di un database nazionale di soggetti affetti da dislipidemie genetiche, sia più frequenti che rare (3). Lo studio LIPIGEN è iniziato focalizzandosi sulla forma più comune di queste dislipidemie, rappresentata dall'ipercolesterolemia familiare, portando all'analisi genetica di più di 6.000 soggetti con diagnosi clinica di FH e permettendo il consolidamento non solo del Network creato ma anche delle modalità per la raccolta ed analisi dei dati.

Poiché in tempi recenti sono stati fatti progressi importanti nell'ambito delle malattie rare del metabolismo lipidico, come documentato dal recente *Consensus* sulle dislipidemie rare pubblicato dall'*European Atherosclerosis Society* (EAS), si è ritenuto il momento opportuno per estendere il registro LIPIGEN anche alle ipertrigliceridemie severe (1), in particolare alla sindrome chilomicronemica familiare (in inglese *familial chylomicronaemia syndrome* - FCS).

La sindrome chilomicronemica primaria

L'FCS è una rara malattia monogenica a trasmissione autosomica recessiva del me-

tabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRLs), caratterizzata da grave ipertrigliceridemia (HTG), con presenza di chilomicroni a digiuno e livelli di trigliceridi (TG) superiori a 885 mg/dL, e associata ad un aumentato rischio di episodi ricorrenti di pancreatite potenzialmente fatale. Nei soggetti affetti da questa patologia, i chilomicroni prodotti dagli enterociti dopo un pasto, anziché essere fisiologicamente eliminati dopo circa 4 ore, tendono ad accumularsi in circolo (chilomicronemia). Ciò è dovuto ad una mancata/ridotta funzionalità della lipasi lipoproteica (LPL), enzima situato sulla superficie endoteliale del tessuto adiposo e muscolare e deputato all'idrolisi dei TG presenti nelle TRLs nel plasma (4). Questa condizione è dovuta principalmente a mutazioni *loss-of-function* in omozigosi o eterozigosi composta nel gene che codifica per LPL (circa nel 90% dei casi) o nei geni di alcuni dei suoi modulatori, cioè fattori interagenti implicati nella lipolisi.

Le due forme familiari di chilomicronemia maggiormente conosciute e studiate sono causate da mutazioni a carico di uno dei due geni seguenti:

- gene della lipoprotein lipasi (*LPL*), con conseguente deficit della normale funzione dell'enzima LPL, deputato al catabolismo ed alla rimozione dei trigliceridi provenienti dalle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) e dai chilomicroni;
- gene dell'apolipoproteina C2 (*APOC2*), con conseguente alterazione di apoC2, attivatore di LPL.

Recentemente, sono stati identificati anche casi di ipertrigliceridemia severa a trasmissione autosomica recessiva causati da mutazioni in altri geni che codificano per fattori coinvolti nel catabolismo delle TRLs: *APOA5* (codificante per l'apolipoproteina A5, un modulatore della funzione di LPL in grado di stabilizzare il complesso lipopro-

teina-enzima), *GPIHBP1* (codificante per la proteina *glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored high-density lipoprotein binding protein 1*, che stabilizza il legame di LPL ai chilomicroni, creando una piattaforma molecolare per la lipolisi) e *LMF1* (codificante per il fattore di maturazione della lipasi 1, coinvolto nella produzione intracellulare della forma matura di LPL) (4). Inoltre, mutazioni nel gene *CREB3L3* sono responsabili di rari casi di ipertrigliceridemia severa dominante.

Una diagnosi di FCS è tuttavia presente solo in circa l'1-2% dei soggetti affetti da ipertrigliceridemia, mentre più comune risulta essere la sindrome chilomicronemica multifattoriale (in inglese, *multifactorial chylomicroneamia syndrome* - MCS) (5). La MCS può essere dovuta a una suscettibilità poligenica, alla presenza di mutazioni in forma eterozigote in uno dei geni che nello stato omozigote causerebbero FCS, o alla presenza di fattori secondari non genetici, tra cui comorbidità note per causare un aumento dei livelli di TG plasmatici (tra cui diabete non controllato e ipotiroidismo), fattori ambientali (come abuso di alcol e cattiva alimentazione) e alcuni trattamenti farmacologici (come estrogeni, glucocorticoidi, farmaci neurolettici) (6).

Manifestazioni cliniche e diagnosi

Le manifestazioni cliniche di FCS, che si possono presentare fin dalla giovane età, includono sintomi gastrointestinali, come la comparsa di dolore addominale ricorrente, oppure più gravi episodi di pancreatite acuta. In aggiunta, altri sintomi caratteristici di FCS sono la presenza di plasma lattescente, xantomi eruttivi, *lipemia retinalis* ed epatosplenomegalia, a cui si possono aggiungere sintomi neurologici come irritabilità, alterazioni della memoria e depressione (7).

Nella pratica clinica, tuttavia, questo raro fenotipo FCS può essere facilmente confuso con il più diffuso fenotipo MCS, con un ritardo nella diagnosi di FCS purtroppo successivo solo allo sviluppo di pancreatite acuta. La ricerca di mutazioni a carico dei geni coinvolti risulta quindi cruciale per identificare le basi genetiche della malattia. Sono presenti tuttavia alcune differenze tra queste due forme di sindrome chilomicronemica, che sono state prese in considerazione da un gruppo di esperti a livello internazionale per la creazione di uno score diagnostico che potesse essere utile per discriminare tra FCS e MCS (8).

FCS e MCS si possono differenziare, ad esempio, per i valori di TG che risultano essere molto elevati (>885 mg/dL) per diverse settimane o mesi nel primo caso, mentre hanno una maggiore variabilità e risultano più sensibili alle modifiche dietetiche e/o alla terapia nei soggetti con MCS. In aggiunta al fenotipo lipidico, anche alcune caratteristiche cliniche supportano la diagnosi di FCS, piuttosto che la più comune MCS: la FCS si manifesta in pazienti più giovani, principalmente senza fattori secondari, ad eccezione della gravidanza e dell'uso di estrogeni orali contraccettivi, mentre la MCS si presenta tipicamente in pazienti adulti in sovrappeso con sindrome metabolica. Inoltre, la presenza di pancreatite acuta è più frequente nell'FCS rispetto alla MCS a causa della risposta parziale a un basso contenuto di grassi dieta e a concentrazioni plasmatiche più elevate di TG.

Studio LIPIGEN e ipertrigliceridemie severe

All'interno dello Network LIPIGEN, il comitato scientifico ha elaborato, sulla base dell'esperienza clinica sul territorio italiano, uno score utilizzabile nei soggetti

adulti e in grado di discriminare FCS o MCS dalle altre forme di dislipidemie. Questo score consiste in un sistema a punti che tiene in considerazione la storia clinica del soggetto e le principali manifestazioni di queste patologie, assegnando a ciascuna voce un relativo punteggio, come riportato in *Tabella 1*.

Sulla base dei valori plasmatici di trigliceridi possono venire assegnati da 4 a 8 punti, prevedendo invece la sottrazione di 2 punti nel caso di precedenti valori di TG <200 mg/dL. A questi, vanno poi sommati i punteggi relativi all'eventuale assenza di

risposta alla terapia con fibrati e omega-3 (+2), alla presenza di manifestazioni eruttive cutanee (+2), *lipemia retinalis* (+2), epatosplenomegalia (+2), storia di dolore addominale ricorrente (+3) o pancreatite (+4).

Un punteggio totale inferiore a 6 indica una diagnosi improbabile di FCS o MCS, un punteggio compreso tra 6 e 7 una diagnosi probabile di FCS/MCS e un punteggio maggiore o uguale a 8 una diagnosi definita di FCS. Per i soggetti con diagnosi probabile o definita, è consigliata l'esecuzione del test genetico al fine di identificare l'eventuale presenza di mutazioni a carico dei geni coinvolti nella patologia.

Tabella 1 - Score per la diagnosi di FCS/MCS costruito per pazienti italiani adulti.

Storia clinica	Punti
Paziente con trigliceridi >1000 mg/dL Da un periodo di tempo maggiore di 20 anni	Si = 7 Si = 8
Paziente con trigliceridi >1000 mg/dL entro i primi 3 anni di età	Si = 8
Paziente con trigliceridi >500 mg/dL in gravidanza	Si = 7
Paziente con trigliceridi tra 500 e 1000 mg/dL	Si = 4
Paziente con precedente valore di trigliceridi <200 mg/dL	Si = -2
Assenza di risposta alla terapia (fibrati ed omega-3)	Si = 2
Paziente con manifestazioni eruttive cutanee	Si = 2
Paziente con <i>Lipemia retinalis</i>	Si = 2
Paziente con storia di dolore addominale ricorrente	Si = 3
Paziente con pancreatite	Si = 4
Paziente con epatosplenomegalia	Si = 2
Punteggio totale	_____
Diagnosi	
<input type="checkbox"/> FCS/MCS improbabile	(<6)
<input type="checkbox"/> FCS/MCS probabile	(6-7)
<input type="checkbox"/> FCS definita	(≥8)

Conclusioni e prospettive

Così come da anni avviene per l'ipercolesterolemia familiare, nel contesto dello studio LIPIGEN dall'autunno 2020 sarà disponibile una sezione *ad hoc* per la raccolta di informazioni riferite ai soggetti con sospetto di FCS/MCS, rappresentando il primo step verso l'apertura del registro alle altre forme di dislipidemie familiari. Ciò permetterà di identificare anche i soggetti affetti da queste tipologie di ipertrigliceridemie severe sul territorio italiano mediante l'utilizzo di protocolli condivisi, validare il sospetto diagnostico e inviare il campione ai laboratori specializzati per l'analisi genetica solo laddove ci sia un forte probabilità di origine monogenica della patologia. L'analisi dei dati raccolti permetterà di effettuare la stima della prevalenza, dell'incidenza delle forme rare di dislipidemie genetiche e l'identificazione di eventuali clusters e/o sottopopolazioni a rischio; da questi risultati si potranno derivare priorità sia per intraprendere interventi sanitari mirati sia per indirizzare studi riguardanti la eziopatogenesi e l'identificazione di fattori che possono condizionare la prognosi di specifiche forme rare.

RIASSUNTO

Le dislipidemie genetiche sono un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate da alterazioni di alcune frazioni lipidiche, per la presenza di mutazioni in diversi geni che codificano per proteine coinvolte nella sintesi, trasporto e metabolismo delle lipoproteine plasmatiche. Per promuoverne e facilitarne la diagnosi clinica e genetica, nel 2012 la Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi, attraverso la sua Fondazione, ha avviato lo studio LIPIGEN, inizialmente focalizzato sulla forma più comune di queste dislipidemie, rappresentata dall'ipercolesterolemia familiare. Visti però i recenti ed importanti progressi nell'ambito delle malattie rare del metabolismo lipidico, si è ritenuto opportuno estendere il registro LIPIGEN anche alle ipertrigliceridemie severe, in particolare alla sindrome chilomicronemica familiare (FCS). L'FCS è una rara malattia monogenica a trasmissione autosomica recessiva del metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRLs), caratterizzata da grave ipertrigliceridemia (HTG), con presenza di chilomicroni a digiuno e livelli di trigliceridi (TG) superiori a 885 mg/dL, e associata ad un aumentato rischio di episodi ricorrenti di pancreatite potenzialmente fatale. Una diagnosi di FCS è tuttavia presente solo in circa l'1-2% dei soggetti affetti da ipertrigliceridemia, mentre più comune risulta essere la sindrome chilomicronemica multifattoriale (MCS). Sulla base dell'esperienza clinica sul territorio italiano, il comitato scientifico LIPIGEN ha elaborato uno score utilizzabile nei soggetti adulti e in grado di discriminare FCS o MCS dalle altre forme di dislipidemie, che consiste in un sistema a punti che tiene in considerazione la storia clinica del soggetto e le principali manifestazioni di queste patologie, assegnando a ciascuna voce un relativo punteggio. Dall'autunno 2020, all'interno del registro LIPIGEN sarà quindi disponibile una sezione *ad hoc* per la raccolta di informazioni riferite ai soggetti con sospetto di FCS/MCS, rappresentando il primo step verso l'apertura della raccolta dati alle altre forme di dislipidemie familiari.

Parole chiave: *Dislipidemie genetiche, Registro di patologia, Sindrome chilomicronemica, Ipertrigliceridemie severe.*

Bibliografia

1. Hegele RA, Borén J, Ginsberg HN, et al. Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: a European Atherosclerosis Society task force consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020; 8: 50-67.
2. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 2013; 34: 3478-90a.
3. Averna M, Cefalù AB, Casula M, et al. Familial hypercholesterolemia: The Italian Atherosclerosis Society Network (LIPIGEN). *Atherosclerosis.* 2017; 29: 11-16.
4. Brahm AJ, Hegele RA. Chylomicronaemia-current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11: 352-362.
5. Dron JS, Wang J, Cao H, et al. Severe hypertriglyceridemia is primarily polygenic. *J Clin Lipidol.* 2019; 13: 80-88.
6. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2: 655-666.
7. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ.* 2007; 176: 1113-1120.
8. Moulin P, Dufour R, Averna M, et al. Identification and diagnosis of patients with familial chylomicronaemia syndrome (FCS): Expert panel recommendations and proposal of an "FCS score". *Atherosclerosis.* 2018; 275: 265-272.

MECCANISMI DI MALATTIA

LONG NON-CODING RNA E ATEROSCLEROSI

Long non-coding RNAs and atherosclerosis

**BIANCA PAPOTTI, CINZIA MARCHI, MARCELLA PALUMBO,
FRANCO BERNINI, NICOLETTA RONDA**

Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma

SUMMARY

The recent discovery that only about 1-2% of the human genome encodes proteins has paved the way, thanks to the development of sequencing technologies, to the identification of non-coding transcripts, starting a new era in RNA biology. Among non-coding transcripts, long non-coding RNAs (lncRNAs) represent a heterogeneous group of non-protein-coding RNA, although the molecular mechanisms by which lncRNAs control gene expression and cell signalling pathways are still under investigation. Recently findings highlighted the potential regulatory function of some lncRNAs in various processes related to atherosclerosis, such as endothelial dysfunction, vascular damage, immune response and lipid metabolism. For example, some lncRNAs have been implicated in endothelial dysfunction by regulating endothelial cell proliferation and migration (H19, MALAT1) or angiogenesis (MANTIS, MEG3). Other lncRNAs have been involved in modulating vascular smooth muscle cells proliferation, differentiation and vascular remodeling (e.g. ANRIL, linc-p21, MYOSLID, SENCER, SMILR). Finally, further lncRNAs are involved in immune response and inflammation (linc00305, lincRNA-Cox2, THRIL), while others regulate macrophages polarization (GAS5) and lipid metabolism (LeXis, LncHR1, ApoA4-AS). The objective of the present review is to recapitulate recent developments on the expression, function and mechanism of action of lncRNAs implicated in atherosclerosis, obtained from animal models and in humans. The knowledge of the biological activity of the lncRNAs involved in the pathogenesis and progression of the atherosclerotic lesion could be crucial not only for the identification of novel biomarkers related to atherosclerosis but also to find out innovative therapeutic targets.

Key words: *LncRNA; Non-coding RNAs; RNA biology; Atherosclerosis; Vascular biology.*

Introduzione

La porzione non codificante del genoma rappresenta un campo di indagine estremamente complesso e solo in parte cono-

sciuto. Già dalla metà del secolo scorso, infatti, era noto che solo una piccolissima porzione dell'intero genoma umano viene trascritta in RNA messaggero, poi tradotto in proteine, e che determinate porzioni genomiche sono trascritte in RNA con funzione non codificante, ma strutturale o funzionale, quali RNA ribosomiale e RNA transfer. Solo recentemente, grazie a progetti di sequenziamento di RNA su larga scala, sono stati identificati centinaia di

Indirizzo per la corrispondenza

Cinzia Marchi
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
e del Farmaco, Università di Parma
E-mail: cinzia.marchi2@studenti.unipr.it

RNA non codificanti (non-coding RNAs - ncRNAs), suggerendo che solo l'1-2% dei trascritti codifica per proteine (1). La maggior parte dei ncRNA per i quali è nota l'attività biologica è rappresentata dai long non-coding RNAs (lncRNAs). Si tratta di una famiglia di RNA estremamente eterogenea e ancora scarsamente caratterizzata, i cui componenti hanno più di 200 nucleotidi e una complessa struttura secondaria. I lncRNA hanno alcune caratteristiche simili agli mRNA codificanti: vengono, infatti, trascritti dalla RNA polimerasi II e presentano il rivestimento sull'estremità 5', mentre l'estremità 3' è poliadenilata; inoltre, in seguito a trascrizione, lo splicing permette la formazione di diversi lncRNA maturi. A seconda della localizzazione genomica, i lncRNA vengono classificati in lncRNA senso, antisenso, intronici, intergenici ed enhancers (2).

La maggior parte degli lncRNA ad oggi noti ha una sequenza scarsamente conservata, a differenza di trascritti codificanti che, invece, sono caratterizzati da un elevato livello di conservazione (3). L'espressione dei lncRNA è specifica per la tipologia cellulare e per lo stadio di sviluppo, svolgendo un ruolo chiave nella regolazione di svariate funzioni cellulari. I lncRNA, grazie alla particolare stabilità che li caratterizza, sono considerati potenti regolatori di diversi processi biologici, la cui funzione è differente a seconda della loro localizzazione cellulare. I lncRNA localizzati nel nucleo sono infatti responsabili di una fine regolazione del processo trascrizionale. Sono in grado, ad esempio, di sequestrare fattori di trascrizione (TFs) o di guidarli verso il sito di attivazione trascrizionale. Inoltre, i lncRNA nucleari guidano i complessi di rimodellamento della cromatina nelle porzioni cromosomiche corrette, inducendo modificazioni istoniche o fungendo da RNA enhancer (eRNA). Infine, spe-

Elenco degli argomenti trattati

- Biologia dei lncRNA
- LncRNA e disfunzione endoteliale
- LncRNA e danno vascolare
- LncRNA nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico
- LncRNAs come biomarcatori e target terapeutici

cifici lncRNA nucleari sono in grado di promuovere il trasporto nucleocitoplasmatico di determinati fattori di trascrizione e di regolare lo splicing alternativo dei pre-mRNA. Al contrario, i lncRNA localizzati nel citoplasma agiscono regolando la stabilità degli mRNA e interferendo con i processi traduzionali, fungendo da scaffold per svariati complessi proteici. Altre funzioni regolatorie dei lncRNA citoplasmatici includono la stabilizzazione dei complessi ribonucleoproteici (RNP), la fosforilazione e l'attivazione di vie di segnale intracellulari. Inoltre, determinati lncRNA, in seguito a splicing, possono diventare circolari (circular lncRNAs) e sequestrare miRNA o regolare la maturazione del RNA ribosomiale (4). Infine, alcuni lncRNA sono rilasciati in esosomi o microvescicole e sembrano essere coinvolti nella comunicazione intercellulare (5) (*Figura 1*).

Ad oggi, solo circa 200 lncRNA identificati nell'uomo sono stati caratterizzati dal punto di vista funzionale. Inoltre, il numero dei lncRNA identificati continua ad aumentare e, sulla base di quanto previsto dalla banca dati NONCODE (<http://www.noncode.org/>), si stima che nel genoma umano potrebbero essere presenti più di 100.000 geni codificanti per lncRNA.

Le prime osservazioni a suggerire una potenziale funzione regolatrice dei lncRNA nell'aterosclerosi derivano da studi di Ge-

nome Wild Association Studies (GWAS) e RNA sequencing. Pur essendo un ambito solo parzialmente esplorato, le prime evidenze sperimentali hanno messo in luce una potenziale funzione regolatoria di alcuni lncRNA in svariati processi correlati all'aterosclerosi, quali la disfunzione endoteliale, il danno vascolare, la risposta im-

munitaria ed il metabolismo lipidico (*Figura 2*). La conoscenza dell'attività biologica dei lncRNA implicati nella patogenesi e progressione della lesione aterosclerotica potrebbe quindi rivelarsi fondamentale per l'identificazione di biomarcatori legati alla patologia, oltre che per individuare nuovi bersagli terapeutici.

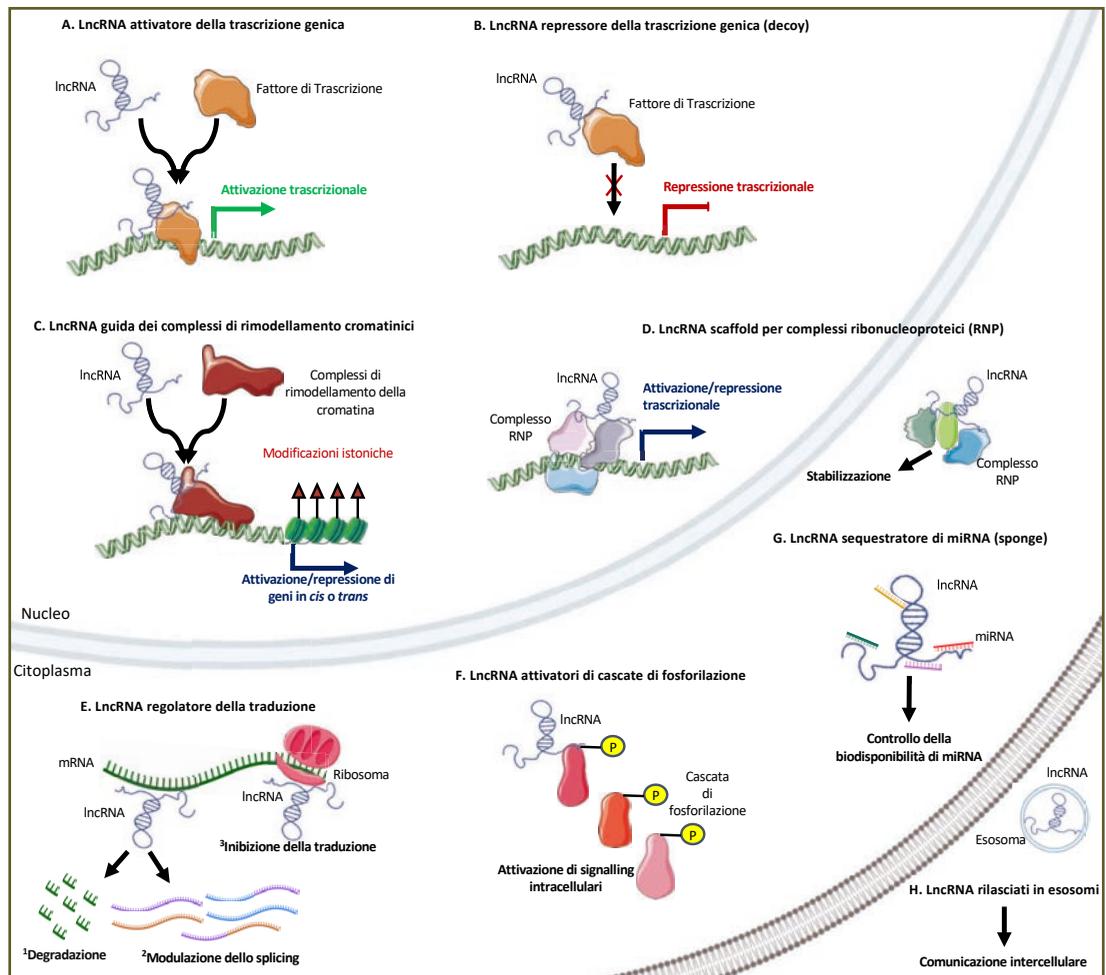


Figura 1 - Funzioni cellulari dei lncRNA. **A.** Reclutamento di fattori di trascrizione (TFs) verso la sequenza genica del promotore e attivazione della trascrizione genica; **B.** Sequestro di fattori di trascrizione e repressione della trascrizione genica; **C.** Guida di complessi di rimodellamento della cromatina e induzione di modificazioni istoniche con conseguente attivazione o repressione trascrizionale; **D.** Stabilizzazione di complessi ribonucleoproteici nucleari o citoplasmatici; **E.** Regolazione della traduzione di mRNA tramite la degradazione, splicing o inibizione del processo traduzionale; **F.** Regolazione della fosforilazione di proteine e attivazione di pathways intracellulari; **G.** Sequestro di miRNA e controllo della loro biodisponibilità; **H.** Rilascio in esosomi e partecipazione alla comunicazione intercellulare.

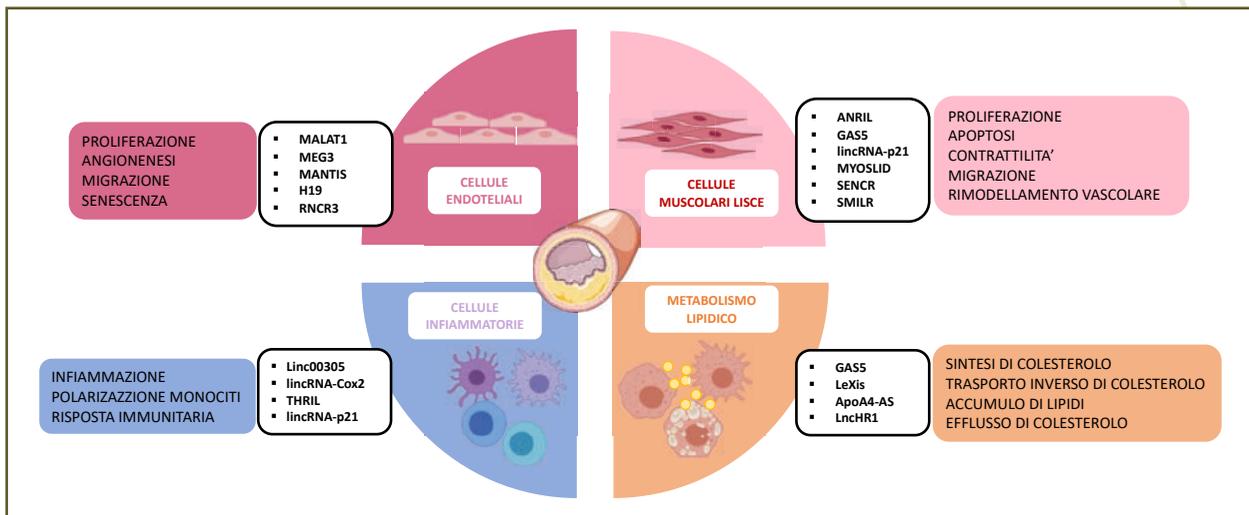


Figura 2 - *LncRNA implicati nell'aterosclerosi*. Focus sui principali lncRNA coinvolti nella disfunzione endoteliale, nel danno vascolare, nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico.

LncRNA e disfunzione endoteliale

La disfunzione endoteliale è presente in varie condizioni infiammatorie sia acute che croniche. L'attivazione endoteliale è tra i primi processi coinvolti nella genesi della lesione aterosclerotica, in risposta sia a stimoli biochimici (come IL-1 β , LDL modificate) che biomeccanici (alterazione del flusso sanguigno). Conseguentemente, l'espressione di molecole di adesione (come VCAM-1 e E-Selectina), così come la secrezione di chemochine (MCP-1) facilitano il reclutamento di sottopopolazioni leucocitarie nella parete del vaso. La disfunzione endoteliale cronica può portare alla perdita di integrità dell'endotelio che predispone all'infiammazione vascolare e all'aterosclerosi (6). In questo contesto, studi recenti hanno evidenziato un potenziale ruolo emergente per i lncRNA nella regolazione della disfunzione endoteliale (Tabella 1).

MALAT1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), identificato per la prima volta come biomarcatore nell'adenocarcinoma polmonare associato

a metastasi, sarebbe implicato nello sviluppo di diverse neoplasie. Tuttavia, esso è marcatamente espresso anche nelle cellule endoteliali normali (ECs) sia nella macro che nella microvascolatura. Il silenziamento di MALAT1 porta a una riduzione della proliferazione delle ECs, inibendo la progressione del ciclo cellulare, attraverso la riduzione del numero di cellule in fase S e la diminuzione di alcune cicline di fase S come CCNB1, CCNB2 e CCNA2, mentre aumenta l'espressione dei geni inibitori del ciclo cellulare come p21 e p27Kip1 (7).

In vivo, i topi Malat1^{-/-} hanno mostrato una significativa riduzione della vascolarizzazione della retina neonatale causata da un'alterata proliferazione delle cellule endoteliali. La funzione pro-proliferativa e pro-angiogenica di MALAT1 è stata confermata da ulteriori studi che dimostrano che il silenziamento di MALAT1 può migliorare la retinopatia diabetica (8, 9). Il silenziamento di MALAT1 ha anche ridotto i livelli di p38 fosforilata nelle ECs retiniche e l'up-regolazione indotta dal glucosio di IL-6 e TNF α attraverso l'attivazione di SAA3

Tabella I - Principali lncRNA implicati nella disfunzione endoteliale e meccanismo d'azione.

lncRNA	Modelli sperimentali	Localizzazione subcellulare	Effetti cellulari	Meccanismi d'azione	Ref.
H19	Uomo ECs VSMCs	Nucleare Citoplasmatico	Fattore di rischio indipendente per CAD; aumento della proliferazione e diminuzione dell'apoptosi	Host gene per il miR-675; attivazione delle vie di segnale di p38-MAPK e NF- κ B	(17-21)
MALAT1	ECs Topo	Nucleare	Controllo della proliferazione e del ciclo cellulare delle ECs; inibizione dell'apoptosi; protezione dell'endotelio dalla disfunzione indotta da ox-LDL; controllo dell'omeostasi vascolare nei ratti diabetici e nei topi sottoposti a ischemia degli arti posteriori	Sequestrante per il miR-22-3p; controllo della fosforilazione di p38 e AKT e delle loro vie di segnale	(7-12)
MANTIS	ECs	Nucleare	Controllo della migrazione delle ECs, dell'angiogenesi e della formazione di nuovi vasi	Interazione con Brg1 e controllo su SMAD6, COUP-TFII e SOX18	(16)
MEG3	ECs Topo	Nucleare	Controllo della vascolarizzazione, angiogenesi, proliferazione delle ECs e senescenza	Sequestrante per il miR-9; attivazione della via di segnale PI3K/AKT	(13-15)
RNCR3	ECs VSMCs Topo	Nucleare Esosomiale	Proaterogeno: controllo della proliferazione e della migrazione delle ECs	ceRNA per il miR-185 e de-repressione di KLF2	(22-23)

ECs: cellule endoteliali; VSMCs: cellule muscolari lisce vascolari; CAD: malattia coronarica; oxLDL: LDL ossidate; ceRNA: RNA competitore endogeno.

nelle ECs (8). In un altro studio, a seguito della deprivazione di ossigeno e glucosio e successiva riossigenazione nelle ECs microvascolari cerebrali, la mancanza di MALAT1 ha ridotto l'attività di PI3K e l'attivazione della fosforilazione di AKT e ha aumentato l'apoptosi cellulare e l'attività della caspasi 3, suggerendo un potenziale ruolo di MALAT1 nell'ischemia cerebrale da riperfusione (10). In linea con le osservazioni *in vitro*, l'inibizione farmacologica di MALAT1 nei topi sottoposti a ischemia degli arti posteriori ha portato a una riduzione del recupero del flusso sanguigno e della densità capillare, confermando gli studi che descrivono come MALAT1 controlli la proliferazione delle ECs e l'angiogenesi *in vitro* e *in vivo* (7). Inoltre, MALAT1 è in grado di proteggere l'endotelio dal danno indotto dalle ox-LDL attraverso

la sovraespressione del miR-22-3p, target dei geni CXCR2 e AKT, agendo come un sequestrante di miRNA (11).

Mentre i meccanismi molecolari che mediano gli effetti angiogenici di MALAT1 non sono stati ancora chiariti, uno studio recente ha indicato che MALAT1 potrebbe agire come sequestrante endogeno per miR-26b, regolando l'autofagia e la sopravvivenza della ECs (12). Complessivamente, questi studi evidenziano il rilevante ruolo di MALAT1 nel regolare l'omeostasi delle EC, l'angiogenesi e l'infiammazione vascolare.

MEG3 (Maternally Expressed Gene 3) è un lncRNA inizialmente identificato come oncosoppressore, down-regolato in diversi tumori. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che MEG3 è significativamente sovraespresso durante l'invecchiamento delle cellule endoteliali.

Il silenziamento di questo lncRNA promuove l'angiogenesi, aumentando la riperfusione dopo ischemia degli arti posteriori nei topi anziani e ripristinando la funzione delle cellule endoteliali, compromessa nell'invecchiamento (13). Inoltre, topi deficienti per MEG3 hanno mostrato un'aumentata espressione di geni angiogenetici come VEGF (14). Il silenziamento di MEG3 *in vivo* peggiora la disfunzione dei vasi retinici, come indicato dall'aumento della perdita della microvascolatura, dalla grave degenerazione capillare e dall'infiammazione. Nelle ECs retiniche, il deficit di MEG3 porta ad aumento della proliferazione, migrazione e capacità di formazione di vasi attivando la via di segnale PI3K/AKT. Riguardo al meccanismo d'azione, MEG3 agisce come sequestrante di miRNA nelle ECs vascolari regolando negativamente miR-9, un attore chiave nell'angiogenesi e nella proliferazione (15).

MANTIS (lncRNA n342419) è un lncRNA a ridotta espressione nei pazienti con ipertensione arteriosa polmonare idiopatica (IPAH) e in un modello animale di ipertensione arteriosa polmonare (PAH). Al contrario, questo lncRNA è sovraespresso in ECs isolate da pazienti con glioblastoma umano e nelle carotidi in una specie di *Macaco* sottoposto a dieta antiaterogena (16). MANTIS è localizzato nel nucleo e la sua espressione è controllata dall'istone demetilasi JARID1B, per cui si pensa abbia una funzione regolatrice della cromatina. Il silenziamento funzionale di MANTIS attraverso vettori oligonucleotidici, o la delezione mediata da CRISPR/Cas9 inibisce la migrazione delle ECs, l'angiogenesi e la formazione di nuovi vasi *in vitro* e *in vivo* in topi cui erano somministrate cellule endoteliali di vene ombelicali (HUVEC). Relativamente al meccanismo, MANTIS interagisce anche con Brg1 e regola SMAD6,

COUP-TFII e SOX18, tutti implicati nella modulazione angiogenica.

Alcuni polimorfismi nell'lncRNA H19 sono stati inizialmente associati al rischio e alla severità della malattia aterosclerotica in una popolazione cinese (17). Studi recenti hanno dimostrato che i livelli plasmatici di H19 possono essere predittori indipendenti per la malattia aterosclerotica anche dopo correzione per i tradizionali fattori di rischio (18). Si è osservato che i livelli plasmatici di H19 sono significativamente maggiori in pazienti con aterosclerosi rispetto a volontari sani. È stata dimostrata la presenza di H19 nelle placche aterosclerotiche di topi deficienti per ApoE (19). La sovraespressione di H19 nelle HUVEC ne aumenta la proliferazione, mentre diminuisce l'apoptosi regolando le vie di segnale di p38-MAPK e NF-κB (19). Al contrario, l'inibizione di H19 riduce la crescita delle HUVEC, inducendone l'accumulo nella fase G1 del ciclo cellulare, aumentando l'espressione di p21 (CDKN1A) (20). Recentemente, è stato osservato che H19 ha un ruolo nella restenosi arteriosa, poiché è sovraespresso nella neointima delle arterie danneggiate (21). Siccome H19 è un host gene per miR-675, studi sui polimorfismi con guadagno di funzione hanno evidenziato che la sovraespressione di H19 aumenta il tasso di proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) interagendo con PTEN in modo dipendente da miR-675 (21). I futuri studi di silenziamento in modelli di malattia aterosclerotica saranno importanti per verificare il potenziale terapeutico del lncRNA H19.

L'RNA3 non codificante della retina (**RNCR3**), noto anche come **LINC00599**, è un lncRNA recentemente identificato e coinvolto nei processi patogenetici sia dell'aterosclerosi che del diabete mellito (22, 23). Aumentati livelli di RNCR3 sono

stati osservati nelle lesioni aterosclerotiche aortiche umane e murine. È stato osservato che la delezione di RNCR3 nei topi ApoE^{-/-} accelera lo sviluppo dell'aterosclerosi, aggravando l'ipercolesterolemia e la risposta infiammatoria (22).

Il silenziamento di RNCR3 ha anche ridotto la proliferazione e la migrazione, e accelerato l'apoptosi, delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce *in vitro*, suggerendo che l'inibizione di RNCR3 potrebbe compromettere la rigenerazione delle cellule endoteliali nelle arterie danneggiate (22).

Relativamente al meccanismo, è stato suggerito che RNCR3 agisce come un RNA competitore endogeno (ceRNA) modulando la concentrazione e le funzioni biologiche di alcuni miRNA. È stato osservato che RNCR3 comunica e co-regola il fattore 2 Kruppel-like (KLF2) competendo per l'associazione a miR-185-5p. Nella patologia aterosclerotica, l'RNCR3 è significativamente sovraregolato, diminuendo l'effetto repressivo di miR-185-5p, aumentando così il livello del gene bersaglio di miR-185-5p, KLF2. Questo circuito regolatorio mantiene un equilibrio nella funzione endoteliale come risposta allo stress proaterogenico.

LncRNA e danno vascolare

Il danno vascolare ricopre un ruolo di primaria importanza nell'infiammazione cronica tipica dell'aterosclerosi. Infatti, in risposta a un danno meccanico della parete muscolare, cellule endoteliali, piastrine e leucociti rilasciano svariati fattori di crescita (es: PDGF-BB, TGF- β 1), citochine (es: IL-1, IL-6, IL-8), chemochine (es: MCP-1), metalloproteasi (es: MMP-9) e mediatori pro-trombotici (es: trombina). Questi contribuiscono a stimolare la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMCs) nella tonaca media delle arterie,

formando una significativa componente nella neointima del vaso danneggiato, con conseguente riduzione del lume del vaso, stenosi o completa occlusione del vaso sanguigno. Recentemente, inoltre, è stato messo in luce come le VSMCs, in un contesto aterosclerotico, subiscano una transizione verso un fenotipo simil-macrofagico, con perdita dei marker tipici muscolari (24), tanto che fino al 50% delle cellule schiumose della placca sarebbe di origine muscolare liscia (25).

Un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali ha sottolineato il coinvolgimento dei lncRNA nella biologia delle VSMCs, mettendo in luce il loro ruolo nella fine regolazione dei processi aterogenici e come potenziali target terapeutici (Tabella 2).

ANRIL (antisense ncRNA in the INK4 locus) è un lncNA anti-senso localizzato nel locus INK4 sul cromosoma 9 (9p21.3), noto per essere correlato ad una elevata suscettibilità genetica per le patologie vascolari, inclusa l'aterosclerosi. ANRIL, in seguito a trascrizione, subisce splicing alternativo. Ad oggi ne sono note 21 isoforme, espresse in svariati tipi cellulari tra cui VSMCs, ECs e cellule immunitarie (26). La prima evidenza sperimentale di una correlazione tra elevati livelli di ANRIL e aterosclerosi è stata fornita da Holdt et al., che hanno evidenziato come l'espressione di due isoforme di ANRIL, EU741058 e NR_003529, risulti aumentata sia nelle placche aterosclerotiche carotidee, aortiche e femorali, sia in cellule mononucleari circolanti di soggetti con diagnosi di aterosclerosi rispetto a controlli sani (27). Infatti, diverse varianti di splicing di ANRIL sono responsabili di diversi effetti biologici. Il silenziamento degli esoni 1 o 19 in HAVSMCs (cellule muscolari lisce aortiche coronariche umane) interferisce con vari meccanismi patogenetici dell'atero-

sclerosi, inclusa la riduzione della vitalità cellulare e la proliferazione delle HAVSMCs (28). Per quanto riguarda il meccanismo, ANRIL agisce sul silenziamento epigenetico legandosi a CBX7 e SUZ12, componenti rispettivamente del Polycomb Repression Complex-1 (PRC-1) e -2 (PRC-2), inibendo il legame di PRC-1 e PRC-2 al locus INK4. Questo comporta una riduzione della tri-

metilazione della lisina 27 dell'istone H3, con conseguente riduzione della trascrizione di p15INK4b e p16INK4A e promozione della proliferazione cellulare (29). Recentemente, inoltre, è stata individuata una variante circolare di ANRIL (circANRIL), che sembra essere associata ad ateroprotezione. CircANRIL, infatti, si lega a PES1 (Pescadillo Ribosomal Biogenesis Factor

Tabella 2 - Principali lncRNA implicati nel danno vascolare e loro meccanismo d'azione.

lncRNA	Modello sperimentale	Localizzazione subcellulare	Effetti cellulari	Meccanismi d'azione	Ref.
ANRIL	HAVSMCs	Nucleare	Fattore di rischio indipendente per CAD: Controllo della proliferazione di HAVSMCs	Legame con CBX e SUZ2, componenti rispettivamente di PRC-1 e PRC-2	(26-29)
circANRIL	VSMCs	Non nota	Ateroprotezione: interferenza con la biogenesi ribosomiale, inibizione della proliferazione e induzione di apoptosi	Legame con PES1 e stimolazione dell'attivazione di p53	(30)
GAS5	VSMCs	Nucleare Citoplasmatica	Regolazione del rimodellamento vascolare; promozione della proliferazione e migrazione, riduzione del differenziamento	Regolazione dell'Annessina A2, riduzione dei livelli di miR-21 e aumento di PTEN	(34-37)
LincRNA-p21	VSMCs	Citoplasmatica	Promozione dell'apoptosi e riduzione della proliferazione	Legame con MDM2 e de-repressione di p53 e trascrizione dei geni target	(38)
MYOSLID	CASMCs	Citoplasmatica	Promuove il differenziamento di CASMCs e inibisce la proliferazione; promuove la formazione di fibre da stress	Inibizione la fosforilazione di SMAD2 indotta da TGF- β 1; modulazione della traslocazione nucleare di MLK1	(39)
SENCR	VSMCs	Citoplasmatica	Aumento della contrattilità, inibizione della migrazione	Regolazione della miocardina; diminuzione dell'espressione di FoxO1; aumento dell'espressione di TRPC6	(31-33)
SMILR	VSMCs	Nucleare Citoplasmatica	Regolazione della proliferazione	Riduzione dell'espressione di HAS2	(40)

HAVSMCs: cellule muscolari lisce aortiche umane; VSMCs: cellule muscolari lisce vascolari; CASMCs cellule muscolari lisce coronariche; CAD: malattia coronarica.

1), fondamentale per l'assemblaggio della subunità 60S dei ribosomi, interferendo con la biogenesi ribosomiale in VSMCs, con conseguente attivazione della proteina p53, riduzione della proliferazione e apoptosi cellulare (30). Questo suggerisce che ANRIL possa svolgere funzioni differenti a seconda dell'isoforma che si genera in seguito a splicing alternativo.

SENCR (smooth muscle and EC-enriched migration/differentiation-associated lncRNA) è stato uno dei primi lncRNA identificati nelle cellule muscolari lisce. Si tratta di un lncRNA trascritto antisenso rispetto alla porzione 5' del gene che codifica per il fattore di trascrizione FLI1 (11q24.3), presente sotto forma di 2 varianti localizzate prevalentemente nel citoplasma. La riduzione dell'espressione di SENCNCR in cellule HAVSMCs si associa a una ridotta espressione della miocardina (MYOCD), responsabile della regolazione di svariati geni codificanti per proteine contrattili, mentre l'espressione di geni pro-migratori è risultata aumentata, suggerendo che SENCNCR sia un inibitore della migrazione di VSMCs (31). In un ulteriore studio, Zou et al. hanno dimostrato che sia in VSMCs murine che in un modello *in vivo* di diabete di tipo 2, l'espressione di SENCNCR è risultata ridotta, con conseguente aumento dell'espressione del fattore di trascrizione Forkhead box O1 (FoxO1), fondamentale per la migrazione e proliferazione delle VSMCs. Inoltre, SENCNCR sembra essere coinvolto nell'aumento dell'espressione di TRPC6, probabilmente mediatore dell'influsso di Ca^{2+} , fondamentale per la contrattilità di VSMCs (32). Infine, in uno studio condotto su pazienti con diagnosi di diabete di tipo 2, è stata riscontrata una associazione tra i livelli di SENCNCR plasmatici e il rapporto tra la massa ventricolare sinistra e il volume telediastolico, marker di rimodellamento cardiaco (33). Queste evidenze

suggeriscono che SENCNCR può essere considerato un fattore di rischio indipendente per le complicanze vascolari riscontrate spesso in pazienti con diabete di tipo 2.

GAS5 (Growth arrest-specific 5) è un lncRNA coinvolto nella regolazione di diversi processi biologici quali apoptosi, proliferazione e differenziamento cellulare. Recentemente è stato dimostrato il suo coinvolgimento nel rimodellamento vascolare in un modello sperimentale di ipertensione nei ratti. Inoltre, il silenziamento *in vitro* di GAS5 modula il de-differenziamento in VSMCs aortiche umane, promuovendone quindi la proliferazione e la migrazione, e riducendo l'espressione di proteine contrattili quali α -SMA (α -smooth muscle actin) e calponina attraverso la regolazione della traslocazione nucleare della β -catenina (34). In un secondo studio, Li et al. hanno dimostrato che GAS5 regola la proliferazione e la migrazione in SMCs umane. GAS5 è legato dall'Annessina A2 in maniera Ca^{2+} dipendente, ma i meccanismi molecolari alla base di questa interazione rimangono ancora da chiarire (35). Inoltre, GAS5 si lega in modo competitivo con SMAD3, inibendone il legame con i promotori dei geni coinvolti nell'attività di TGF- β /SMAD3, riducendo quindi il differenziamento delle VSMCs (36). Infine, l'espressione di GAS5 è risultata ridotta in un modello sperimentale di fibrosi cardiaca mentre la sovraespressione di GAS5 inibisce la proliferazione dei fibroblasti cardiaci riducendo l'espressione di miR-21, regolando quindi indirettamente uno dei suoi target, PTEN. Questo suggerisce l'importanza di GAS5 nel rimodellamento cardiaco e vascolare (37).

LincRNA-p21 è un lncRNA rilevato in VSMCs la cui funzione biologica è legata alla patogenesi e alla progressione aterosclerotica. I livelli di lincRNA-p21 sono ridotti nelle placche aortiche di topi ApoE^{-/-} rispetto ai topi C57BL/6. Anche nell'uomo,

il tessuto arterioso prelevato da pazienti con malattia cardiovascolare presenta minor espressione di lincRNA-p21 rispetto a quello di pazienti controllo. LincRNA-p21 riduce la proliferazione e promuove l'apoptosi: il silenziamento *in vivo* di lincRNA-p21 è correlato ad una maggior incidenza di malattia coronarica e iperplasia neointimale. LincRNAp21 si lega a MDM2 (Mouse double minute 2), il principale inibitore della proteina p53, che risulta de-repressa e interagisce quindi con la proteina p300. Questa, a sua volta, promuove la trascrizione di geni che inducono apoptosi e inibiscono la proliferazione cellulare (38).

MYOSLID (Myocardin-induced Mmooth muscle LncRNA, Inducer of Differentiation) è un lincRNA identificato tramite RNAseq in VSMCs, nelle quali promuove il differenziamento e inibisce la proliferazione. Il silenziamento di MYOSLID, infatti, è correlato a una mancata fosforilazione di SMAD2 indotta da TGF- β 1, fondamentale per il processo di differenziamento. MYOSLID, inoltre, promuove il fenotipo contrattile: il suo silenziamento, infatti, riduce la formazione di fibre da stress e inibisce la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione di MRTFA (MYOCD-related transcription factor A) (39), capace di controllare l'espressione di geni coinvolti nella regolazione delle modificazioni del citoscheletro durante il differenziamento e migrazione cellulare.

SMILR (Smooth muscle-induced lncRNA enhanced replication) è stato identificato tramite RNAseq selettivamente in VSMCs umane. In seguito a stimolazione delle cellule con IL-1 α e PDGF furono rilevati elevati livelli nel nucleo, citoplasma e medium di coltura. SMILR è in grado di stimolare la proliferazione cellulare promuovendo l'espressione del gene adiacente HAS2 (hyaluronan synthase 2), coinvolto nella sintesi di acido ialuronico, i cui livelli

sono correlati ad una aumentata proliferazione delle VSMCs. In accordo con questa osservazione, il silenziamento di SMILR riduce significativamente la proliferazione delle VSMCs. Inoltre, l'espressione di SMILR è risultata aumentata sia nel plasma che nelle placche ateromasiche di pazienti con elevati livelli di proteina C reattiva e lesione aterosclerotica instabile rispetto a pazienti sani (40).

lincRNA nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico

Il genoma non codificante dell'RNA offre l'opportunità di identificare nuovi mediatori coinvolti sia nell'immunità innata che adattiva e nella progressione della malattia aterosclerotica. Le prime osservazioni che suggeriscono come i lincRNA possano essere importanti regolatori dell'aterosclerosi derivano dagli studi di GWAS, che mostrano una forte associazione di alcuni SNP nei geni non codificanti legati a pathways infiammatori e ad alterazioni del metabolismo lipidico, fortemente coinvolti nella patologia aterosclerotica (*Tabella 3*).

Tra i lincRNA collegati a processi infiammatori, è stato identificato **linc00305**, la cui espressione è significativamente aumentata nelle placche aterosclerotiche. Inoltre, linc00305 è presente in quantità più elevate nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMCs) di soggetti affetti da aterosclerosi rispetto a individui sani, e nella linea cellulare monocitica THP-1 rispetto alle ECs e VSMCs. L'espressione di linc00305 è indotta dalla stimolazione con lipopolisaccaride (LPS), ma rimane tutt'ora sconosciuto il meccanismo attraverso il quale linc00305 è coinvolto nella polarizzazione dei monociti. A seguito dello studio eseguito da Zhang et al. è emerso che linc00305 è coinvolto nell'induzione di numerosi pathways dell'infiammazione

Tabella 3: Principali lncRNA implicati nell'infiammazione e nel metabolismo lipidico, e loro meccanismo d'azione.

lncRNA	Modelli sperimentali	Localizzazione subcellulare	Effetti cellulari	Meccanismi d'azione	Ref.
ApoA4-As	Hepa 1-6	Citoplasmatica	Stabilizzazione dell'mRNA di ApoA4	Legame con la proteina HuR	(48)
Gas5	BMDM; THP-1	Nucleare	Riduzione del trasporto inverso di colesterolo; promozione dell'accumulo di lipidi intracellulari	Legame con EZH2 e inibizione dell'espressione di ABCA1	(47)
LeXis	Hepa 1-6	Nucleare	Regolazione della sintesi di colesterolo	Legame con RALY	(46)
Linc00305	PBMCs, THP-1	Nucleare	Promozione dell'attivazione e polarizzazione di monociti	Legame con LIMR e attivazione di NF-KB attraverso la via di segnale di AHRR	(41)
LincRNA-Cox2	THP-1, Cellule dendritiche, BMDM	Nucleare Citoplasmatica	Mediazione della risposta immunitaria; promozione dell'infiammazione nei macrofagi	Interazione con Mi-2/NuRD	(42-43)
LincRNA-p21	PBMCs	Citoplasmatica	Coinvolgimento nell'infiammazione cronica	Legame con mRNA di RelA e regolazione di NF-kB	(45)
LncHR1	PBMCs	Nucleare Citoplasmatica	Riduzione della sintesi degli acidi grassi	Inibizione della trascrizione di SREBP-1c	(49)
THRIL	THP-1	Nucleare	Controllo trascrizionale di TNF α : ruolo nel quadro clinico della Sindrome di Kawasaki	Formazione un complesso con hnRNPL	(44)

PBMCs: cellule mononucleari del sangue periferico; THP-1 linea cellulare monocitica umana; Hepa 1-6: linea cellulare di epatoma murino; BMDM: macrofagi derivati dal midollo osseo.

in modo NF- κ B- dipendente, anche se il meccanismo d'azione non è stato ancora del tutto chiarito. È stato inoltre osservato che linc00305 si lega al recettore LIMR (lipocalin-interacting membrane receptor), promuovendo la traslocazione nucleare di AHRR (aryl hydrocarbon receptor repressor) e determinando la trascrizione di geni coinvolti nel differenziamento dei linfociti T e nelle funzioni delle cellule presentanti l'antigene (APC). Queste osservazioni suggeriscono un potenziale ruolo di linc00305 nel processo infiammatorio coinvolto nella progressione dell'aterosclerosi, sebbene solo ulteriori studi permetteranno di defi-

nire con precisione i meccanismi molecolari (41).

LincRNA-Cox2 (long intergenic non-coding RNA lincRNA-Cox2) è stato individuato in prossimità del locus genico di Cox2 (42). LincRNA-Cox2 è considerato un lncRNA chiave per la regolazione della risposta immunitaria, dal momento che è emersa in diversi studi la sua capacità di mediare sia l'attivazione che la repressione di diverse classi di geni legate alla risposta immunitaria (42). È stato infatti dimostrato che lincRNA-Cox2, in cellule dendritiche e in macrofagi del midollo osseo (BMDM), viene trascritto a seguito dell'interazione

con LPS attraverso TLR7/8 (42). Il silenziamento di lincRNA-Cox2 aumenta in modo significativo l'espressione di geni pro-infiammatori come Irf7 e CCL5, mentre attenua l'espressione di TLR1 e IL-6 indotta da Pam3CSK4, un ligando di TLR2 (42).

Recentemente, è infine emerso che lincRNA-Cox2 modula la trascrizione del gene IL-12 β indotta da TNF α , attraverso l'interazione con Mi-2/NuRD (43).

THRIL (TNF α and hnRNPL-related immunoregulatory lncRNA) è stato identificato tramite microarray nella linea cellulare monocitica umana (THP-1) e successivamente in diversi tessuti umani. THRIL è necessario per l'espressione di molte citochine e geni coinvolti nella risposta immunitaria, tra i quali TNF α gioca un ruolo di primaria importanza (44). THRIL è infatti in grado di formare un complesso con hnRNPL, che a sua volta regola la trascrizione di TNF α legandosi al suo promotore e riducendone l'espressione. Dal punto di vista clinico, l'espressione di THRIL è stata correlata a un quadro clinico più severo in pazienti affetti da malattia di Kawasaki (44).

Il già citato **lincRNA-p21** è coinvolto anche nei processi infiammatori di alcune patologie croniche. È stato osservato infatti che i livelli di lincRNA-p21 sono ridotti in pazienti con artrite reumatoide rispetto ai livelli dei soggetti sani (45). Questi stessi pazienti manifestano inoltre elevati livelli di p65 fosforilata (RelA), un noto marker di attivazione di NF- κ B (45). Il trattamento di questi pazienti con metotressato (MTX) porta ad una riduzione dell'infiammazione tramite inibizione di NF- κ B, insieme ad un aumento dei livelli di lincRNA-p21 (45).

Tra i lncRNA coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico, il lncRNA **LeXis** (Liver-expressed LXR-induced sequence), identificato da Sallam et al., sem-

bra essere in grado di regolare la sintesi del colesterolo mediata da LXR. LeXis agisce attraverso il legame con RALY, una ribonucleoproteina eterogenea. RALY è associata ai promotori dei geni responsabili della biosintesi del colesterolo e manifesta una ridotta attività quando è in presenza di LeXis, che ne inibisce il legame con il DNA (46). A ulteriore conferma del ruolo di LeXis, la sua sovraespressione in un modello murino si associa ad una riduzione sostanziale della colesterolemia (46). Il locus del gene LeXis si trova nelle immediate vicinanze di uno dei principali geni regolati da LXR, ABCA1. Dall'analisi della cromatina di epatociti primari murini, è emerso che le due sequenze geniche appartengono a geni distinti con promotori separati e la loro espressione è indotta da LXR e dagli agonisti di RXR (46).

Il già citato **GAS5** (Growth Arrest-Specific 5) sembra essere coinvolto anche nella regolazione del metabolismo lipidico. Recentemente, Meng et al. hanno descritto un possibile coinvolgimento nel trasporto inverso di colesterolo e nell'accumulo lipidico intracellulare. GAS5 è infatti localizzato principalmente a livello nucleare ed è altamente espresso nella linea cellulare monocitica umana THP-1 (47), nella quale promuove l'accumulo di lipidi e inibisce l'efflusso di colesterolo. GAS5 infatti inibisce il trasportatore ABCA1, legandosi all'enhancer di Zeste Homolog 2 (EZH2). L'overespressione di EZH2 riduce l'efflusso di colesterolo e l'espressione di ABCA1, promuovendo la tripla metilazione della lisina 27 (H3K27) nella regione promotrice di ABCA1 (47). Il silenziamento di GAS5 *in vivo* rallenta la progressione dell'aterosclerosi in topi apoE^{-/-}, con una riduzione dei livelli di colesterolo totale, TG e LDL (47). Complessivamente, il silenziamento di GAS5 mediato dall'asse EZH2-ABCA1, può po-

tenzialmente promuovere il trasporto inverso del colesterolo e inibire l'accumulo di lipidi intracellulari, prevenendo la progressione dell'aterosclerosi.

ApoA4-AS è un lncRNA identificato per la prima volta nel fegato di topi obesi ob/ob, oltre che in campioni epatici di pazienti affetti da steatosi epatica (48). I livelli circolanti di ApoA4-AS sono stati correlati ai livelli plasmatici di HDL. ApoA4-AS stabilizza l'mRNA di ApoA4 interagendo direttamente con Hur, una proteina che lega l'RNA ed è in grado di controllare la stabilità di molti mRNA (48). *In vivo*, il silenziamento di ApoA4-AS non influisce sul contenuto epatico di trigliceridi (TG), dei quali riduce invece la concentrazione plasmatica, come per il colesterolo. Tuttavia, non è noto il meccanismo attraverso il quale ApoA4-AS regola la concentrazione dei lipidi circolanti. È stato ipotizzato che ApoA4-AS influenzi la secrezione delle VLDL, ma ulteriori studi dovranno chiarire il suo ruolo nel metabolismo lipidico (48).

LncHR1 (long non-coding RNA HCV regulated 1) è stato identificato nelle cellule di epatoma inoculate con il virus dell'epatite C. LncHR1 si colloca sia a livello nucleare che citoplasmatico e sopprime l'attività del promotore di SREBP-1c, responsabile della sintesi dei TG (49). La sovraespressione di LncHR1 attenua l'espressione di SREBP-1c e, conseguentemente, riduce la sintesi degli acidi grassi (FA) e promuove l'accumulo dei lipidi nelle cellule epatiche. Infatti, SREBP-1c regola numerosi enzimi coinvolti in vari passaggi della sintesi dei FA e dei TG, nei quali l'enzima sintasi degli acidi grassi (FAS) gioca un ruolo predominante (49). *In vivo*, topi transgenici sovraespressanti LncHR1 hanno mostrato una ridotta espressione epatica non solo di SREBP-1c, ma anche di FAS, Acetyl-CoA carboxylase α (ACC α), e una minore con-

centrazione epatica e plasmatica di TG a seguito di una dieta ad alto contenuto di grassi (49).

Prospettive future e conclusioni

I lncRNA sembrano svolgere un ruolo fondamentale nella regolazione di diversi processi biologici. Queste molecole, inizialmente considerate come trascritti "spazzatura", potrebbero in realtà costituire interessanti basi genetiche di alcune patologie, tra cui l'aterosclerosi. Dalle evidenze sempre crescenti emerge l'enorme potenzialità dei lncRNA sia come biomarcatori che come target terapeutici (50). Alcuni importanti aspetti, tuttavia, rimangono ancora da chiarire. In primo luogo, infatti, la precisa comprensione del meccanismo di interazione di ciascun lncRNA con RNA, DNA e proteine, in contesto fisiologico e nell'ambito dei processi patologici sarà fondamentale per chiarire la loro funzione biologica. In quest'ottica, metodiche innovative quali l'isolamento della cromatina su domini specifici tramite purificazione di RNA (dChIRP), la purificazione di RNA antisenso (RAP) e l'immunoprecipitazione di RNA (RIP) (51) sono di primaria importanza. La caratterizzazione funzionale degli lncRNA è ancora maggiormente complicata dall'enorme variabilità di ciascun trascritto dovuta a splicing alternativo e alla ridotta conservazione dei trascritti, la cui sequenza è generalmente primate-specifica. L'utilizzo di modelli sperimentali convenzionali, quali topi o ratti, potrebbe quindi non essere sufficiente per chiarire il potenziale traslazionale dei risultati ottenuti (3). Infine, l'espressione dei lncRNA è generalmente molto bassa se confrontata ai mRNA: questo profilo d'espressione rende necessario l'utilizzo di tecnologie estremamente sensibili per la loro rilevazione, quali RNA-sequencing e la tecnologia del microarray.

Ad oggi, la Food and Drug Administration ha regolamentato l'uso di alcune terapie a base di RNA nell'ambito cardiovascolare. Quindi, comprendere la funzione biologica dei lncRNA coinvolti nella patogenesi aterosclerotica potrebbe rivelarsi fondamentale nell'ottica di individuare nuovi bersagli terapeutici, sfruttando tecnologie di silenziamento genico, o per promuovere una determinata funzione biologica mancante in condizioni patologiche. Le tecnologie maggiormente utilizzate per silenziare o ridurre l'espressione genica sono rappresentate da oligonucleotidi antisense (ASO), come ad esempio Mipomersen, un ASO approvato per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare che, legandosi all'mRNA dell'apolipoproteina B, ne media la degradazione, LNA (locked nucleic acid), aptameri o shRNA/siRNA, come Inclisiran. Queste promettenti tecnologie di silenziamento genico hanno mostrato negli ultimi anni notevoli miglioramenti in termini di stabilità, tollerabilità, ridotta immunogenicità ed effetti off-target (52).

Al contrario, per aumentare l'espressione genica, i lncRNA possono essere veicolati da vettori virali, come i Lentivirus (il cui uso tuttavia comporta un rischio di immunogenicità a lungo termine), oppure da vettori non virali come le nanoparticelle polimeriche o lipidiche, per le quali vi sono grandi aspettative relativamente al loro utilizzo in studi clinici (53). Le principali difficoltà di questo approccio sono date dalla necessità di veicolare i lncRNA in modo tessuto-specifico e con un'elevata efficienza. Queste problematiche possono essere superate usando modifiche chimiche e/o nanoparticelle mirate a ligandi specifici, ad esempio sovraespressi dalle cellule vascolari in risposta a determinati stimoli. Infine, nuovi strumenti di editing genico come CRISPR possono essere usati con successo per manipolare l'espressione di lncRNA con conseguente perdita o

guadagno di funzione a grande specificità ed efficienza, almeno *in vitro*.

In conclusione, i lncRNA sono regolatori chiave nei processi biologici e patologici correlati all'aterosclerosi. Dato il crescente numero di lncRNA identificati nei mammiferi, le correlazioni con gli studi GWAS e i loro diversi meccanismi d'azione a livello del nucleo, del citoplasma o degli esosomi, saranno necessari ulteriori studi per chiarire in modo preciso le modalità di espressione dei lncRNA, la loro funzione e le reciproche interazioni. Infine, lo studio delle interazioni tra lncRNA, DNA, trascritti codificanti, non codificanti e proteine, permetterà di comprendere a fondo molti degli eventi biologici che prendono parte alla fine regolazione della biologia vascolare in condizioni fisiologiche e patologiche.

Glossario

- ASO:** antisense oligonucleotide
- BMDMs:** bone marrow derived macrophages
- CASMCs:** coronary artery smooth muscle cells
- ceRNA:** competing endogenous RNA
- circRNA:** circular RNA
- dCHIRP:** domain-specific chromatin isolation by RNA purification
- ECs:** endothelial cells
- eRNA:** RNA enhancer
- GWAS:** genome-wide association study
- HAVSMCs:** human aortic vascular smooth muscle cells
- HUVEC:** human umbilical vein endothelial cells
- LNA:** locked nucleic acid
- lncRNA:** long non-coding RNA
- miRNA:** microRNA
- mRNA:** messenger RNA
- ncRNA:** non-coding RNA
- PBMCs:** peripheral blood mononuclear cells
- RAP:** RNA antisense purification
- RIP:** RNA immunoprecipitation
- RNAseq:** RNA sequencing
- siRNA:** short/small interfering RNA or silencing RNA
- shRNA:** short hairpin RNA
- TF:** transcriptional factor
- VEGF:** vascular endothelial growth factor
- VSMCs:** vascular smooth muscle cells

Questionario di auto-apprendimento

1) Quali caratteristiche strutturali sono tipiche dei lncRNA?

- Struttura secondaria estremamente semplice.
- Struttura secondaria simile a quella dei mRNA.
- Non esiste nessuna differenza.

2) Qual è il meccanismo d'azione dei lncRNA?

- Regolano il processo trascrizionale, guidano i complessi di rimodellamento della cromatina nelle porzioni cromosomiche corrette, promuovono il trasporto nucleocitoplasmatico di determinati fattori di trascrizione e regolano lo splicing alternativo dei pre-mRNA.
- Regolano la stabilità degli mRNA, agiscono come scaffold per svariati complessi proteici, regolano la stabilizzazione dei complessi ribonucleoproteici (RNP), la fosforilazione e l'attivazione di pathway di segnale intracellulari, e se circolarizzano possono sequestrare miRNA o regolare la maturazione del RNA ribosomiale.
- Tutte le risposte precedenti.

3) In che compartimento subcellulare si localizzano i lncRNA?

- Nel nucleo e nel citoplasma.
- Nella membrana cellulare.
- Nel mitocondrio.

4) Quali sono i principali lncRNA coinvolti nella disfunzione endoteliale?

- ANRIL, SENCN, GAS5, lincRNA-p21, MYOSLID, SMILR.
- linc00305, lincRNA-Cox2, THRIL, lincRNA-p21, Lexis, ApoA4-AS, LncHR1.
- MALAT1, MEG3, MANTIS, H19, RNCR3.

5) Qual è il lncRNA implicato nella regolazione della sintesi del colesterolo?

- ApoA4-AS.
- Lexis.
- LncHR1.

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

RIASSUNTO

La recente scoperta che solo l'1-2% del genoma umano ha funzione codificante ha spianato la strada, grazie all'utilizzo di tecnologie di sequenziamento avanzate, all'identificazione di trascritti non codificanti, inaugurando una nuova era nella biologia degli RNA. Tra i trascritti non codificanti, i long non-coding RNAs (lncRNAs) rappresentano una classe di non-coding RNA estremamente eterogenea, sebbene i meccanismi molecolari attraverso i quali i lncRNA controllano l'espressione genica e i pathways di segnalazione sono ancora oggi oggetto di studio. Recenti evidenze sperimentali hanno evidenziato la potenziale funzione regolatoria di alcuni lncRNA in numerosi processi correlati all'aterosclerosi, quali la disfunzione endoteliale, il danno vascolare, la risposta immunitaria ed il metabolismo lipidico. Ad esempio, alcuni lncRNA sono coinvolti nella disfunzione endoteliale, regolando la proliferazione e migrazione (H19, MALAT1), e l'angiogenesi (MANTIS, MEG3). Altri lncRNA sono coinvolti nella modulazione della proliferazione e differenziamento di cellule muscolari lisce vascolari, oltre che nel rimodellamento vascolare (ANRIL, linc-p21, MYOSLID, SENCN, SMILR). Infine, alcuni lncRNA sono coinvolti nella risposta immunitaria e nei processi infiammatori (linc00305,

lincRNA-Cox2, THRIL), mentre altri regolano la polarizzazione macrofagica (GAS5) e il metabolismo lipidico (LeXis, LncHR1, ApoA4-AS). Questo lavoro ha lo scopo di analizzare espressione, funzione e meccanismo d'azione dei principali lincRNA ad oggi noti, che sembrano essere coinvolti nella patologia aterosclerotica. La conoscenza dell'attività biologica dei lincRNA che prendono parte alla patogenesi e progressione della lesione aterosclerotica potrebbe infatti rivelarsi cruciale non solo per identificare nuovi biomarcatori legati all'aterosclerosi, ma anche per identificare nuovi possibili bersagli terapeutici.

Parole chiave: *LncRNA; RNA non codificanti; Biologia degli RNA; Aterosclerosi; Biologia vascolare.*

Bibliografia

- Bhat SA, et al. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Non-coding RNA Res.* 2016; 1: 43-50.
- Kok FO, Baker AH. The function of long non-coding RNAs in vascular biology and disease. *Vascul. Pharmacol.* 2019; 114: 23-30.
- Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell.* 2011; 147: 1537-1550.
- Simion V, Haemmig S, Feinberg MW. LncRNAs in vascular biology and disease. *Vascul. Pharmacol.* 2019; 114: 145-156.
- Ahadi A, Brennan S, Kennedy PJ, Hutvagner G, Tran N. Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 1-14.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32: 2045-2051.
- Michalik KM, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ. Res.* 2014; 114: 1389-1397.
- Puthanveetil P, Chen S, Feng B, Gautam A, Chakrabarti S. Long non-coding RNA MALAT1 regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2015; 19: 1418-1425.
- Liu J-Y, et al. Pathogenic role of lincRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1506.
- Xin J-W, Jiang Y-G. Long noncoding RNA MALAT1 inhibits apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation in human brain microvascular endothelial cells. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13: 1225-1234.
- Tang Y, et al. The lincRNA MALAT1 protects the endothelium against ox-LDL-induced dysfunction via upregulating the expression of the miR-22-3p target genes CXCR2 and AKT. *FEBS Lett.* 2015; 589: 3189-3196.
- Li Z, Li J, Tang N. Long noncoding RNA Malat1 is a potent autophagy inducer protecting brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by sponging miR-26b and upregulating ULK2 expression. *Neuroscience.* 2017; 354: 1-10.
- Boon RA, et al. Long Noncoding RNA Meg3 Controls Endothelial Cell Aging and Function: Implications for Regenerative Angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016; 68: 2589-2591.
- Gordon FE, et al. Increased expression of angiogenic genes in the brains of mouse meg3-null embryos. *Endocrinology.* 2010; 151: 2443-2452.
- He C, et al. Long Noncoding RNA MEG3 Negatively Regulates Proliferation and Angiogenesis in Vascular Endothelial Cells. *DNA Cell Biol.* 2017; 36: 475-481.
- Leisegang MS, et al. Long Noncoding RNA MANTIS Facilitates Endothelial Angiogenic Function. *Circulation.* 2017; 136: 65-79.
- Gao W, et al. Association of polymorphisms in long non-coding RNA H19 with coronary artery disease risk in a Chinese population. *Mutat. Res.* 2015; 772: 15-22.
- Zhang Z, et al. Increased plasma levels of lincRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Sci. Rep.* 2017; 7: 7491.
- Pan J-X. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF- κ B signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2017; 21: 322-328.
- Voellenkle C, et al. Implication of Long noncoding RNAs in the endothelial cell response to hypoxia revealed by RNA-sequencing. *Sci. Rep.* 2016; 6: 24141.
- Lv J, et al. Long noncoding RNA H19-derived miR-675 aggravates restenosis by targeting PTEN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 497: 1154-1161.
- Shan K, et al. Role of long non-coding RNA-RNCR3 in atherosclerosis-related vascular dysfunction. *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2248.
- Shan K, Li C-P, Liu C, Liu X, Yan B. RNCR3: A regulator of diabetes mellitus-related retinal microvascular dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 482: 777-783.

24. Gomez D, Swiatlowska P, Owens GK. Epigenetic control of SMC identity and lineage memory HHS Public Access. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 2015; 35: 2508-2516.
25. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation.* 2014; 129: 1551-1559.
26. Hung J, Miscianinov V, Sluimer JC, Newby DE, Baker AH. Targeting Non-coding RNA in Vascular Biology and Disease. *Front. Physiol.* 2018; 9: 1-16.
27. Holdt LM, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 620-627.
28. Congrains A, et al. CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 419: 612-616.
29. Yap KL, et al. Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Mol. Cell.* 2010; 38: 662-674.
30. Holdt LM, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat. Commun.* 2016; 7.
31. Bell RD, et al. Identification and Initial Functional Characterization of a Human Vascular Cell Enriched Long Non-Coding RNA. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34: 11249-1259.
32. Zou Z qing, Xu J, Li L, Han Y. shan. Down-regulation of SENCER promotes smooth muscle cells proliferation and migration in db/db mice through up-regulation of FoxO1 and TRPC6. *Biomed. Pharmacother.* 2015; 74: 35-41.
33. De Gonzalo-Calvo D, et al. Circulating long-non coding RNAs as biomarkers of left ventricular diastolic function and remodelling in patients with well-controlled type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 1-12.
34. Wang YNZ, et al. Long noncoding RNA-GAS5. *Hypertension.* 2016; 68: 736-748.
35. Li L, et al. Low expression of lncRNA-GAS5 is implicated in human primary varicose great saphenous veins. *PLoS One.* 2015; 10: 1-16.
36. Tang R, Zhang G, Wang YC, Mei X, Chen SY. The long non-coding RNA GAS5 regulates transforming growth factor β (TGF- β)-induced smooth muscle cell differentiation via RNA Smad-binding elements. *J. Biol. Chem.* 2017; 292: 14270-14278.
37. Tao H, et al. LncRNA GAS5 controls cardiac fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-21 via PTEN/MMP-2 signaling pathway. *Toxicology.* 2017; 386: 11-18.
38. Wu G, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation.* 2014; 130: 1452-1465.
39. Zhao J, et al. MYOSLID is a novel serum response factor-dependent long noncoding RNA that amplifies the vascular smooth muscle differentiation program. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016; 36: 2088-2099.
40. Ballantyne MD, et al. Smooth muscle enriched long noncoding RNA (SMILR) regulates cell proliferation. *Circulation.* 2016; 133: 2050-2065.
41. Zhang DD, et al. Long noncoding RNA LINC00305 promotes inflammation by activating the AHRR-NF- κ B pathway in human monocytes. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1-12.
42. Carpenter S, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science.* 2013; 341: 789-792.
43. Tong Q, et al. LincRNA-Cox2 modulates TNF- α -induced transcription of Il12b gene in intestinal epithelial cells through regulation of Mi-2/NuRD-mediated epigenetic histone modifications. *FASEB J.* 2016; 30: 1187-1197.
44. Li Z, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 1002-1007.
45. Spurlock CF, Tossberg JT, Matlock BK, Olsen NJ, Aune TM. Methotrexate inhibits NF- κ B activity via lincRNA-p21 induction. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: 2947-2957.
46. Sallam T, et al. Feedback modulation of cholesterol metabolism by the lipid-responsive non-coding RNA LeXis. *Nature.* 2016; 534: 124-128.
47. Meng X-D, et al. Knockdown of GAS5 Inhibits Atherosclerosis Progression via Reducing EZH2-Mediated ABCA1 Transcription in ApoE(-/-) Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2020; 19: 84-96.
48. Qin W, et al. A long non-coding RNA, APOA4-AS, regulates APOA4 expression depending on HuR in mice. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: 6423-6433.
49. Li D, et al. Identification of a novel human long non-coding RNA that regulates hepatic lipid metabolism by inhibiting SREBP-1c. *Int. J. Biol. Sci.* 2017; 13: 349-357.
50. Hrdlickova B, et al. Human Disease-Associated Genetic Variation Impacts Large Intergenic Non-Coding RNA Expression. 2013; 9.
51. Haemmig S, Feinberg MW. HHS Public Access. 2018; 120: 620-623.
52. Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 2017; 35: 238-248.
53. Reichmut AM, Oberli MA. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther. Deliv.* 2016; 7: 319-334.

MECCANISMI DI MALATTIA

DISBIOSI INTESTINALE ED INFARTO DEL MIOCARDIO: NUOVI MECCANISMI DI ATEROSCLEROSI

Intestinal dysbiosis and myocardial infarction: new mechanisms of atherosclerosis

**ROBERTO CARNEVALE^{1,2}, VITTORIA CAMMISOTTO³,
CRISTINA NOCELLA⁴, FRANCESCO VIOLI⁴**

¹Dipartimento di Scienze e Biotecnologie Medico-Chirurgiche, Sapienza Università di Roma, Latina;

²Mediterranea, Cardiocentro, Napoli;

³Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica Paride Stefanini, Sapienza Università di Roma;

⁴Dipartimento di Scienze Cliniche, Internistiche, Anestesiologiche e Cardiovascolari,
Sapienza Università di Roma

SUMMARY

The human body is home to trillions of microorganisms that form an interactive ecosystem inside and outside the body. Most of the microbiota that colonizes the human body is found in the gastrointestinal tract, especially in the colon. The intestinal microbiota plays an important role in maintaining nutrition and the immune system, which in turn influences the susceptibility of the host and the response to certain pathological conditions. The imbalance in the intestinal microbiota, also known as intestinal dysbiosis, is associated with several pathological conditions including gastrointestinal disorders, asthma, allergies, central nervous system disorders, tumors and cardiovascular diseases. Cardiovascular disease is a major cause of death worldwide. Atherosclerosis is the key pathophysiological mechanism underlying the development of cardiovascular diseases and the intestinal microbiome influences all the risk factors that are components of atherosclerosis, both directly and indirectly, thus playing an important role, albeit little understood, in cardiovascular diseases. In this review, we outline the role of the intestinal microbiota in cardiovascular diseases and in particular in the atherosclerotic process and we address potential therapeutic interventions to modulate a possible dysbiosis.

Key words: *Intestinal microbiota, Atherosclerosis, Cardiovascular pathology, Intestinal dysbiosis.*

Indirizzo per la corrispondenza

Roberto Carnevale, PhD
Dipartimento di Scienze e Biotecnologie
Medico-Chirurgiche, Sapienza Università
di Roma, Latina
E-mail: roberto.carnevale@uniroma1.it

Introduzione

Antoine Van Leeuwenhoek, il padre della microbiologia, è stato il primo a confrontare la composizione del microbioma orale e del microbioma fecale grazie all'utilizzo dei primi microscopi artigianali, oltre 300

Elenco degli argomenti trattati

- Microbiota intestinale
- Meccanismi di aterosclerosi
- Metaboliti derivanti dal microbiota intestinale ed aterosclerosi
- Terapia per contrastare eventuale disbiosi/metaboliti del microbiota

anni fa. Le sue osservazioni hanno evidenziato le profonde differenze che ci sono tra i microbi all'interno del corpo, e che tali differenze possono avere un impatto sulla salute e sulle malattie. Oggi abbiamo nuovi strumenti per evidenziare queste differenze grazie alla moderna tecnologia di sequenziamento che permette di identificare non solo i taxa specifici, ma anche la composizione funzionale del nostro microbioma. Sebbene la nostra relazione con i microbi sia sempre stata riconosciuta, solo di recente stiamo cominciando ad apprezzare l'interdipendenza simbiotica soprattutto rispetto alle perturbazioni ambientali come la dieta, le tossine e persino i farmaci, nonché le malattie derivanti dal loro squilibrio. In questa rassegna, metteremo in evidenza i recenti progressi fatti nella comprensione del contributo del microbiota nella progressione della malattia aterosclerotica.

Microbiota intestinale

I primi studi che dimostrarono che gli agenti patogeni potessero contribuire all'aterosclerosi provengono da lavori effettuati oltre un secolo fa, sui conigli esposti ad agenti patogeni e che mostravano un aumentata lesione aterosclerotica. Questi risultati sono stati supportati da vari studi epidemiologici che hanno evidenziato l'associazione tra alcuni agenti patogeni come la *Chlamydia pneumoniae* o l'*Helico-*

bacter pylori e sviluppo dell'aterosclerosi (1). Successivi studi meccanicistici hanno evidenziato che, ad esempio, la *Chlamydia pneumoniae* è in grado di promuovere la formazione di cellule schiumose, il reclutamento dei leucociti e la progressione della lesione aterosclerotica, tutti processi tipici della patogenesi dell'aterosclerosi (2). Altri studi sono stati condotti su modelli animali trattati mediante gavage orale o infusione endovenosa di batteri quali *Porphyromonas gingivalis*. In questi animali si è osservata la presenza all'interno della placca aterosclerotica dei batteri che contribuivano all'aumento della lesione (3).

Più recentemente, i ricercatori stanno definendo il possibile ruolo di batteri provenienti da altri distretti dell'organismo come, ad esempio, dal microbiota intestinale.

Il microbiota intestinale è indispensabile per regolare il sistema immunitario dell'intestino e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi intestinale, ed è anche un mediatore chiave nel mantenimento delle funzioni metaboliche nei tessuti periferici tra cui fegato e pancreas.

Il microbiota intestinale è costituito da una serie di batteri che abitano nel tratto gastrointestinale producendo un ecosistema diversificato di circa 10^{14} microrganismi (Figura 1). La maggior parte del microbiota intestinale è composta da cinque phyla, ovvero *bacteroidetes*, *firmicutes*, *actinobacteria*, *proteobacteria* e *cerrucomicrobia*; i bacteroidetes e firmicutes rappresentano come abbondanza relativa più del 90% (4). L'omeostasi del microbiota intestinale è fondamentale per il mantenimento della salute umana e una disbiosi può contribuire allo sviluppo di varie malattie tra cui le malattie cardiovascolari, le malattie legate al fegato come la NAFLD e anche alcuni tipi di cancro.

È interessante notare che recenti studi hanno suggerito come la disbiosi intestina-

le possa contribuire allo sviluppo dell'aterosclerosi (5). Infatti, mediante l'analisi del genoma intestinale in pazienti con o senza aterosclerosi sintomatica, gli scienziati hanno scoperto che i pazienti con aterosclerosi avevano una differenza, sia nel tipo sia nella quantità di batteri intestinali rispetto ai controlli sani. Inoltre, è stato dimostrato che *Akkermansia muciniphila*, un batterio presente nel tubo digerente umano per il 3-5% della flora intestinale, esercita effetti protettivi contro l'aterosclerosi (6) e che i pazienti obesi hanno una percentuale di questo batterio minore rispetto ai soggetti sani. Questi dati, quindi, sembrano dimostrare che il microbiota intestinale possa giocare un ruolo importante nella progressione del processo aterosclerotico mediante la modulazione dell'infiammazione e la produzione di metaboliti microbici.

A supporto del ruolo del microbiota intestinale nella malattia aterosclerotica, è stata la scoperta che le placche aterosclerotiche contengono DNA batterico e che i taxa batterici osservati nelle placche aterosclerotiche erano presenti anche nell'intestino degli stessi individui. Queste osservazioni suggeriscono la possibilità che le comunità microbiche, in questi siti, possano essere una fonte di batteri nella placca e che possano interferire sulla stabilità della placca e sullo sviluppo della malattia cardiovascolare. Il sequenziamento metagenomico del microbiota delle feci ha rivelato, inoltre, che la composizione microbica è alterata nei pazienti con placche instabili rispetto a quelle stabili. In particolare, la placca instabile è associata a livelli fecali ridotti del genere *Roseburium*, un batterio in grado di produrre peptidoglicani, molecole pro-infiammatorie e una ridotta capacità di produrre molecole antinfiammatorie (5). Il microbioma intestinale dei pazienti aterosclerotici può quindi favorire l'infiam-

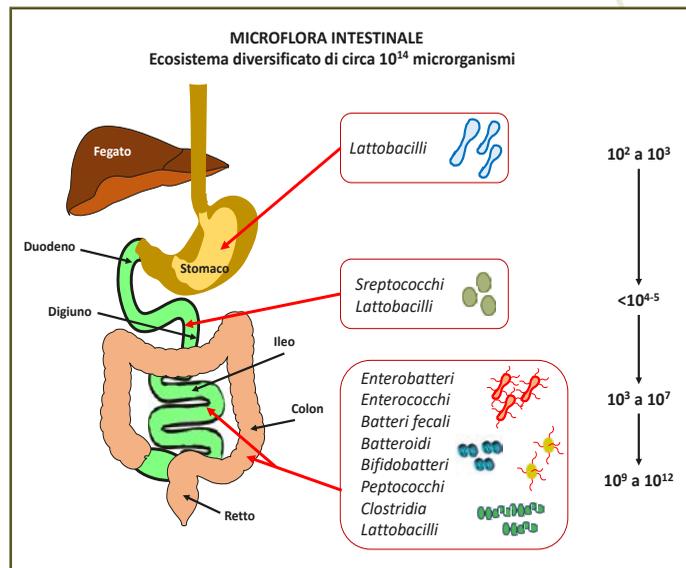


Figura 1 - Biodiversità del microbiota intestinale, caratterizzato da una comunità microbica di circa 10^{14} microrganismi, che colonizza il tratto gastrointestinale dell'ospite, specialmente nella porzione distale, cioè nel colon.

mazione producendo più molecole pro-infiammatorie.

Nei ratti è stato riportato un legame meccanicistico tra il microbiota intestinale e la gravità dell'infarto del miocardio. È stato dimostrato, infatti sui modelli di roditori, che la somministrazione di *Lactobacillus plantarum* si associa ad una significativa riduzione delle dimensioni dell'infarto e al miglioramento della funzione ventricolare sinistra dopo infarto del miocardio. Un altro studio su modello animale ha mostrato che la somministrazione del *Lactobacillus rhamnosus* ha attenuato l'ipertrofia ventricolare sinistra e l'insufficienza cardiaca dopo infarto miocardico sperimentale. Questi studi dimostrano, quindi, una stretta correlazione tra i componenti del microbiota intestinale e l'infarto del miocardio.

Nonostante sia ormai evidente un'associazione tra il microbiota e l'aterosclerosi, non è chiaro come i batteri che risiedono a

livello intestinale possano contribuire alla progressione della malattia. In particolare, ancora non è del tutto chiarito se sono i batteri per se a contribuire al processo aterosclerotico oppure sono i prodotti da essi derivanti. Infatti, è stato dimostrato che topi privi di specifici batteri intestinali sviluppano più placche aterosclerotiche rispetto ai topi di controllo, suggerendo un effetto protettivo dei batteri commensali. Però, oltre all'invasione diretta, il microbiota può generare risposte mediante altri prodotti di loro derivazione che possono generare una risposta immunitaria forte e contribuire così allo sviluppo dell'aterosclerosi.

Come difesa di prima linea dell'ospite contro i patogeni, la risposta immunitaria innata si basa su una famiglia di recettori come i recettori Toll-like (TLR) e i recettori simili a domini di oligomerizzazione (NOD-like) legati al nucleotide. Tra questi, i TLR sono recettori dell'immunità innata con un ruolo chiave nel combattere alcuni prodotti derivanti dai batteri intestinali quali i lipopolisaccaridi. È stato dimostrato, infatti, che la carenza di TLR2 o TLR4 riduce l'accumulo di lipidi a livello aortico e previene aumenti della IL-1 α e della proteina chemiotattica dei monociti. Inoltre, la mancanza del TLR4 o della sua proteina adattatrice Myd88 riduce la progressione della placca aterosclerotica nei topi ApoE^{-/-}.

Meccanismi di atero-trombosi

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica che coinvolge numerosi processi immunologici, e rappresenta la causa più frequentemente associata alla manifestazione di sindromi coronariche acute (ACS) che comprendono la malattia coronarica instabile (angina instabile) e infarto miocardico acuto (AMI) che a sua volta comprende STEMI e NSTEMI o morte cardiaca improvvisa (SCD).

Il danno all'endotelio vascolare e lo sviluppo di lesioni infiammatorie nella parete del vaso determinano la formazione di coaguli di sangue che portano o al tromboembolismo, che si evolve da placche aterosclerotiche, o alla chiusura del lume dell'arteria nel sito di rottura della placca infiammata, provocando cioè occlusione del vaso trombotico.

L'aterotrombosi si verifica nel corso dell'aterosclerosi; infatti studi pato-fisiologici hanno dimostrato che la causa più comune della formazione di un coagulo di sangue è la rottura del cappuccio fibroso, che separa il contenuto della placca dal sangue. Partendo da queste considerazioni fisiopatologiche, i fattori che determinano la vulnerabilità delle placche e la sua rottura o la sua erosione superficiale, nonché i fattori che determinano la probabilità di trombosi, sono determinanti chiave della capacità di prevenire le manifestazioni letali determinate dall'aterosclerosi.

L'eziologia dell'aterosclerosi è multifattoriale e il trigger può essere o sistemico o determinato da fattori locali che inducono il deterioramento della funzione vascolare. L'ipercolesterolemia, e soprattutto elevate concentrazioni plasmatiche di lipoproteine a bassa densità (LDL), rappresenta un importante fattore di rischio per l'insorgenza prematura dell'aterosclerosi e della cardiopatia ischemica (7). Nelle regioni della parete vascolare che sono predisposte a lesioni aterosclerotiche, con aumento della permeabilità, l'ipercolesterolemia è associata ad un aumento della transitosi delle LDL attraverso l'endotelio vascolare. Questo porta ad un accumulo di LDL nello spazio subendoteliale, dove l'interazione con proteine che stimolano la loro modificazione come aggregazione, glicosilazione, proteolisi enzimatica e ossidazione, ne aumenta l'aterogenicità e la ritenzione nell'intima vascolare.

Una caratteristica importante durante lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche è l'infiltrazione di monociti circolanti nello spazio intravascolare. Le particelle di LDL, in particolare le forme modificate, aumentano l'espressione e la secrezione di composti chemiotattici solubili come ad esempio la proteina chemioattrattante i monociti-1 (MCP-1) e l'interleuchina (IL) 8 e favoriscono l'espressione di molecole di adesione come integrine e selectine che, esposte sulla superficie delle cellule endoteliali attivate, favoriscono il reclutamento, l'adesione e la tras migrazione dei leucociti (monociti e cellule T). I monociti infiltrati si differenziano in macrofagi ed esprimono recettori scavenger come CD36 e LOX-1, grazie ai quali internalizzano molte delle molecole di colesterolo e gli esteri di colesterolo contenuti nelle particelle di LDL modificate. L'internalizzazione del colesterolo porta alla formazione di cellule schiumose, un elemento cellulare caratteristico delle lesioni aterosclerotiche. A loro volta, le cellule schiumose secernono citochine proinfiammatorie, fattori di crescita e metalloproteinasi (MMPs) e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che mantengono lo stimolo chemiotattico per i leucociti, aumentano l'espressione dei recettori scavenger, e regolano l'accumulo di cellule muscolari lisce (SMC) nell'intima. Le SMC svolgono un ruolo chiave sia nella fase di inizio che nelle fasi di progressione e complicazione delle lesioni aterosclerotiche. Le SMC sono caratterizzate dalla loro elevata plasticità con un fenotipo contrattile non proliferativo, tipico delle arterie sane. Sotto gli effetti degli stimoli aterogenici, le SMC si trasformano in cellule attivamente proliferative, migrano attratte da agenti chemiotattici e hanno una maggiore sintesi di matrice extracellulare (8).

Infine, le modificazioni ossidative a carico delle LDL influenzano la funzione del-

le piastrine. Il legame tra particelle di LDL ossidate e recettori specifici come CD36, SR-B1 e LOX-1 espressi sulla membrana piastrinica induce l'attivazione, i cambiamenti morfologici e l'aggregazione piastrinica, contribuendo così alla formazione di trombi, in particolare dopo la rottura della placca.

Le piastrine, inoltre, contribuiscono all'attivazione endoteliale e modulano le risposte infiammatorie, favorendo così l'insorgenza e la formazione di lesioni aterosclerotiche e le loro successive complicanze trombotiche (9).

Metaboliti derivanti da microbi intestinali e aterosclerosi

L'epitelio intestinale è la prima barriera che protegge l'ospite dall'invasione di agenti patogeni e dei loro prodotti. Dato il suo ruolo fondamentale nella prevenzione della traslocazione del contenuto intestinale, principalmente dei componenti batterici, l'integrità della barriera intestinale è essenziale per mantenere la salute dell'ospite. Se la barriera epiteliale intestinale è compromessa, l'invasione di prodotti associati ai patogeni determina una risposta immunitaria che provoca un'inflammatione sistemica e specifica del tessuto. Il microbiota intestinale, quindi, può influenzare i processi fisiologici e metabolici dell'ospite attraverso metaboliti bioattivi che possono influenzare gli organi distali direttamente o indirettamente (*Figura 2*). Infatti, il microbiota intestinale interagisce con l'ospite attraverso una serie di vie, tra cui la via della trimetilammina (TMA)/trimetilammina N-ossido (TMAO), la via degli acidi grassi a catena corta (SCFA), la via dell'acido biliare primario e secondario (BA) e i peptidoglicani. Alcune di queste molecole possono interagire funzionalmente con altri ormoni endocrini, tra cui greli-

na, leptina, peptide 1 simile al glucagone (GLP-1) e peptide YY (PYY). A queste molecole si può aggiungere anche il lipopolisaccaride (LPS) che è un prodotto della parete batterica e può innescare numerosi processi di segnalazione cellulare. Sono stati identificati numerosi recettori in grado di riconoscere questi prodotti derivanti dai batteri intestinali. Tra questi, i recettori Toll-like (TLR) che sono in grado di legare le LPS e i recettori simili al dominio di oligomerizzazione nucleotidica NOD (NLR) in grado di legare i peptidoglicani (10).

TMAO e aterosclerosi

La fosfatidilcolina derivante dalla dieta o la L-carnitina vengono metabolizzate nell'intestino dal microbiota intestinale in trimetilammina (TMA). La TMA è un precursore della trimetilammina-N-ossido (TMAO), che è trasportato nel fegato e ossidato dalla flavina monoossigenasi 3 (FMO3), un membro della famiglia degli enzimi epatici FMO, che porta alla produzione di TMAO. Studi di neutralizzazione di FMO3 nei topi, attraverso un oligonucleotide antisense, hanno mostrato una riduzione dei livelli circolanti di TMAO e un'attenuazione dell'aterosclerosi attraverso l'attivazione del trasporto inverso di colesterolo nei macrofagi.

Per esplorare i potenziali meccanismi con cui il TMAO potrebbe promuovere l'aterosclerosi, studi in cui è stata somministrata colina nella dieta di topi ApoE^{-/-} hanno rivelato livelli elevati di CD36 e SR-A1 nei macrofagi nei topi trattati rispetto ai normali controlli. Tuttavia, nei macrofagi dei topi trattati con colina non è stato osservato alcun impatto significativo del TMAO sulla formazione delle cellule schiumose. Questi dati suggeriscono che il TMAO può accelerare lo sviluppo dell'aterosclerosi inducendo la disfunzione delle cellule endoteliali e aumentando l'adesione

dei monociti all'endotelio. Anche se numerosi dati dimostrano che il TMAO può contribuire allo sviluppo del processo aterosclerotico, ci sono altrettanti studi che mostrano una non associazione. Infatti, in uno studio di coorte non sono emerse evidenze di associazioni significative tra l'assunzione di colina e il rischio di sviluppare patologie cardiovascolari. Inoltre, in uno studio in cui L-carnitina è stata somministrata ai topi ApoE^{-/-}, nonostante un aumento significativo dei livelli circolanti di TMAO, questi livelli non si associavano in maniera diretta con la dimensione della lesione aortica. Infine, numerosi studi condotti su larga scala da diversi paesi hanno dimostrato che l'assunzione di colina e betaina nella dieta non era associata alla patogenesi della CVD. Di conseguenza, sono necessari ulteriori studi per confermare l'esatto ruolo del TMAO nell'aterosclerosi e quindi poter considerare i batteri o enzimi produttori di TMAO come potenziale terapeutico (11) (*Figura 2*).

Acidi biliari e aterosclerosi

Gli acidi biliari (AB) sono un altro gruppo di metaboliti derivati dal microbiota intestinale coinvolti in varie malattie metaboliche, che vengono immagazzinati nella cistifellea e rilasciati nell'intestino per facilitare l'assorbimento dei lipidi alimentari e delle vitamine liposolubili. Gli AB primari sono sintetizzati dal colesterolo nel fegato e comprendono principalmente acido colico (CA) e acido chenodesossicolico (CDCA). Gli AB primari sono di solito metabolizzati in AB secondari tra cui acido desossicolico (DCA) e acido litocolico (LCA), acido iodesossicolico e acido ursodesossicolico attraverso enzimi derivati dal microbiota intestinale. È noto, infatti, che topi privi di germi presentano livelli elevati di AB primari e assenza di AB secondari nel sistema enteroepatico. Pertanto, esiste una relazione

bidirezionale tra il microbiota intestinale e il metabolismo degli AB. Recentemente il metabolismo degli AB mediato dal microbiota intestinale nelle patologie cardiovascolari è stato molto studiato. Tuttavia, ad oggi, il ruolo degli AB nello sviluppo delle patologie cardiovascolari non è ancora del tutto compreso. È stato osservato che gli AB possono promuovere lo sviluppo dell'aterosclerosi principalmente attraverso i propri recettori. Sono stati identificati numerosi recettori per gli AB come il recettore X farnesoide (FXR), una serie di recettori accoppiati a proteine G e il recettore X della gravidanza (PXR). FXR è un recettore nucleare che regola il metabolismo dei lipidi e del glucosio. Topi ApoE^{-/-} con deficit di FXR alimentati con una dieta grassa mostravano un profilo lipidico peggiorato e un

aumento delle lesioni aterosclerotiche rispetto ai controlli ApoE^{-/-}. Per quanto riguarda il recettore accoppiato con la proteina G, noto anche come TGR5, è un altro importante recettore degli AB. Ricerche recenti hanno indicato che l'attivazione di TGR5 può inibire la formazione di aterosclerosi, un effetto associato a una riduzione dell'infiammazione dei macrofagi e del carico lipidico. Inoltre, l'attivazione di TGR5 contribuisce anche a un maggiore dispendio energetico e a un migliore controllo glicemico. Infine, il recettore X della gravidanza (PXR) è un altro tipo di recettore dell'ormone nucleare che regola l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi, trasporto e metabolismo degli AB, e può anche essere attivato da AB secondari come LCA. La delezione di PXR attenua lo

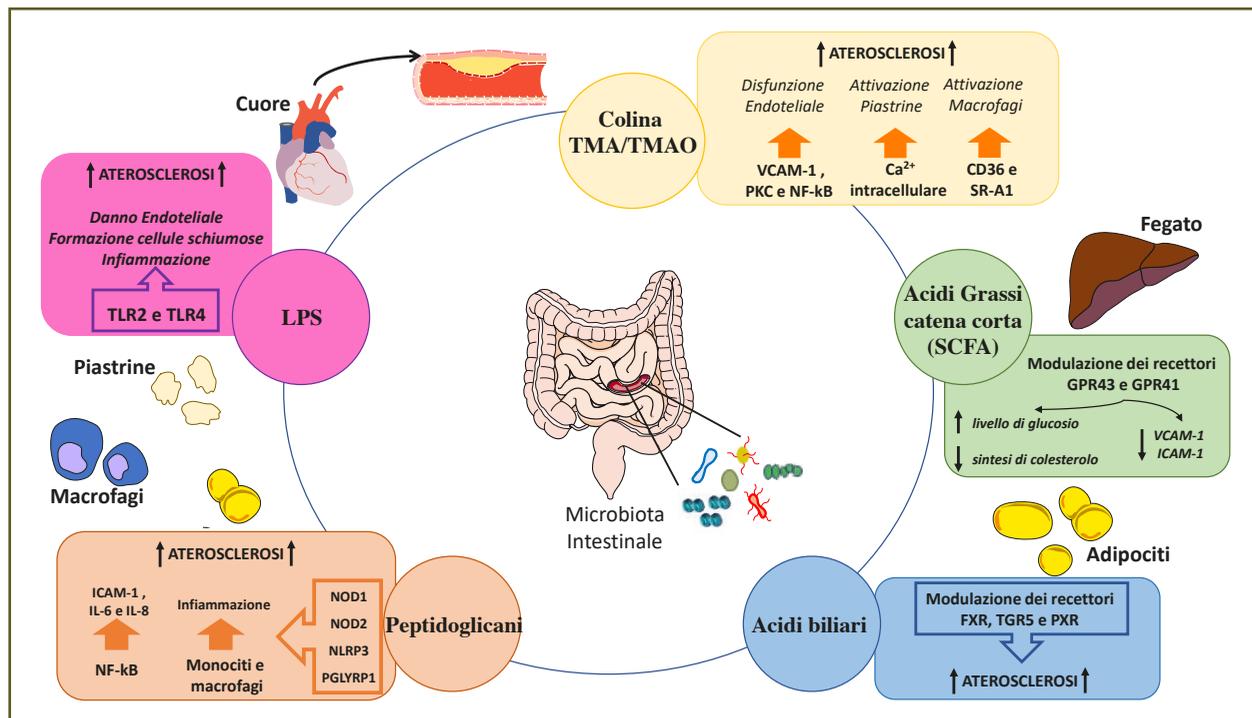


Figura 2 - Microbiota intestinale e possibili segnalazioni molecolari coinvolte nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi. Il microbiota intestinale può influenzare i processi fisiologici e metabolici dell'ospite attraverso metaboliti bioattivi quali trimetilammina-N-ossido (TMAO), acidi grassi a catena corta (SCFA), acidi biliari (AB), peptidoglicani e il lipopolisaccaride (LPS).

sviluppo di aterosclerosi in topi doppi knockout per PXR e ApoE, che possono essere associati alla riduzione dell'espressione di CD36 e dell'assorbimento dei lipidi nei macrofagi. In conclusione, gli AB primari e secondari possono contribuire allo sviluppo dell'aterosclerosi attraverso la modulazione dei propri recettori quali FXR, TGR5 e PXR (*Figura 2*).

SCFA ed aterosclerosi

Gli acidi grassi a catena corta (SCFA), come l'acetato, il propionato e il butirato, sono i principali prodotti finali dalla degradazione microbica di carboidrati e proteine nell'intestino. La maggior parte degli SCFA è assorbita dall'intestino e metabolizzata in vari tessuti del corpo, contribuendo ad alcuni importanti processi fisiologici e incidendo in particolare sul fabbisogno energetico giornaliero. Gli SCFA sono importanti per il metabolismo dell'ospite e sono utilizzati come substrati per la produzione di energia, lipogenesi, gluconeogenesi e sintesi del colesterolo. Oltre ad essere substrati metabolici, gli SCFA agiscono come molecole di segnalazione, in particolare attraverso i recettori accoppiati alla proteina G, quali GPR43/FFAR2 e GPR41/FFAR3. L'attivazione di GPR43 sulle cellule L'augmenta la secrezione di peptide-1 simile al glucagone (GLP-1), mentre l'acetato induce, sempre attraverso questo GPR43, un'attività anti-lipolitica e migliora il metabolismo del glucosio e dei lipidi. Per quanto riguarda il recettore GPR41, studi hanno dimostrato che è in grado di regolare il metabolismo attraverso l'interazione con il microbiota intestinale. I topi knockout per il recettore GPR41 sono più magri e pesano meno dei topi wild-type. Inoltre, alcuni studi clinici hanno anche evidenziato effetti benefici degli SCFA sul peso corporeo. In particolare, è stato osservato che l'ingestione di

un precursore del propionato è in grado di aumentare i livelli plasmatici postprandiali di PYY e GLP-1 riducendo così la quantità di calorie assorbite. Al contrario, il trattamento a lungo termine con questo precursore provoca una riduzione dell'aumento di peso.

Infine, è stato osservato che il propionato riduce l'espressione di alcune molecole di adesione delle cellule endoteliali come VCAM-1 e ICAM-1 nelle cellule endoteliali mediante l'inibizione del fattore nucleare- κ B (NF- κ B). Inoltre il propionato è in grado di ridurre il livello di glucosio nel sangue e inibire la sintesi di colesterolo negli epatociti. In conclusione, questi studi suggeriscono che gli SCFA hanno un impatto favorevole sulla salute umana, regolando/modulando soprattutto il metabolismo lipidico (*Figura 2*).

Peptidoglicani ed aterosclerosi

Il peptidoglicano (PG, chiamato anche mureina) è un componente unico ed essenziale della parete cellulare dei batteri Gram-negativi ma è anche un componente della parete dei batteri Gram-positivi. Il PG è presente abbondantemente nella normale flora intestinale umana e in altre mucose ma in siti anatomici differenti favorisce l'infiammazione attraverso l'attivazione del recettore Toll-like 2 (TLR2). Inoltre, il PG è riconosciuto da altri recettori, tra cui la proteina 1 contenente dominio di oligomerizzazione legante i nucleotidi (NOD1), NOD2, la proteina 3 contenente domini NACHT, LRR e PYD (NLRP3) e la proteina 1 di riconoscimento del peptidoglicano (PGLYRP1). L'attivazione di queste cascate di segnalazione innesca una risposta infiammatoria nelle cellule immunitarie e non immunitarie in tutto l'organismo (12).

Usando la metodica del sequenziamento metagenomico, è stato scoperto che i

pazienti con placche aterosclerotiche sintomatiche avevano un arricchimento di geni che codificavano la sintesi di PG rispetto ai controlli in assenza di placche vulnerabili nelle arterie carotidi. Questo dato suggerisce che l'aumento della produzione di PG da parte del metagenoma intestinale può contribuire all'aterosclerosi sintomatica innescando la risposta del sistema immunitario innato e favorendo la funzione dei neutrofili (5).

Conferme del ruolo del PG nell'induzione della reazione infiammatoria e nella progressione del processo aterosclerotico sono derivate anche da esperimenti *in vitro* condotti su diversi tipi cellulari. La stimolazione di cellule umane endoteliali dell'arteria coronaria (CAEC) con il PG induce l'attivazione di NF-kB e l'espressione di mediatori solubili quali ICAM-1, IL-6 e IL-8 (13,14). Inoltre, l'espressione dei mediatori infiammatori è risultata significativamente aumentata nelle cellule di pazienti diabetici, suggerendo che le CAEC in soggetti diabetici adottino un fenotipo iper-infiammatorio e che questo cambiamento fenotipico endoteliale possa predisporre l'arteria coronarica all'aterogenesi (14).

Infine, la stimolazione con il PG favorisce una maggiore attivazione dei monociti, aumentando così la possibilità che questi siano in grado di aderire alle cellule endoteliali attivate che rivestono la parete del vaso nei siti di infiammazione (15) (*Figura 2*).

LPS ed aterosclerosi

I lipopolisaccaridi (LPS), noti anche come endotossine, sono composti strutturali caratteristici della membrana esterna dei batteri Gram-negativi. L'LPS induce infiammazione attraverso l'attivazione del suo recettore, il TLR4, che si esprime su cellule immunitarie come i macrofagi e su molti altri tipi di cellule tra cui epatociti,

adipociti e piastrine. L'epitelio intestinale funge da barriera per prevenire la traslocazione di fattori di origine batterica. Tuttavia, condizioni quali l'aumento di peso, una dieta ricca di grassi (16) e l'aumento dell'esposizione agli acidi grassi (17, 18) interrompono la funzione di barriera intestinale consentendo la traslocazione di LPS (19, 20). Ciò si traduce in livelli moderatamente aumentati di LPS nel sangue che è una condizione definita come endotossinemia metabolica (19). Questo fenomeno si verifica, inoltre, in condizioni quali diabete di tipo II, obesità e ipertensione, situazioni in cui i livelli circolanti di LPS possono risultare elevati e che sono associate allo sviluppo di aterosclerosi. Infatti, è stato dimostrato che l'LPS è in grado di promuovere l'aterosclerosi sia in modelli sperimentali animali che nell'uomo. Ad esempio, conigli ipercolesterolemici trattati con iniezioni endovenose ripetute di endotossina (lipopolisaccaride di *Escherichia coli* da 1,25 a 2,5 µg) hanno mostrato un'aterosclerosi significativamente accelerata, come evidenziato dall'aumentata area della lesione aortica e dal volume della lesione, rispetto agli animali di controllo (21). Topi knockout per il TLR4 o per il MyD88, l'adattatore canonico a valle della segnalazione del TLR4 (22), hanno dimostrato una ridotta aterosclerosi dell'aorta, associata a una riduzione dei livelli circolanti di citochine proinfiammatorie come IL-12 o MCP1, a una riduzione del contenuto lipidico della placca e del numero di macrofagi (23).

Nell'uomo, i biomarcatori d'infiammazione sistemica, come molecole solubili di adesione, e i livelli di endotossina batterica circolante sono significativamente aumentati nei soggetti con infezioni croniche e sono predittivi di un aumentato rischio di aterosclerosi (24). Alcuni studi hanno invece valutato l'impatto delle varianti genetiche del TLR4 che conferiscono differenze

nella risposta infiammatoria provocata dall'LPS e che sono correlate allo sviluppo dell'aterosclerosi. Ad esempio, le mutazioni che nell'uomo interessano il dominio extracellulare del recettore TLR4 sono associate a una riduzione della reattività all'LPS (25). In un secondo studio è stato dimostrato che soggetti portatori di un polimorfismo del TLR4 in grado di attenuare la segnalazione del recettore e diminuire la risposta infiammatoria ai patogeni gram-negativi hanno un minor rischio di aterosclerosi carotidea e uno spessore medio-intimale più piccolo nell'arteria carotide comune (26).

Infine, l'analisi di campioni di arterie carotidee di pazienti sottoposti a endoarteriectomia ha evidenziato che l'LPS di *Escherichia Coli* si localizza nella placca e che può contribuire al danno aterosclerotico attraverso un meccanismo mediato dal

TLR4 che coinvolge lo stress ossidativo (27). (Figura 2).

Terapia mirata al microbiota

Considerato i numerosi effetti sulla salute umana, il microbiota e i metaboliti correlati sono diventati potenziali obiettivi terapeutici, guadagnando gradualmente molta attenzione (Figura 3).

Gli effetti delle terapie mirate al microbiota, che alterano la composizione della comunità microbica, variano dall'eliminazione di singoli ceppi di una singola specie (ad esempio, con vaccini antibatterici coniugati) alla sostituzione dell'intera comunità con un nuovo microbiota intatto (ad esempio, dal trapianto fecale).

Di seguito sono riportate alcune strategie che agiscono modulando il microbiota e i suoi effetti.

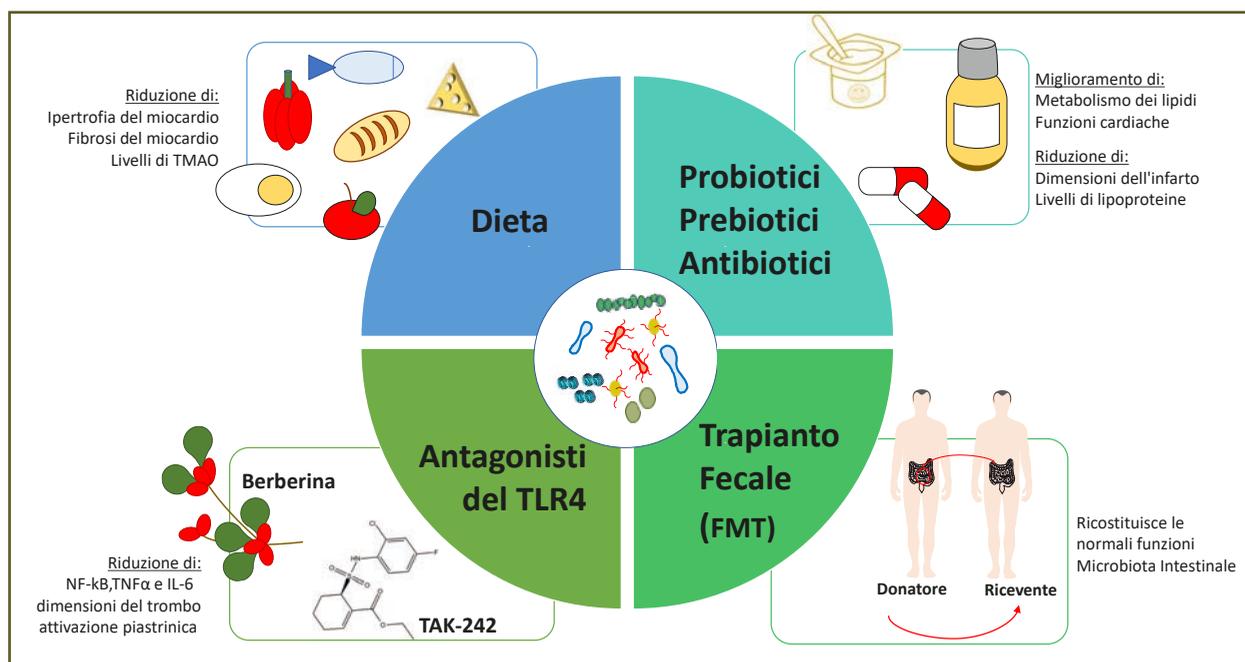


Figura 3 - Attuali strategie terapeutiche capaci di modulare il microbiota e i loro effetti sulle patologie cardiovascolari: intervento dietetico (1), utilizzo di antibiotici, prebiotici e probiotici (2), trapianto fecale (3) e antagonisti del Toll-like receptors 4 (TLR4) (4).

Dieta

La modulazione del microbiota intestinale attraverso l'intervento dietetico è un potente approccio per la prevenzione e la terapia delle patologie cardiovascolari. Ad esempio, nei topi nutriti con una dieta ricca di fibre si osserva un aumento di batteri intestinali che producono acetato, riducendo significativamente l'ipertrofia e la fibrosi del miocardio (28). Nell'uomo, un maggiore consumo di fibre è associato a un minor rischio di malattie coronariche (29). Inoltre, un intervento con la dieta mediterranea riduce i livelli di TMAO, che di conseguenza possono prevenire conseguenze cardiovascolari e scompenso cardiaco (30, 31).

Probiotici, Prebiotici e Antibiotici

I probiotici sono microrganismi vivi somministrati per ristabilire un equilibrio ecologico intestinale. Al contrario, i prebiotici sono entità non microbiche e non digeribili coinvolte nella modulazione della comunità microbica.

Alcune evidenze suggeriscono che tali integratori possono essere avere un effetto cardioprotettivo.

Ad esempio, la somministrazione di *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 ha ridotto le dimensioni dell'infarto e ha migliorato le funzioni cardiache (32). In uno studio pilota randomizzato controllato la somministrazione di *Saccharomyces boulardii* ha avuto benefici nei pazienti con scompenso cardiaco come indicato da una migliore frazione di eiezione ventricolare sinistra (33). Altri probiotici comuni includono *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (34).

L'integrazione con inulina, un prebiotico, ha ridotto significativamente le lesioni aterosclerotiche in topi ApoE^{-/-} (35). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che i probiotici e i prebiotici possono modificare beneficamente il metabolismo dei lipidi (36, 37).

Interventi con antibiotici, ad esempio l'ampicillina, riducono fattori di rischio aterosclerotici, come i livelli di lipoproteine (38). Sebbene diversi risultati suggeriscano che i prebiotici, probiotici e antibiotici siano interventi efficaci nella modulazione della funzione dei microbi colonizzatori associati con malattie cardiovascolari e malattie, ulteriori indagini sono necessarie soprattutto per ridurre i possibili effetti collaterali.

Trapianto di microbiota fecale

Il trapianto di microbiota fecale (FMT) è un possibile intervento terapeutico in grado di modulare gli agenti patogeni intestinali attraverso il trasferimento di batteri funzionali da soggetti sani nel tratto gastrointestinale dei pazienti, ricostituendo di conseguenza le normali funzioni del microbiota intestinale (39).

In uno studio pilota controllato randomizzato in doppio cieco, la composizione del microbiota intestinale nei pazienti con sindrome metabolica è cambiato in modo significativo dopo trapianto di microbiota fecale da donatore vegano. Tuttavia, non ci sono stati cambiamenti nei livelli del metabolita TMAO. Ad oggi, la FMT rimane una terapia promettente per le malattie cardiovascolari, ma necessita di ulteriori studi. Infatti, la limitazione di quest'approccio è che endotossine o agenti infettivi potrebbero comunque essere trasferiti, portando così a nuove complicanze. Pertanto, il potenziale del trapianto fecale per il trattamento delle malattie cardiovascolari richiede ulteriori indagini per ridurre il rischio di effetti avversi e per migliorare l'efficienza della sua applicazione.

Antagonisti del TLR4

Oltre a poter agire direttamente sul microbiota intestinale modificandone la composizione e mitigandone gli effetti negativi, è possibile anche utilizzare un altro approc-

cio che si basa sulla modulazione della risposta infiammatoria legata all'attivazione del TLR4 da parte dell'LPS.

Gli antagonisti del TLR4 possono derivare sia da fonti naturali sia da fonti sintetiche.

Tra i derivati naturali la berberina, un alcaloide isochinolina estratto principalmente da *Rhizoma Coptidis*, può legarsi a MD-2 che è in grado di legare fino a tre molecole di berberina. Inoltre, la berberina blocca anche la trasduzione del segnale del

TLR4 sopprimendo NF-kB. Un altro derivato naturale è il partenolide, un lattone sesquiterpenico che blocca la segnalazione del TLR4, inibisce il pathway di NF-kB e inibisce l'espressione del TLR4 dopo stimolazione delle cellule con LPS.

Tra i derivati sintetici, il TAK-242 (Resatorvid) è un derivato del cicloesene. È una piccola molecola con una specifica e selettiva funzione inibitoria della segnalazione del TLR4 (40). Infatti, TAK-242 inibisce la produzione di mediatori infiammatori, indotti da LPS, legandosi al dominio intracellulare del TLR4. Studi preclinici hanno dimostrato una promettente efficacia di TAK-242 in modelli cellulari e animali. Ad esempio, è stato scoperto che TAK-242 riduce citochine infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa) e l'interleuchina-6 (IL-6) in macrofagi di topo stimolati con LPS con valori IC50 di 1,9 e 1,3 nM, rispettivamente. Inoltre, TAK-242 mostra marcati effetti benefici in modelli sperimentali. Infatti, la somministrazione endovenosa di una dose di 0,1 mg/kg o più sopprimeva la produzione di varie citochine (TNF-alfa, IL-6 e IL-1beta) in un modello murino di shock endotossico. Inoltre, proteggeva i topi dalla morte in modo dose-dipendente e tutti i topi sopravvivevano alla dose di 3 mg/kg. Infine, la somministrazione di TAK-242 in un modello sperimentale di trombosi, riduce in maniera significativa le dimensioni del trombo e l'attivazione piastrinica.

Numerose altre prove sono presenti in letteratura a conferma dell'efficacia del TAK-242 in diversi contesti patologici associati all'infiammazione.

Conclusioni

La relazione tra microbiota, ospite e predisposizione all'insorgenza di malattie rappresenta, sicuramente, un abito della ricerca scientifica ampio e non ancora del

Glossario

CD36: Cluster of Differentiation 36. CD36 è una glicoproteina di membrana espressa su piastrine, monociti e cellule endoteliali.

FFAR2/ FFAR3: Free fatty acid receptors 2 and 3. Sono recettori accoppiati a proteine G (GPCR) espressi abbondantemente sulle cellule intestinali e regolano varie funzioni fisiologiche e cellulari.

GLP1: glucagon-like peptide 1. È un ormone peptidico di 30 aminoacidi prodotto nelle cellule L epiteliali endocrine intestinali mediante elaborazione differenziale del pro-glucagone.

LOX1: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1. LOX-1 è una proteina di membrana appartenente alla famiglia delle lectine di tipo C.

MMPs: Matrix metalloproteinases. Sono una famiglia di endopeptidasi Ca^{2+} e Zn^{2+} dipendenti che processano vari componenti della matrice extracellulare.

NOD-like receptors (NLR): Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors. Sono recettori per il riconoscimento di pattern molecolari e sono simili ai Toll-Like receptors (TLR).

SRB1: The scavenger receptor, class B type 1. È una proteina multifunzionale che si trova sulla superficie di una varietà di cellule e che svolge principalmente una funzione anti-infiammatoria e anti-aterosclerotica.

TLRs: Toll-like receptors. Sono una classe di recettori che si localizzano sulla superficie cellulare o nei compartimenti intracellulari come reticolo endoplasmatico, endosoma, lisosoma o endolisosoma.

TMA/TMAO: trimethylamine (TMA)/ trimethylamine N-Oxide. La trimetilammina (TMA) è un metabolita derivato dal microbiota intestinale, formatosi dalla scissione enzimatica di nutrienti contenenti una porzione di TMA nella loro struttura chimica.

Questionario di auto-apprendimento

- | | |
|--|--|
| <p>1) Qual è il recettore a cui si lega l'LPS</p> <ul style="list-style-type: none"> a. CD36 b. TLR4 c. FXR d. PXR <p>2) Quale tra questi non è un metabolita/ componente del microbiota intestinale</p> <ul style="list-style-type: none"> a. TMAO b. Peptidoglicani c. LPS d. Grelina <p>3) Il TAK-242 è</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Un derivato sintetico che inibisce il TLR4 b. Un derivato naturale che inibisce il TLR4 c. Un peptide che inibisce il CD36 d. Un inibitore degli acidi biliari | <p>4) La flavina monoossigenasi 3 ossida</p> <ul style="list-style-type: none"> a. La trimetilammina b. La fosfatidilcolina c. L-carnitina d. Propionato <p>5) Quale tra le seguenti opzioni non è un trattamento per modulare la disbiosi</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Dieta b. Probiotici c. Antibiotici d. Antinfiammatori |
|--|--|

Risposte corrette:
1B, 2D, 3A, 4A, 5D

tutto esplorato soprattutto nella patologia aterosclerotica. Pertanto, la sfida scientifica, che sicuramente potrà aprire in un futuro prossimo nuovi scenari, è quella di caratterizzare ulteriormente il microbiota e i suoi derivati, studiandone il loro impatto

sulla fisiologia dell'ospite. Nuovi interventi terapeutici mirati a contrastare questo fenomeno possono, quindi, contribuire a migliorare il decorso e la progressione della patologia aterosclerotica in pazienti affetti da malattie cardiovascolari.

RIASSUNTO

Il corpo umano ospita trilioni di microrganismi che formano un ecosistema interattivo all'interno e all'esterno dell'organismo. La maggior parte del microbiota che colonizza il corpo umano si trova nel tratto gastrointestinale, specialmente nel colon. Il microbiota intestinale svolge un ruolo importante nel mantenimento della nutrizione e del sistema immunitario, che a sua volta influenza la suscettibilità dell'ospite e la risposta a determinate condizioni patologiche. Lo squilibrio nel microbiota intestinale, noto anche come disbiosi intestinale, è associato a diverse condizioni patologiche tra cui disturbi gastrointestinali, asma, allergie, disturbi del sistema nervoso centrale, tumori e malattie cardiovascolari. Le malattie cardiovascolari sono una delle principali cause di morte in tutto il mondo. L'aterosclerosi è il meccanismo fisiopatologico chiave alla base dello sviluppo delle malattie cardiovascolari e il microbioma intestinale influenza tutti i fattori di rischio componenti dell'aterosclerosi, sia direttamente che indirettamente, svolgendo così un ruolo importante, sebbene poco compreso, nelle malattie cardiovascolari. In questa rassegna, delineiamo il ruolo del microbiota intestinale nelle malattie cardiovascolari ed in particolar modo nel processo aterosclerotico e affrontiamo i potenziali interventi terapeutici per modulare una eventuale disbiosi.

Parole chiave: *Microbiota intestinale, Aterosclerosi, Patologia cardiovascolare, Disbiosi intestinale.*

Bibliografia

- Zhang T, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59: 143-151.
- Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of Macrophage Foam Cell Formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1998; 177: 725-729.
- Calandrini C, Ribeiro A, Gonnelli A, et al. Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Dis.* 2014; 20: e128-134.
- Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010; 464: 59-65.
- Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012; 3: 1245.
- Hayashi C, Madrigal AG, Liu X, et al. Pathogen-Mediated Inflammatory Atherosclerosis Is Mediated in Part via Toll-Like Receptor 2-Induced Inflammatory Responses. *J Innate Immun.* 2010; 2: 334-343.
- Yusuf S, Reddy S, Ôunpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation.* 2001; 104: 2746-2753.
- Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. *Rev Española Cardiol.* 2009; 62: 1161-1178.
- Daub K, Seizer P, Stellos K, et al. Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36: 146-156.
- Ma J, Li H. The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1082.
- Li DY, Tang WHW. Gut Microbiota and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017; 19: 1-12.
- Wolf AJ, Underhill DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18: 243-254.
- Xie Y, Li Y, Cai X, Wang X, Li J. Interleukin-37 suppresses ICAM-1 expression in parallel with NF- κ B down-regulation following TLR2 activation of human coronary artery endothelial cells. *Int Immunopharmacol.* 2016; 38: 26-30.
- Li J, Jin C, Cleveland JC, et al. Enhanced inflammatory responses to toll-like receptor 2/4 stimulation in type 1 diabetic coronary artery endothelial cells: The effect of insulin. *Cardiovasc Diabetol.* 2010; 9.
- Nijhuis MMO, Pasterkamp G, Sluis NI, et al. Peptidoglycan increases firm adhesion of monocytes under flow conditions and primes monocyte chemotaxis. *J Vasc Res.* 2007; 44: 214-22.
- Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: Evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86: 1286-1292.
- Velasquez OR, Henninger K, Fowler M, et al. Oleic acid-induced mucosal injury in developing piglet intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 1993; 264.
- Levels JHM, Abraham PR, Van den Ende A, Van Deventer SJH. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun.* 2001; 69: 2821-2828.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007; 56: 1761-1772.
- Pirlich M, Norman K, Lochs H, Bauditz J. Role of intestinal function in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006; 9: 603-606.
- Lehr HA, Sagban TA, Ihling C, et al. Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation.* 2001; 104: 914-920.
- Deguine J, Barton GM. MyD88: A central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* 2014; 6.
- Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 10679-10684.
- Kiechl S, Egger G, Mayr M, et al. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: Prospective results from a large population study. *Circulation.* 2001; 103: 1064-1070.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25: 187-191.
- Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med.* 2002; 347: 185-192.
- Carnevale R, Nocella C, Petrozza V, et al. Localization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* into human atherosclerotic plaque. *Sci Rep.* 2018; 8.
- Marques FZ, Nelson E, Chu PY, et al. High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice. *Circulation.* 2017; 135: 964-977.
- Threapleton DE, Greenwood DC, Evans CEL, et al. Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2013; 347.

30. Papadaki A, Martínez-González MÁ, Alonso-Gómez A, et al. Mediterranean diet and risk of heart failure: results from the PREDIMED randomized controlled trial. *Eur J Heart Fail.* 2017; 19: 1179-1185.
31. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N Engl J Med.* 2018; 378.
32. Gan XT, Ettinger G, Huang CX, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ Hear Fail.* 2014; 7: 491-499.
33. Costanza AC, Moscovitch SD, Faria Neto HCC, Mesquita ET. Probiotic therapy with *Saccharomyces boulardii* for heart failure patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Int J Cardiol.* 2015; 179: 348-350.
34. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients.* 2017; 9.
35. Jin M, Qian Z, Yin J, et al. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease. *J Cell Mol Med.* 2019; 23: 2343-2350.
36. Korcz E, Kerényi Z, Varga L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food Funct.* 2018; 9: 3057-3068.
37. Lew LC, Choi SB, Khoo BY, Sreenivasan S, Ong KL, Liong MT. *Lactobacillus plantarum* DR7 reduces cholesterol via phosphorylation of AMPK that down-regulated the mRNA expression of HMG-CoA reductase. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2018; 38: 350-361.
38. Rune I, Rolin B, Larsen C, et al. Modulating the gut microbiota improves glucose tolerance, lipoprotein profile and atherosclerotic plaque development in ApoE-deficient mice. *PLoS One.* 2016; 11.
39. Gallo A, Passaro G, Gasbarrini A, et al. Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update. *World J Gastroenterol.* 2016; 22: 7186-7202.
40. Kawamoto T, Ii M, Kitazaki T, et al. TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol.* 2008; 584: 40-48.

MARCATORI DI RISCHIO

FIBROSI EPATICA NEI PAZIENTI CON NAFLD: UN MARCATORE NON LIPIDICO DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE RESIDUO?

Hepatic fibrosis in patients with NAFLD: a non-lipid residual cardiovascular risk marker?

FRANCESCO BARATTA¹, DANIELE PASTORI¹, NICHOLAS COCOMELLO¹, DOMENICO FERRO¹, FRANCESCO ANGELICO², MARIA DEL BEN¹

¹Dipartimento di Scienze Cliniche Internistiche, Anestesiologiche e Cardiovascolari, Sapienza Università, Roma;

²Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive – Sapienza Università, Roma

SUMMARY

Hepatic fibrosis results from the accumulation of extracellular matrix proteins (ECM) that occurs in most chronic liver diseases. In NAFLD, severe hepatic fibrosis (F2-F3) is estimated to involve around 900,000 subjects in Italy, mostly asymptomatic. Furthermore, in patients with NAFLD the first cause of death is cardiovascular disease and the presence of liver fibrosis and its severity seem to be the only markers of liver damage capable of predicting the increased cardiovascular risk. However, in many studies, the diagnosis of liver fibrosis was based on the “best standard”, that is the liver biopsy and therefore the results are limited to translation to daily clinical practice. The FIB-4 and the NFS (NAFLD Fibrosis Score) are two surrogate, non-invasive markers of fibrosis that can be calculated very easily, starting from values of routine laboratory tests and anthropometric and anamnestic data; liver fibrosis, assessed in this non-invasive way, is a predictor of mortality especially cardiovascular.

In conclusion, NAFLD in the absence of significant fibrosis is not associated with an increase in hepatic and cardiovascular mortality, while NAFLD with the presence of significant fibrosis independently predicts total and cardiovascular mortality. Hepatic fibrosis could therefore be interpreted as a non-lipid marker of residual cardiovascular risk, defined as the risk that remains after the optimal multifactorial treatment of all the coexisting risk factors in the individual.

Key words: *Hepatic fibrosis, NAFLD, Residual cardiovascular risk, Fib4 score, NAFLD score.*

Indirizzo per la corrispondenza

Francesco Angelico
Dipartimento di Sanità Pubblica
e Malattie Infettive, Sapienza Università, Roma
E-mail: francesco.angelico@uniroma1.it

Il rischio cardiovascolare residuo

Il concetto di rischio cardiovascolare residuo è stato riferito originariamente alla quota di rischio che permane nelle coorti di

soggetti trattati nell'ambito dei grandi trials con statine (1, 2). Era il rischio residuo dei soggetti nei quali si era raggiunto un controllo ottimale del colesterolo LDL attraverso il trattamento farmacologico con statine, non-statine o terapie di combinazione. Era in gran parte legato ai trigliceridi, alle HDL e alle altre lipoproteine aterogene. In altre parole, il concetto di "rischio residuo" era in gran parte dovuto alle componenti lipidiche diverse dalle LDL ed in particolare ai *remnants* del colesterolo e alle lipoproteine ricche in trigliceridi sia in condizioni di digiuno che di non digiuno (3).

Più recentemente, il concetto di rischio residuo è stato allargato al rischio che permane dopo il trattamento multifattoriale ottimale di tutti i fattori di rischio presenti nel singolo individuo. Pertanto, più in generale, il rischio cardiovascolare residuo si può definire come la probabilità di sviluppare un evento cardiovascolare maggiore dopo aver posto il paziente in trattamento così come raccomandato dagli standard di cura. Il rischio residuo è particolarmente elevato nei soggetti obesi, diabetici di tipo 2, con sindrome metabolica e con NAFLD (4).

Il rischio residuo ha molteplici componenti:

- Il rischio associato a fattori noti e ignoti ma non modificabili (es. età, sesso, etnia, predisposizione genetica, etc.).
- Il rischio associato a fattori noti e modificabili ma non del tutto corretti e correggibili (es. livelli di HDL e trigliceridi, LP(a), adiposità addominale, pressione arteriosa, insulino-resistenza, fumo, steatosi epatica etc.).
- Il rischio associato a fattori non ancora completamente noti (es. infiammazione, stress ossidativo, fibrosi epatica, ossisteroli, ecc).

È quindi evidente che numerosi fattori lipidici e non lipidici contribuiscono al rischio residuo.

Elenco degli argomenti trattati

- Descrizione del significato e delle principali componenti del rischio cardiovascolare residuo.
- Descrizione della prevalenza della steatosi epatica non alcolica e dell'importanza della valutazione della fibrosi per la definizione della progressione clinica.
- Evidenze epidemiologiche e cliniche sull'associazione fra fibrosi epatica e rischio cardiovascolare.
- Descrizione dell'impiego di markers non invasivi di fibrosi per la valutazione del danno epatico nel soggetto con steatosi epatica non alcolica.
- Prospettive dell'uso di markers non invasivi di fibrosi epatica per la definizione del rischio cardiovascolare residuo.
- Prospettive dell'uso delle statine nella NAFLD/NASH.

Le dislipidemie sono uno dei principali determinanti del rischio cardiovascolare. Il rischio residuo viene spesso associato alla presenza di una dislipidemia (es. dislipidemia aterogena). Altre lipoproteine oltre alle LDL contribuiscono all'arteriosclerosi. In particolare, altre lipoproteine contenenti apo-B, quali le lipoproteine endogene ed esogene ricche in trigliceridi ed i loro *remnants*. I *remnants* sono lipoproteine di piccole dimensioni in grado di penetrare nell'intima arteriosa, di legarsi alla matrice connettivale e stimolare la progressione delle cellule muscolari lisce e la proliferazione dei macrofagi residenti. Contribuiscono attivamente alla formazione e progressione della placca. La presenza di *remnants* si associa ad una condizione di infiammazione di basso grado.

In condizioni di digiuno, il colesterolo *remnant* corrisponde al contenuto di colesterolo presente nelle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) sintetizzate nel fegato e nei loro *remnants* parzialmente impoveriti di trigliceridi (IDL), contenenti apoB-100. In condizioni di non digiuno, il colesterolo *remnant* comprende, oltre al

colesterolo delle lipoproteine sopra definite, anche il colesterolo presente nei chilomicroni derivanti dall'assorbimento intestinale dei grassi alimentari contenenti apoB-48. Volendo semplificare, possiamo considerare *remnant* tutto il colesterolo plasmatico meno il colesterolo HDL ed il colesterolo LDL, ossia, tutto il colesterolo presente nelle VLDL, nei chilomicroni e nei loro *remnants*, definiti globalmente lipoproteine ricche in trigliceridi (5).

NAFLD e fibrosi epatica: dimensioni del problema ed importanza clinica

La fibrosi epatica è il risultato dell'accumulo delle proteine della matrice extracellulare (ECM) che si verifica nella maggior parte delle patologie croniche del fegato (6). La deposizione di proteine dell'ECM genera delle cicatrici fibrotiche che, nelle fasi terminali di malattia, sono causa del sovvertimento dell'architettura epatica e della genesi di noduli di rigenerazione epatocellulare. In altre parole, il progressivo accumulo di fibrosi conduce allo sviluppo della cirrosi epatica, dapprima compensata e successivamente manifesta, con il possibile sviluppo di insufficienza epatica e di ipertensione portale. Storicamente, l'infezione da HCV e l'abuso alcolico sono state le principali cause di fibrosi epatica e della conseguente cirrosi (7). Tuttavia, nell'ultimo decennio, il progressivo aumento dell'incidenza della steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e la parallela diminuzione dei casi di cirrosi HCV-relati, hanno trasformato la cirrosi NAFLD relata nella prima causa di trapianto epatico negli USA nelle donne e la seconda causa nell'uomo; inoltre, in considerazione dell'elevato tasso di crescita di nuovi casi di steatoepatite non alcolica (NASH), ben più rapido di quello osservato per l'epatite alcolica, è previsto che a breve, anche nell'uomo, la

NAFLD diventi la prima causa di trapianto epatico (8).

Il *burden* di fibrosi epatica aumenta parallelamente con l'amplificarsi delle "pandemie" di obesità, diabete e sindrome metabolica che sono le principali responsabili della sempre più ampia diffusione tanto della NAFLD che della NASH. Come conseguenza della sia pur lenta progressione della steatosi semplice verso la più severa NASH, le previsioni per i prossimi anni suggeriscono un aumento dei casi di malattia epatica avanzata e della mortalità epato-relata.

Secondo una recente analisi (9), in Italia, si stima che vi siano circa 15,2 milioni di soggetti con NAFLD e circa 2,6 milioni con NASH. Tali numerosità, nell'arco dei prossimi 10 anni, potrebbero aumentare a circa 17,4 e 3,7 milioni, rispettivamente. Per quanto riguarda la fibrosi epatica severa (F2-F3) NAFLD-relata, si stima che essa coinvolga circa 900.000 soggetti, in massima parte asintomatici, e che tale numerosità, nel 2030 possa raggiungere gli 1.5 milioni di casi. Nonostante la quasi completa assenza di sintomatologia, 400.000 pazienti potrebbero sviluppare una cirrosi epatica.

Inoltre, nell'ambito di uno studio internazionale di soggetti con NAFLD con un lungo follow-up e biopsie epatiche ripetute nel tempo, è stata valutata la progressione della fibrosi (10). È stato stimato che la progressione annua di fibrosi dalle classi F1 a F2 e da F2 a F3 avvenga nel 2,8-13,3% dei soggetti e quella dalla classe F3 a F4 (cirrosi) nel 3,8-9,9% dei casi.

Nella comune pratica clinica, la fibrosi epatica, nonostante questi numeri, è costantemente sottostimata in quanto asintomatica nella maggioranza dei casi e spesso associata a forme meno avanzate di NAFLD. Infatti, fino ad un terzo dei pazienti NAFLD con fibrosi epatica (F1+) ed un

quinto dei pazienti con fibrosi epatica severa (F3-F4) non presentano una NASH. Tuttavia, la severità della fibrosi è il più importante predittore di *outcome* epatico negativo nei pazienti con NAFLD (11-13). Inoltre, con l'aumentare del grado di fibrosi, si registra un progressivo aumento del rischio di epatocarcinoma (HCC) e di insufficienza epatica (14).

Tuttavia, per effetto della lunga durata di malattia (15) e, soprattutto, a causa dell'elevata presenza di comorbidità, nei pazienti con la NAFLD la prima causa di morte è la malattia cardiovascolare. Anche per questo *outcome*, la presenza di fibrosi epatica e la sua severità sembrano essere gli unici markers di danno epatico in grado di predire l'aumentato rischio cardiovascolare (16).

Sulla base di queste considerazioni, appare molto evidente l'importanza del monitoraggio dello stadio della fibrosi nella NAFLD che, in modo indipendente dalla presenza o dalla gravità di altre caratteristiche istologiche, si associa alla mortalità per malattie epatiche e per tutte le cause.

Fibrosi epatica e rischio cardiovascolare nella NAFLD

Numerosi studi sperimentali, clinici ed epidemiologici hanno mostrato una associazione della NAFLD con le malattie cardiovascolari e i markers surrogati di arteriosclerosi (17).

In una metanalisi di 34 studi, la NAFLD si associava ad un aumentata incidenza di eventi cardiovascolari (hazard ratio [HR]: 1,37) e nello specifico con gli eventi coronarici (HR: 2,31). Tuttavia, in questa metanalisi, la diagnosi di NAFLD non era associata ad un aumento della mortalità, né totale né cardiovascolare (18). Risultati simili provengono da un'ulteriore metanalisi condotta su 16 studi dalla quale è risultato che i pazienti con NAFLD avevano il 64% in più di probabilità di sperimentare eventi

cardiovascolari o cerebrovascolari, fatali o non fatali (19).

Nonostante il progressivo aumento degli studi che correlano la diagnosi di NAFLD con un aumentato rischio cardiovascolare, pochi tentativi sono stati fatti per comprendere meglio il ruolo indipendente della NAFLD sul rischio cardiovascolare. In particolare, la NAFLD si presenta frequentemente con le caratteristiche cliniche della sindrome metabolica; pertanto, è stata suggerita l'ipotesi che la NAFLD possa associarsi ad un rischio più elevato di eventi cardiovascolari in quanto essa non è altro che la manifestazione epatica della sindrome metabolica. Numerosi studi trasversali hanno esplorato le relazioni tra NAFLD e fattori di rischio cardiovascolare quali l'insulino-resistenza, la dislipidemia aterogena, i marcatori di infiammazione di basso grado e lo stress ossidativo, che potrebbero tutti, a loro volta, fungere da stimolo per l'ulteriore rilascio di fattori proaterogeni.

Nonostante numerosi studi e metanalisi abbiano dimostrato un aumentato rischio di eventi cardiovascolari nella NAFLD, poche ricerche hanno indagato l'associazione tra eventi cardiovascolari e specifiche alterazioni epatiche quali l'infiammazione o la fibrosi.

In Svezia, è stato condotto un interessante studio osservazionale su pazienti con diagnosi biotica di NAFLD (20). Dopo un follow-up medio di 26,4 anni, i soggetti con NAFLD mostravano una aumentata mortalità totale rispetto alla popolazione di controllo, principalmente da attribuire ad un aumentato rischio di morte cardiovascolare e per malattie epatiche. Riguardo le biopsie basali di questi pazienti, il punteggio del NAS (NAFLD activity score) e l'infiammazione non predicavano gli eventi fatali, mentre il grado della fibrosi predicava sia la mortalità totale che quella specifica per

malattia. Risultati simili sono stati ottenuti in uno studio multicentrico osservazionale retrospettivo di soggetti con diagnosi biopatica di NAFLD (13). Anche in questo caso, in un tempo medio di osservazione di 12,6 anni, il grado della fibrosi si associava alla mortalità totale ed alla mortalità per complicanze epatiche. Inoltre, tale associazione era indipendente dal grado del NAS e persisteva anche dopo avere escluso dall'analisi i soggetti con fibrosi avanzata.

Lo studio di Vilar-Gomez et al. (21) condotto su 458 pazienti con NAFLD e fibrosi a ponte o cirrosi compensata confermate dalla biopsia, mostrava un'incidenza di eventi vascolari dello 0,9% per anno. Il sottogruppo di pazienti con fibrosi a ponte pre-cirrosi aveva una più elevata probabilità di sviluppare eventi vascolari rispetto alle complicanze legate alla malattia epatica.

Sebbene questi studi forniscano dati molto solidi sull'associazione tra fibrosi epatica ed eventi cardiovascolari, in quanto utilizzano per la diagnosi di fibrosi epatica il best standard, ovvero la biopsia epatica, i risultati sono traslabili in maniera limitata all'attività clinica quotidiana. Infatti, questi studi, se da una parte ci suggeriscono chiaramente di effettuare un più attento follow-up cardiovascolare nei pazienti con NAFLD e fibrosi alla biopsia epatica, dall'altro non offrono una valida opzione per lo screening del rischio cardiovascolare residuo se il paziente non presenta una chiara indicazione clinica alla biopsia epatica. In quest'ultimo caso, l'assenza di una biopsia epatica rischierebbe di non fare individuare un elevato numero di pazienti con fibrosi epatica, e quindi aumentare il rischio cardiovascolare, in quanto asintomatici e senza evidenti alterazioni di laboratorio. Infatti, nella NAFLD, una elevata proporzione di pazienti con fibrosi epatica presentano valori di enzimi epatici nel range di normalità (22).

Per questo motivo, volendo intendere la fibrosi epatica come un marker di rischio residuo, ed ipotizzando la sua diagnosi come un *alert* di aumentato rischio cardiovascolare utilizzabile su vasta scala, è fondamentale assicurarsi che anche i marcatori indiretti di fibrosi epatica siano in grado di predire, allo stesso modo della fibrosi diagnosticata con la biopsia, un'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari.

Un metodo non invasivo per la diagnosi di fibrosi epatica è quello che prevede l'utilizzo di analisi di specifiche sequenze, o la spettroscopia in risonanza magnetica nucleare (RMN). Nello studio Mesa, una vasta indagine condotta su una corte multi-etnica esente da malattie cardiovascolari all'arruolamento, gli indici di fibrosi valutati indirettamente con le sequenze T1 alla risonanza magnetica effettuata al decimo anno di follow-up, si associava retrospettivamente con gli eventi cardiovascolari. In particolare, si osservava una forte associazione della fibrosi con la fibrillazione atriale, mentre, seppur significativa, era di minore grado quella con gli eventi coronarici (23). Tuttavia, sebbene la RMN sia una metodica non invasiva e quindi scevra da effetti collaterali, essa è gravata da costi elevati ed è quindi difficile ipotizzarne un utilizzo su grande scala.

Il FIB-4 e il NFS (NAFLD Fibrosis Score) sono due markers surrogati, non invasivi di fibrosi calcolabili molto agevolmente, a partire da valori di esami di laboratorio di routine e di dati antropometrici ed anamnestici (24-27) (*Tabella 1*). Il costo per il loro calcolo è trascurabile ed il risultato è immediato. Entrambi gli scores sono stati sviluppati e validati per l'identificazione di pazienti con NAFLD ad elevata probabilità di avere una fibrosi a ponte (F3) o una cirrosi (F4). Valori di FIB-4 score >2,67 o di NFS >0,676 identificano soggetti con una elevata probabilità di fibrosi epatica avanzata (F3/

Tabella I - Metodiche disponibili per la diagnosi di fibrosi epatica nella NAFLD.

Metodica per la diagnosi di fibrosi epatica	Vantaggi	Svantaggi	Evidenze sulla correlazione tra fibrosi epatica ed eventi cardiovascolari
Biopsia	Best standard	Invasiva Costi elevati	Forti
RMN	Non invasiva	Costi elevati Poco diffusa	Buone (retrospettive)
NFS	Non invasiva Basso Costo	Ampia zona grigia	Buone in più setting
Fib4	Non invasiva Basso Costo	Ampia zona grigia Disegnato per identificare F4	Buone in più setting
Elastosonografia	Non invasiva Costi contenuti Valutazione "continua" della fibrosi	Poco diffusa Operatore dipendente	Assenti

F4) (Figura 1). Il loro impiego è suggerito dalle Linee-guida per l'identificazione dei soggetti con NAFLD da inviare all'epatolo-

go per una eventuale fibroelastografia e/o biopsia epatica. Essi sono in particolare raccomandati per la valutazione iniziale della

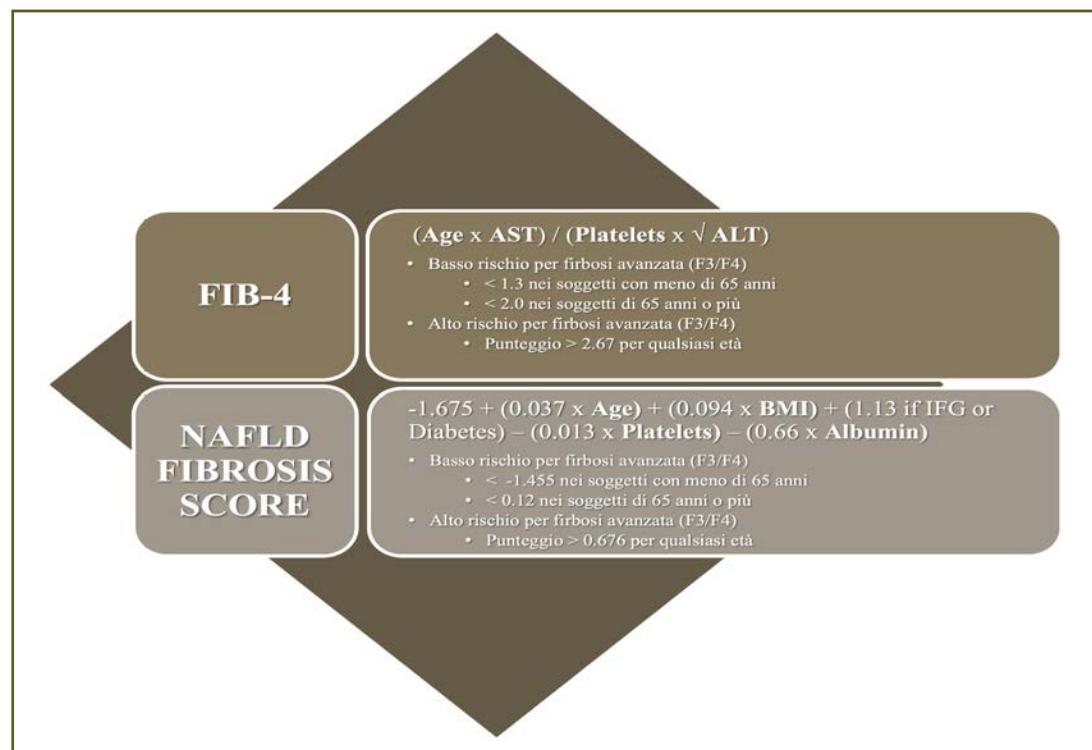


Figura 1 - Formule per il calcolo di FIB-4 e NaflD Fibrosis Score (NFS) per la valutazione non invasiva della fibrosi epatica avanzata nella NAFLD.

fibrosi più severa nei soggetti con diabete, sindrome metabolica ed obesità.

Numerose ricerche hanno dimostrato una associazione tra la fibrosi valutata con i marker non invasivi e i markers surrogati di arteriosclerosi quali lo spessore medio intimale carotideo e il calcium score coronarico (28, 29).

Recentemente, il nostro gruppo, nell'ambito di un follow-up medio di 46 mesi di pazienti arruolati nello studio Plinio, ha dimostrato una più elevata incidenza di eventi cardiovascolari nei soggetti con NAFLD rispetto a quelli senza. Inoltre, nei soggetti con NAFLD si osservava una incidenza di eventi cardiovascolari maggiori 4 volte superiore nei soggetti con FIB-4 score $>2,67$ o NFS $>0,676$, dopo correzione per la presenza di comorbidità (Figura 2) (30).

La capacità di questi due score di predi-

re un aumentato rischio cardiovascolare è stata testata anche in pazienti senza diagnosi certa di NAFLD. L'effetto a lungo termine della NAFLD sulla mortalità è stato analizzato nell'ambito del National Health and Nutrition Examination Survey condotto negli USA nel 1988-1994 (31). Dopo un follow-up medio di 14,5 anni, la diagnosi ecografica di NAFLD non si associava ad un aumento della mortalità. Al contrario, la fibrosi epatica, valutata in modo non invasivo mediante il calcolo del FIB-4, NFS e APRI (AST/piastrine) era un fattore predittivo di mortalità soprattutto cardiovascolare indipendentemente da altre possibili cause di morte. Più di recente, in uno studio di follow up della durata media di 7,5 anni condotto in Cina su pazienti con malattia coronarica stabile, i valori più elevati di NFS e di FIB-4 si associavano ad un aumentato rischio di mortalità cardiovascolare e per tutte le cause (32). Sulla base di questo risultato, gli Autori proponevano la valutazione non invasiva della fibrosi epatica come un semplice strumento per l'identificazione di una prognosi a lungo termine meno favorevole nei pazienti con malattia coronarica. Inoltre, una post-hoc analisi di uno studio osservazionale multicentrico di pazienti con fibrillazione atriale non valvolare arruolati in un registro in Giappone, mostrava una associazione indipendente della fibrosi epatica, valutata mediante il FIB-4, con gli eventi cardiovascolari e con la mortalità per tutte le cause, in particolare tra i pazienti con un maggior rischio di eventi avversi (con un CHADS2 score ≥ 2) (33).

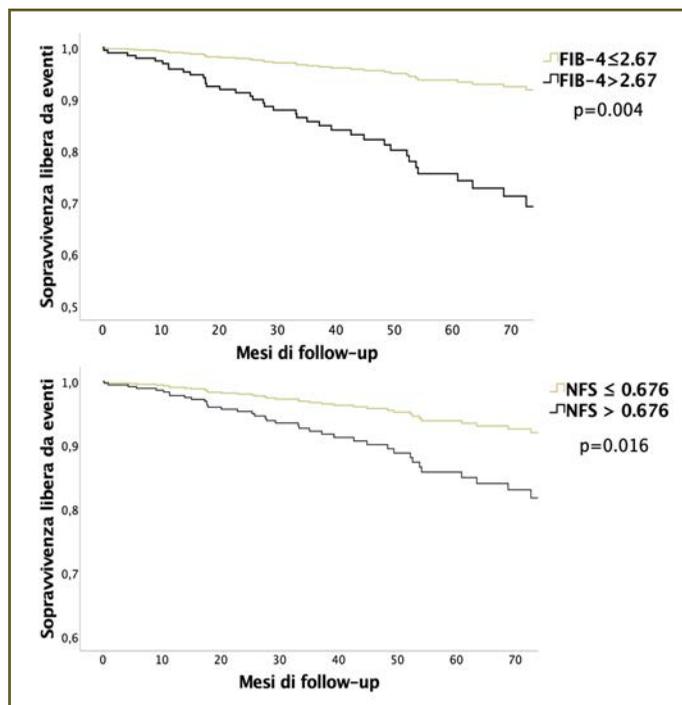


Figura 2 - Sopravvivenza esente da eventi cardiovascolari in base alla presenza o assenza di elevata probabilità di fibrosi epatica avanzata (F3-F4) valutata con gli score FIB-4 o NFS in 660 soggetti con NAFLD.

Fibrosi epatica: un nuovo target nell'ambito del controllo del rischio residuo?

L'esame complessivo della letteratura sembra dimostrare che la NAFLD in assenza di fibrosi significativa non si associa ad un aumento della mortalità epatica e cardiovascolare. Al contrario, la NAFLD

con presenza di fibrosi significativa predice in modo indipendente la mortalità totale e cardiovascolare.

Le evidenze della letteratura suggeriscono l'ipotesi che lo sviluppo della fibrosi epatica nei pazienti con NAFLD possa essere il risultato di un'esposizione a lungo termine a fattori di rischio cardio-metabolici quali il diabete e la sindrome metabolica. Infatti, la presenza concomitante di molteplici condizioni cardio-metaboliche potrebbe indurre uno stato cronico pro-infiammatorio di basso grado e pro-ossidante che potrebbero indurre necro-infiammazione epatica (con attivazione dei macrofagi), attivazione delle cellule stellate e deposizione di collagene. La fibrosi epatica potrebbe quindi essere interpretata come un marker non lipidico di rischio cardiovascolare residuo.

Tutto ciò suggerisce di identificare precocemente i soggetti con NAFLD e fibrosi avanzata in modo da attuare un controllo rigoroso di tutti i fattori di rischio cardiovascolare e iniziare un attento monitoraggio della progressione della fibrosi quale possibile marker di rischio residuo cardiovascolare.

L'associazione tra fibrosi epatica e rischio cardiovascolare apre il campo ad un ulteriore potenziale ruolo delle statine per il trattamento dei pazienti con NAFLD. Recentemente, l'impiego del NFS in 14.819 pazienti arruolati nello studio IMPROVE-IT ha consentito di identificare una sotto-popolazione indipendente di pazienti che erano a più alto rischio di eventi coronarici ricorrenti, che beneficiavano della terapia di combinazione con simvastatina/ezetimibe ottenendo così una riduzione assoluta del 3,7% del rischio di eventi cardiovascolari (34). Inoltre due recenti metanalisi hanno dimostrato che le statine possono ritardare lo sviluppo della fibrosi nei pazienti con malattia epatica cronica di diversa eziologia (35) e che il loro impiego può ridurre il rischio

di sviluppare l'epatocarcinoma (36). Infine, è stato anche ipotizzato che la cirrosi possa rappresentare una nuova indicazione per l'impiego delle statine (37). Pertanto, sembrerebbe che le statine, nei pazienti con NAFLD, possono influenzare favorevolmente sia gli esiti correlati all'evoluzione della malattia epatica, sia quelli correlati agli eventi cardiovascolari. Tuttavia, nonostante queste importanti evidenze, vi è in genere uno scarso atteggiamento nel prescrivere le statine nei pazienti con NAFLD, principalmente a causa della preoccupazione, non documentata, di una loro possibile tossicità nelle malattie del fegato (38, 39).

In conclusione, la grande diffusione della NAFLD nella popolazione generale e, in particolare, nelle popolazioni a rischio (diabete, obesità) suggerisce fortemente di monitorare in modo non invasivo la progressione della fibrosi epatica. L'impiego routinario di test non invasivi consentirà di identificare soggetti con scarsa o assente fibrosi ed escludere ragionevolmente la presenza di un rischio aumentato per eventi cardiovascolari e per gravi complicanze epatiche. Al contrario, la documentazione di una fibrosi severa potrà contribuire a identificare precocemente soggetti a maggior rischio di progressione della malattia epatica e a meglio definire il rischio cardiovascolare residuo.

Glossario

NAFLD: steatosi epatica non alcolica

NASH: steatoepatite non alcolica

ECM: matrice extracellulare

NAS: NAFLD activity score

NFS: NAFLD Fibrosis Score

APRI: rapporto AST/piastrine

AST: transaminasi aspartato-transferasi

CHADS2: score (congestive heart failure, hypertension, age \geq 75 years, diabetes mellitus, stroke)

FIB-4: score per la fibrosi epatica

Questionario di auto-apprendimento

- 1) **A digiuno, il contenuto di colesterolo remnant corrisponde al colesterolo contenuto**
 - a. Nelle LDL
 - b. Nelle VLDL più IDL
 - c. Nei chilomicroni
 - d. Nelle VLDL
- 2) **La NAFLD si associa**
 - a. Ad un'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari
 - b. Ad un'epatite acuta
 - c. A splenomegalia
 - d. A vasculite sistemica
- 3) **Qual è il golden standard per la diagnosi di fibrosi epatica?**
 - a. Il NAFLD score
 - b. Il Fib4 score
 - c. La biopsia epatica
 - d. L'ecografia epatica
- 4) **Il rischio cardiovascolare residuo è aumentato**
 - a. Nel diabete
 - b. Nella NFLD
 - c. Nella sindrome metabolica
 - d. In tutte queste condizioni
- 5) **Nel Fib4 score vengono valutate**
 - a. Età, conta piastrinica, AST, ALT
 - b. Albumina, età, gGT
 - c. Transaminasi, bilirubinemia, BMI, età, fibrinogeno
 - d. Età, ALT, diabete, piastrine

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

RIASSUNTO

La fibrosi epatica è il risultato dell'accumulo delle proteine della matrice extracellulare (ECM) che si verifica nella maggior parte delle patologie croniche del fegato. Nella NAFLD si stima che la fibrosi epatica severa (F2-F3) in Italia coinvolga circa 900.000 soggetti, in massima parte asintomatici. Peraltro, nei pazienti con NAFLD la prima causa di morte è la malattia cardiovascolare e la presenza di fibrosi epatica e la sua severità sembrano essere gli unici markers di danno epatico in grado di predire l'aumentato rischio cardiovascolare. Tuttavia, in molti studi, la diagnosi di fibrosi epatica è stata fondata sul "best standard", ovvero la biopsia epatica e quindi i risultati sono traslabili in maniera limitata all'attività clinica quotidiana. Il FIB-4 e il NFS (NAFLD Fibrosis Score) sono due markers surrogati, non invasivi di fibrosi calcolabili molto agevolmente, a partire da valori di esami di laboratorio di routine e di dati antropometrici ed anamnestici; la fibrosi epatica, valutata in questo modo non invasivo è un fattore predittivo di mortalità soprattutto cardiovascolare.

In conclusione, la NAFLD in assenza di fibrosi significativa non si associa ad un aumento della mortalità epatica e cardiovascolare, mentre, al contrario, la NAFLD con presenza di fibrosi significativa predice in modo indipendente la mortalità totale e cardiovascolare. La fibrosi epatica potrebbe quindi essere interpretata come un marker non lipidico di rischio cardiovascolare residuo, definito come il rischio che permane dopo il trattamento multifattoriale ottimale di tutti i fattori di rischio coesistenti nel singolo individuo.

Parole Chiave: *Fibrosi epatica, NAFLD, Rischio cardiovascolare residuo, Fib4 score, NAFLD score.*

Bibliografia

- Lieb W, Enserro DM, Larson MG, et al. Residual cardiovascular risk in individuals on lipid-lowering treatment: quantifying absolute and relative risk in the community, *Open Heart*. 2018; 5: e000722.
- Vanuzzo, D, The epidemiological concept of residual risk, *Intern Emerg Med*. 2011; 6 (Suppl. 1): 45-51.
- Hernández-Mijares A, Ascaso JF, Blasco M, et al. Residual cardiovascular risk of lipid origin. Components and pathophysiological aspects, *Clin Investig Arterioscler*. 2019; 31: 75-88.
- Lin FJ, Tseng WK, Yin WH, et al. Residual Risk Factors to Predict Major Adverse Cardiovascular Events in Atherosclerotic Cardiovascular Disease Patients with and without Diabetes Mellitus, *Sci Rep*. 2017; 7: 9179.
- McPherson R. Remnant cholesterol: "Non-(HDL-C + LDL-C)" as a coronary artery disease risk factor, *J Am Coll Cardiol*. 2013; 61: 437-439.
- Friedman SL Liver fibrosis - from bench to bedside, *J Hepatol*. 2003; 38 (Suppl. 1): S38-53.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis, *J Clin Invest*. 2005; 115: 209-218.
- Noureddin M, Vipani A, Bresee C, et al. NASH Leading Cause of Liver Transplant in Women: Updated Analysis of Indications For Liver Transplant and Ethnic and Gender Variances, *Am J Gastroenterol*. 2018; 113: 1649-1659.
- Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030, *J Hepatol*. 2018; 69: 896-904.
- Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective, *J Hepatol*. 2019; 70: 531-544.
- Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up, *Hepatology*. 2015; 61: 1547-1554.
- Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis, *Hepatology*. 2017; 65: 1557-1565.
- Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Gastroenterology*. 2015; 149: 389-397.e310.
- Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16: 411-428.
- Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, et al. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease, *World J Gastroenterol*. 2017; 23: 8263-8276.
- Ekstedt M, Nasr P, Kechagias S, Natural History of NAFLD/NASH, *Curr Hepatol Rep*. 2017; 16: 391-397.
- Adams LA, Anstee QM, Tilg H, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases, *Gut*. 2017; 66: 1138-1153.
- Wu S, Wu F, Ding Y, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with major adverse cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis, *Sci Rep*. 2016; 6: 33386.
- Targher G, Byrne CD, Lonardo A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis, *J Hepatol*. 2016; 65: 589-600.
- Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up, *Hepatology*. 2015; 61: 1547-1554.
- Vilar-Gomez E, Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study, *Gastroenterology*. 2018; 155: 443-457.e417.
- Verma S, Jensen D, Hart J, et al. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Liver Int*. 2013; 33: 1398-1405.
- Ostovaneh MR, Ambale-Venkatesh B, Fuji T, et al. Association of Liver Fibrosis With Cardiovascular Diseases in the General Population: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), *Circ Cardiovasc Imaging*. 2018; 11: e007241.
- Singh A, Gosai F, Siddiqui MT, et al. Accuracy of Noninvasive Fibrosis Scores to Detect Advanced Fibrosis in Patients With Type-2 Diabetes With Biopsy-proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *J Clin Gastroenterol*. 2020.
- McPherson S, Stewart SF, Henderson E, et al. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease, *Gut*. 2010; 59: 1265-1269.
- Siddiqui MS, Yamada G, Vuppalanchi R, et al. Diagnostic Accuracy of Noninvasive Fibrosis Models to Detect Change in Fibrosis Stage, *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019.
- Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that

- identifies liver fibrosis in patients with NAFLD, *Hepatology*. 2007; 45: 846-854.
28. Song DS, Chang UI, Kang SG, et al. Noninvasive Serum Fibrosis Markers are Associated with Coronary Artery Calcification in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Gut Liver*. 2019; 13: 658-668.
 29. Sesti G, Sciacqua A, Fiorentino TV, et al. Association between noninvasive fibrosis markers and cardio-vascular organ damage among adults with hepatic steatosis, *PLoS One*. 2014; 9: e104941.
 30. Baratta F, Pastori D, Angelico F, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Fibrosis Associated With Increased Risk of Cardiovascular Events in a Prospective Study, *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019.
 31. Kim D, Kim WR, Kim HJ, et al. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States, *Hepatology*. 2013; 57: 1357-1365.
 32. Chen Q, Li Q, Li D, et al. Association between liver fibrosis scores and the risk of mortality among patients with coronary artery disease, *Atherosclerosis*. 2020; 299: 45-52.
 33. Saito Y, Okumura Y, Nagashima K, et al. Impact of the Fibrosis-4 Index on Risk Stratification of Cardiovascular Events and Mortality in Patients with Atrial Fibrillation: Findings from a Japanese Multicenter Registry, *J Clin Med*. 2020; 9.
 34. Simon TG, Corey KE, Cannon CP, et al. The nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) fibrosis score, cardiovascular risk stratification and a strategy for secondary prevention with ezetimibe, *Int J Cardiol*. 2018; 270: 245-252.
 35. Markova AA, Deterding K, Port K, et al. Liver stiffness across different chronic liver disease under therapy with statin in a real life cohort, *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020.
 36. Islam, MM, Poly, TN, Walther, BA, et al., Statin Use and the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis of Observational Studies, *Cancers (Basel)*. 2020; 12.
 37. Bosch J, Gracia-Sancho J, Abraldes JG. Cirrhosis as new indication for statins, *Gut*. 2020; 69: 953-962.
 38. Del Ben M, Baratta F, Polimeni L, et al. Underprescription of statins in patients with non-alcoholic fatty liver disease, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017; 27: 161-167.
 39. Pastori, D, Polimeni, L, Baratta, F, et al. The efficacy and safety of statins for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease, *Dig Liver Dis*. 2015; 47: 4-11.

DISLIPIDEMIE IN PEDIATRIA

PRATICA CLINICA IN AMBULATORIO PEDIATRICO PER LE DISLIPIDEMIE

Clinical approach to the pediatric patient with dyslipidemia

**CRISTINA PEDERIVA, CLAUDIA VIGGIANO, ROBERTO ROMANO,
ROSSELLA LAMBERTI, MARINA CROSA, GIUSEPPE BANDERALI**

U.O. Clinica Pediatrica, Servizio Clinico Dislipidemie per lo Studio e la Prevenzione dell'Aterosclerosi in età pediatrica, ASST Santi Paolo e Carlo, Milano, Università degli Studi di Milano

SUMMARY

Cardiovascular disease (CVD) is still the most prominent cause of death and morbidity in the world, there is a strong evidence that it begins in childhood and the major risk factor is hypercholesterolemia. Early detection and treatment of familial hypercholesterolemia (FH) can reduce LDL-burden, can improve endothelial function, can substantially attenuate the progression of atherosclerosis and improve coronary outcomes. Multiple screening strategies have been proposed, but in most population only a small proportion of all cases have been identified. In 2008, the APP published the criteria for targeted screening, while some experts recommend universal screening particularly in the young, although cost effectiveness has not been analysed. The first test, to perform between 2 and 10 years of age, is the lipid profile: total cholesterol, LDL-C, HDL-C, triglycerides plasma levels. Hypercholesterolemia had to be confirmed with a second sample and followed by the detection of family history for early (before 55y in men and 60y in women) or subsequent cardio-vascular events and/or hypercholesterolemia in 1st and 2nd degree relatives. The treatment consists of a healthy lifestyle and a prudent low-fat diet, emphasizing the Mediterranean diet. Statins are the cornerstone of the drug therapy approved in USA and in Europe for use in children, ezetimibe or a bile acid sequestrant may be required to attain LDL-C goal in some patients. Periodic (six-monthly/annual) visits are recommended for the control of growth, for the evaluation of the lipid profile and the adherence to treatment in particular for those patients playing sport or use other medications, in order to maintain therapy for a long period, until adulthood.

Keywords: *Hypercholesterolaemia, Children, Screening, Management, CVD.*

Introduzione

La cardiovasculopatia aterosclerotica (CVD) rappresenta ancora oggi la prima causa di mortalità e morbilità dell'adulto nei paesi industrializzati (1). Le strategie di prevenzione attuate per la popolazione

Indirizzo per la corrispondenza

Cristina Pederiva
Clinica Pediatrica-ASST Santi Paolo e Carlo
Via A. Di Rudini, 8 - 20145 Milano
E-mail: cristinapederiva@yahoo.it

Bullet Points

- La precoce identificazione dei bambini con ipercolesterolemia dovrebbe garantire un'aderenza a stili di vita corretti instaurata prima della pubertà, così da aumentare la probabilità che possa mantenersi nel tempo.
- Nei bambini con ipercolesterolemia si dovrebbe intervenire prima sulla dieta e sullo stile di vita e successivamente con terapia farmacologica con statine dagli 8-10 anni di età.
- Nei bambini con ipercolesterolemia è utile il dosaggio della Lp(a) per la stratificazione del rischio.
- I bambini di sesso maschile e femminile dovrebbero iniziare la terapia alla stessa età.
- Per i bambini di età compresa tra 8 e 10 anni, è raccomandata una riduzione del 50% del LDL-C rispetto ai valori iniziali.
- Per i bambini di età >10 anni, specialmente se vi sono fattori di rischio cardio-vascolari addizionali, il target di LDL-C è <130 mg/dl.
- Se il target non viene raggiunto, valutare la aderenza alla terapia; in alcuni casi può essere utile la doppia terapia.

adulta hanno portato a una riduzione della mortalità per CVD. È ormai ampiamente dimostrato che il processo aterosclerotico inizia in età pediatrica ed è progressivo. Fin dalla vita fetale, una costante esposizione delle pareti arteriose ad elevati livelli di co-

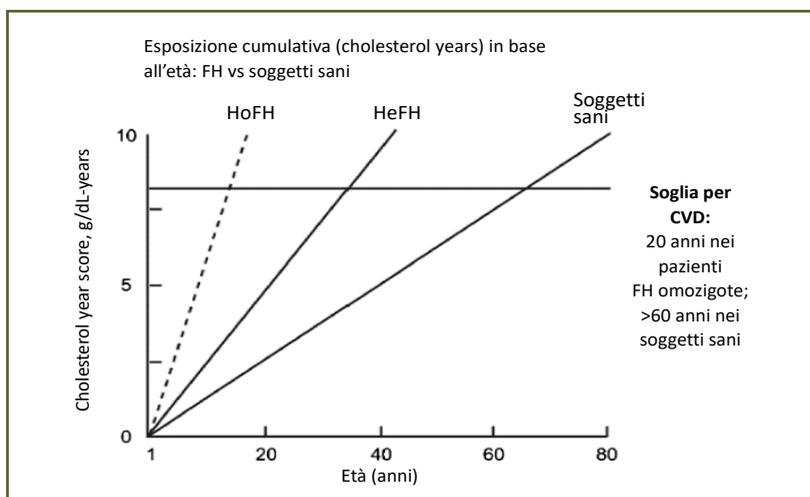
lesterolo LDL accelera lo sviluppo di lesioni a livello endoteliale, specialmente nelle coronarie e nell'aorta, con conseguente comparsa di aterosclerosi precoce (2, 3).

Studi autoptici hanno dimostrato la presenza di placche aterosclerotiche anche nei bambini e che la loro estensione è associata ai livelli di colesterolo LDL (4). Inoltre, un recente lavoro ha rilevato che lo spessore medio-intimale carotideo (cIMT) è più elevato in pazienti con ipercolesterolemia familiare rispetto ai controlli normolipemici. Questa differenza, che è direttamente correlata ai livelli di LDL-C, diventa statisticamente significativa a partire dai 10 anni di età e addirittura a partire dagli 8 anni nei bambini con ipercolesterolemia familiare (FH) rispetto ai fratelli non affetti (5, 6).

Come si osserva nella *figura 1*, vi è una correlazione diretta tra esposizione al colesterolo LDL (espressa come aumento in grammi di LDL-C per anno) e la soglia per lo sviluppo di malattia coronarica, in individui affetti dalla forma eterozigote di FH, individui affetti dalla forma omozigote di FH e individui sani (7).

Alla luce di questi dati, l'individuazione precoce dei soggetti ad alto rischio cardiovascolare risulta fondamentale: il tratta-

Figura 1 - Adattata da: A. Wiegman. *Lipid Screening, Action, and Follow-up in Children and Adolescents. Curr Cardiol Rep. 2018; 20: 80.*



mento tempestivo in termini di modificazione dello stile di vita, di acquisizione di abitudini alimentari adeguate e, dove necessario, di terapia farmacologica già a partire dall'età pediatrica, può modificare la storia naturale della malattia e ridurre gli eventi cardiovascolari in età adulta (8).

Dislipidemie primitive e secondarie

Le dislipidemie possono essere distinte in forme primitive e secondarie.

Le forme primitive sono geneticamente determinate e possono essere distinte in monogeniche e poligeniche. La *tabella 1* (9) mostra le forme più frequenti.

Tra le forme primitive, l'ipercolesterolemia Familiare (FH) rappresenta una delle più comuni, è caratterizzata da un'alterazione del trasporto e del metabolismo del

colesterolo e da una ridotta capacità del fegato di rimuovere dalla circolazione le lipoproteine aterogene ricche in colesterolo (LDL), con conseguente accumulo di LDL-colesterolo in circolo.

La forma eterozigote della FH (HeFH) è un disordine frequente, presente in ~1:200-250 individui della popolazione generale. La forma omozigote (HoFH) è molto più rara, con una prevalenza pari a 1:160000-300000. Nella maggior parte dei casi la FH è causata da mutazioni (finora ne sono state individuate 1700) nel gene del recettore LDL (gene LDLR), localizzato sul cromosoma 19 (10). Tali mutazioni determinano l'assenza di recettori o la formazione di recettori non funzionanti sulla superficie degli epatociti, essendo il fegato il principale organo responsabile del catabolismo delle LDL. Nel 5% dei

TABELLA I. Adattata da: 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): S213-S256.

Principali forme di dislipidemie primitive in bambini e adolescenti	
Dislipidemie primitive	Profilo lipidico
Ipercolesterolemia familiare	
Forma omozigote	↑ ↑ LDL colesterolo
Forma eterozigote	↑ LDL colesterolo
Deficit familiare di apolipoproteina B	↑ LDL colesterolo
Iperlipidemia familiare combinata	
Tipo IIa	↑ LDL colesterolo
Tipo IIb	↑ LDL, ↑ VLDL colesterolo, ↑ trigliceridi
Tipo IV	↑ VLDL colesterolo, ↑ trigliceridi
Tipo IIb e IV	↓ HDL colesterolo
Ipercolesterolemia poligenica	↑ LDL colesterolo
Ipertrigliceridemia familiare	↑ VLDL colesterolo, ↑ trigliceridi
Ipertrigliceridemia severa	↑ chilomicroni, ↑ VLDL colesterolo, ↑ ↑ trigliceridi
Ipoalfalipoproteinemia familiare	↓ HDL colesterolo
Disbetalipoproteinemia	↑ IDL colesterolo, chilomicroni remnants

casi, l'FH è causata da mutazioni nel gene codificante l'Apolipoproteina B (gene APOB), che costituisce il 40% della frazione proteica delle lipoproteine, fungendo da ligando per i recettori delle LDL. In circa l'1% dei casi è mutata la proteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (gene PCSK9), che regola la degradazione del recettore LDL, modulando il numero di recettori sulla membrana cellulare degli epatociti. Mutazioni del gene codificante la proteina adattatrice del recettore LDL (gene LDLRAP1) sono responsabili della rara forma di FH recessiva. Infine, il 5-30% dei casi di FH può derivare da mutazioni

in altri geni ancora non identificati oppure può avere una causa poligenica (8).

Le forme secondarie, dette anche acquisite, sono causate da patologie concomitanti che provocano un'alterazione del profilo lipidico o cause esogene, quali le forme iatrogene o associate all'eccessivo consumo di grassi saturi. La *tabella 2* (9) mostra le forme più frequenti.

Identificazione dei soggetti a rischio

Il riconoscimento precoce dei soggetti a rischio risulta fondamentale. Negli anni sono stati proposte e messe in atto diverse

Tabella 2 - Adattata da: 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): S213-S256.

Eziologia	Condizione
"Diet" (Dieta)	
	Ad alto contenuto di grassi saturi Ipercalorica Eccesso di carboidrati Eccesso di assunzione di alcol Anoressia nervosa
"Disease" (malattia)	
Cardiaca	Malattia di Kawasaki Trapianto di cuore Cardiopatía congenita
Epatica	Colestasi intraepatica Epatopatia cronica Cirrosi biliare primitiva Atresia biliare Sindrome di Alagille
Renale	Insufficienza renale cronica Sindrome nefrosica Sindrome emolitico-uremica
Infezioni	Infezione acuta (virale o batterica) Epatite acuta/cronica Infezione da HIV
Reumatologica	Lupus eritematoso sistemico Artrite reumatoide
"Disease" (malattia)	
Da accumulo	Glicogenosi Malattia di Gaucher Malattia di Tay-Sachs Malattia di Niemann-Pick
Altro	Post-terapia oncologica Sindrome di Klinefelter Sindrome di Werner Progeria Ustioni
"Drugs" (Farmaci)	
	Corticosteroidi Diuretici tiazidici β-bloccanti Resine leganti acidi biliari Contraccettivi orali Inibitori delle proteasi Derivati dell'acido retinoico Anticonvulsivanti
"Dysmetabolism" (dismetabolismo)	
	Obesità Ipotiroidismo Diabete tipo 1 e tipo 2 Insulino-resistenza Porfiria acuta intermittente Ipopituitarismo Lipodistrofia

strategie di screening. L'American Academy of Pediatrics (11) nel 2008 ha identificato i criteri per l'esecuzione di uno screening mirato nei confronti di:

- 1) bambini o adolescenti i cui genitori e/o nonni sono stati sottoposti a by-pass coronarico o angioplastica prima dei 55 anni;
- 2) bambini o adolescenti con storia familiare di infarto miocardico, angina pectoris, malattia vascolare cerebrale o periferica o morte improvvisa prima dei 55 anni;
- 3) bambini o adolescenti i cui genitori hanno alti livelli di colesterolo totale (>240 mg/dl);
- 4) bambini o adolescenti con storia familiare non nota ma con due o più fattori di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari tra cui BMI >30 kg/m², bassi livelli di colesterolo HDL, diabete mellito, ipertensione, inattività fisica e fumo di sigaretta;
- 5) l'ultima categoria specifica di bambini, comprende quelli "a rischio speciale" cioè obesi o anche solo sovrappeso, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio cardiovascolare.

L'esecuzione di uno screening universale è tuttora controversa. Faciliterebbe l'identificazione dei soggetti a rischio, in particolare quei bambini con forme genetiche che potrebbero andare persi ad uno screening selettivo, soprattutto se i loro genitori sono giovani, senza evidenza di malattia cardiovascolare e ignari dei propri livelli di lipidi plasmatici e potrebbe portare all'attenzione medica anche i loro familiari adulti a maggiore rischio coronarico. Allo stesso tempo risulta un approccio molto costoso.

Come in molti paesi europei, anche in Italia è stata creata una rete (Network LIPIGEN: LIPid transport disorders Italian Genetic Network) (12) che comprende centri

specializzati nella gestione di pazienti affetti da dislipidemie primitive in tutto il territorio nazionale, incoraggiando lo scambio di informazioni e la promozione di attività in linea con protocolli condivisi secondo le raccomandazioni delle società scientifiche. Tale rete consente la diffusione di informazioni e conoscenze tra i partecipanti e in ultima analisi migliora la possibilità di diagnosi di tali malattie, in particolare dei pazienti con ipercolesterolemia familiare. Lo studio LIPIGEN è stato ideato per creare un *database* nazionale dei pazienti affetti da FH per approfondirne le caratteristiche fenotipiche e genetiche e per contribuire a sensibilizzare i professionisti della sanità e la popolazione (13, 14).

Il consensus dell'European Atherosclerosis Society del 2015 conclude affermando che lo screening nella popolazione pediatrica dovrebbe essere un intervento specifico per ogni paese, utilizzando tutte le strategie disponibili, incluso lo screening selettivo nel contesto di una famiglia con anamnesi familiare positiva, e lo screening a cascata basato su test genetico dove disponibile. Lo screening universale potrebbe essere considerato dall'età di 10 anni nei paesi ove questo è possibile, specialmente laddove è presente una frequenza di FH elevata come nel Quebec (Canada), Sud Africa e Libano (8).

Come screening iniziale è consigliabile la determinazione dei livelli di colesterolo totale, colesterolo LDL, colesterolo HDL e trigliceridi. Il periodo ottimale per eseguire questo tipo di screening è l'età compresa tra i 2 e i 10 anni, in quanto minimi sono gli effetti attribuibili alla dieta o influenze ormonali. Infatti, prima dei 2 anni i valori possiedono ancora una significativa variabilità intra- e inter-individuale e spesso non riflettono i valori reali del soggetto che si stabilizzeranno nelle età successive. Inoltre, qualunque tipo di intervento dietetico

restrittivo non è comunque raccomandabile prima dei 2 anni. La determinazione del profilo lipidico dopo i 10 anni può essere influenzata dall'attivazione degli ormoni sessuali che si verifica durante lo sviluppo puberale (15).

Management del bambino con ipercolesterolemia

La gestione del bambino con ipercolesterolemia prevede due livelli di intervento:

- una valutazione generale volta a individuare i soggetti a rischio (pediatra di base - programmi di screening);
- una valutazione specifica dei soggetti ad alto rischio cardiovascolare e/o affetti da ipercolesterolemia severa (centro specialistico).

Di fronte a un bambino/adolescente con ipercolesterolemia *Tabella 3* (9): valori di riferimento a digiuno), risulta fondamentale l'approfondimento della storia familiare attraverso l'anamnesi mirata alla ricerca di eventi cardiovascolari (angina, infarto, ictus) precoci (nell'uomo età <55 anni, nella donna <60 anni) o successivi e/o ipercolesterolemia nei parenti di I e II grado.

Successivamente, il dato biochimico (ipercolesterolemia), deve essere confer-

mato (anche a distanza di alcuni mesi) con un prelievo ematico eseguito a digiuno e contestualizzato per il singolo paziente attraverso la valutazione clinica (parametri antropometrici, stadio puberale) ed escludendo le possibili cause secondarie quali ipotiroidismo, sindrome nefrosica, epatopatia, obesità, anoressia nervosa, trattamenti farmacologici. Questo inquadramento di base risulta poco costoso e applicabile da parte del pediatra di base o dal medico che segue il bambino/adolescente, nei controlli di crescita/bilanci di salute.

Il riscontro di ipercolesterolemia in un paziente con storia familiare positiva per CVD e/o ipercolesterolemia merita sempre un approfondimento diagnostico. La flow-chart (*Figura 2*) ripresa dal consensus EAS 2015 risulta pienamente attuale (8).

Intervento specialistico

Il bambino con ipercolesterolemia e familiarità per ipercolesterolemia e/o CVD viene valutato al primo accesso presso il nostro Centro di Dislipidemie Pediatriche mediante un approfondimento anamnestico, che prevede anamnesi mirata al rischio CVD e presa visione del quadro lipidico di entrambi i genitori. Il paziente viene quindi

Tabella 3 - Adattata da: 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): S213-S256.

Categoria	Accettabile	Border Line	Alto
Colesterolo totale (mg/dl)	<170	170-199	≥200
LDL-colesterolo (mg/dl)	<110	110-129	≥130
Non HDL-colesterolo (mg/dl)	<120	120-144	≥145
Trigliceridi (mg/dl)			
0-9 anni	<75	75-99	≥100
10-19 anni	<90	90-129	≥130
HDL- colesterolo (mg/dl)	≥45	40-44	<40

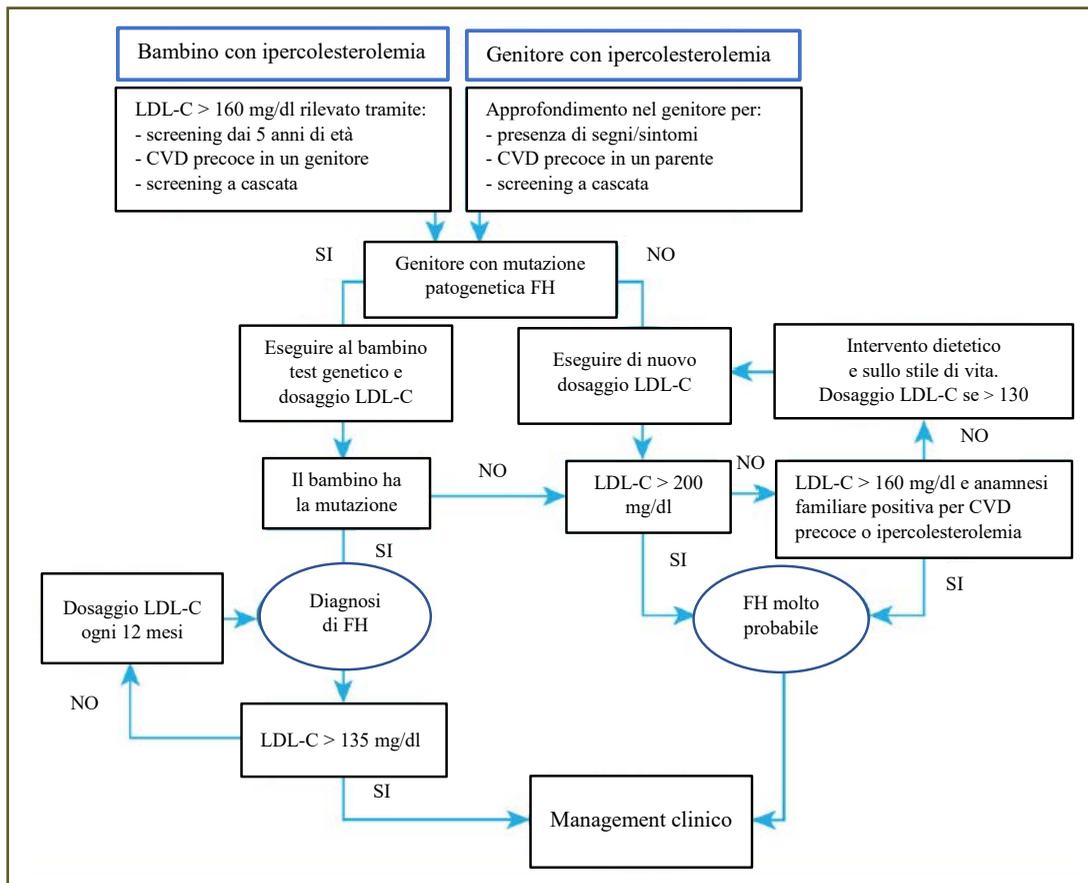


Figura 2 - Adattato da: A. Wiegman et Al. *Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment.* *Eur Heart J.* 2015; 36: 2425-2437.

inserito in un programma di approfondimento diagnostico per migliorare l'inquadramento clinico (Tabella 4).

Vengono inoltre date alcune indicazioni dietetico-nutrizionali che saranno successivamente puntualizzate ed individualizzate in base alla scomposizione del questionario delle frequenze alimentari (FFQ).

A distanza di 6-8 mesi dall'inquadramento iniziale, il paziente viene rivalutato ambulatorialmente per chiarimento in merito alla diagnosi e impostazione del programma di follow-up, che prevede almeno 6 mesi di intervento nutrizionale e successivamente, se necessario, l'inizio della terapia farmacologica. L'intervento dietetico-

nutrizionale deve essere modulato in base all'età del bambino e alle esigenze della famiglia che di frequente, facendo riferimento al genitore affetto, tende a restrin-

Tabella 4 - Programma di approfondimento diagnostico.

Esami ematochimici di base
Profilo lipidico completo
Funzionalità tiroidea
Dosaggio Lp(a)
Dosaggio ApoA e ApoB
Dosaggio omocisteina
Ricerca di mutazione nei geni LDL-R, ApoE e MTHFR
ECG
Compilazione di FFQ

gere l'intake di latticini e carne, e deve essere revisionato regolarmente dal pediatra con esperienza nutrizionale o da un dietista esperto in nutrizione clinica.

La terapia farmacologica viene proposta in accordo con le linee guida e discussa con entrambi i genitori e con il bambino/adolescente al fine di ottenere la massima compliance.

Nel follow-up è previsto un controllo semestrale/annuale per la valutazione della crescita, il monitoraggio dell'aderenza alle indicazioni nutrizionali e l'aggiustamento della terapia farmacologica.

Trattamento

Un trattamento precoce può ridurre l'impatto negativo di elevati livelli di LDL-C, migliorando la funzione endoteliale, rallentando in modo sostanziale la progressione dell'aterosclerosi e riducendo il rischio di malattia cardiovascolare (8).

Terapia dietetica e stile di vita

La dieta e la promozione di uno stile di vita sano rappresentano un cardine nella gestione dei bambini con ipercolesterolemia. Dal punto di vista dietetico-nutrizionale l'obiettivo è quello di instaurare delle abitudini alimentari corrette che abbiano le maggiori probabilità di mantenersi nel tempo, fino all'età adulta. È opportuno limitare il consumo di alimenti ad alto contenuto in grassi saturi, in quanto principali responsabili dell'incremento della colesterolemia. Pertanto, si raccomanda una dieta prudente ipolipidica (<30% calorie in grassi totali, <7% di calorie derivato da grassi saturi, 200 mg di colesterolo per giorno), incoraggiando l'apporto di frutta, verdura, cereali non raffinati, latte e derivati a ridotto contenuto in grassi, legumi, pesce, e carni magre (8). La tradizionale dieta mediterranea costituisce il modello

ideale in quanto propone un'alimentazione ricca di tali alimenti, un ridotto consumo di sale e condimenti nella preparazione degli alimenti, preferendo l'olio extravergine di oliva e le cotture al vapore, al forno e in umido.

La dieta ideale (15) dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- quota proteica pari al 12-14% delle calorie totali (con un rapporto tra proteine animali e vegetali di circa 1:1);
- quota glucidica pari al 55-60% circa delle calorie totali, principalmente di tipo complesso (rapporto ideale 3:1 fra complessi e semplici);
- quota lipidica inferiore al 30%, ma non al di sotto del 25%, delle calorie totali, suddivisa fra acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi: sarebbe ottimale un apporto di saturi <10%, di monoinsaturi tra il 10% e il 15% e di polinsaturi fra il 5 e il 10% delle calorie totali giornaliere.

Dal punto di vista pratico vengono consigliati 4 pasti principali: colazione, pranzo, merenda e cena più 1 spuntino; le calorie giornaliere vanno ripartite correttamente: 20% tra colazione e spuntino, 40% a pranzo, 10% a merenda e 30% a cena.

I 14 piatti settimanali dovranno essere variati tra carne magra (3 volte/settimana), pesce (3-4 volte/settimana) ricco in DHA (pesce azzurro, merluzzo, salmone, tonno evitando crostacei e molluschi), legumi (3-4 volte/settimana), formaggi magri (1-2 volte/settimana), affettati (1-2 volte/settimana, preferendo bresaola o prosciutto crudo) e l'uovo (1/settimana) (15).

Nei bambini di età <2 anni non è raccomandata alcuna restrizione dietetica di grassi e colesterolo per il rischio di deficit staturponderale e di un rallentamento dello sviluppo.

L'utilizzo di nutraceutici può essere preso in considerazione per breve periodo come integrazione all'intervento nutrizio-

nale anche se mancano indicazioni specifiche per l'età pediatrica.

L'efficacia delle fibre alimentari (psyllium, glucomannano, avena, gomma guar) sul miglioramento del profilo lipidico è stata dimostrata in diversi studi dalla riduzione dei livelli di CT e LDL (16, 17) ed è riconosciuta dalla European Food Safety Authority (18).

L'integrazione con steroli vegetali (1-2 g/die) (19, 20) riduce i livelli di CT in bambini con ipercolesterolemia lieve e in bambini affetti da FH, ma la sicurezza a lungo termine è stata messa in discussione (21).

Infine, l'efficacia di altre sostanze nutraeutiche quali il riso rosso fermentato (RYR) (22, 23), acidi grassi polinsaturi a lunga catena (PUFA) (24) omega-3 e omega-6, proteine della soia (25, 26) e probiotici (27) è stata testata in bambini dislipidemicici risultando una opzione possibile per migliorare il profilo lipidico sempre in aggiunta ad adeguato intervento dietetico-nutrizionale.

Molto importante è anche la valutazione dello stile di vita del paziente promuovendo l'attività fisica e riducendo o se possibile eliminando le condizioni correlate al rischio di CVD, come l'inattività fisica, un'eccessiva sedentarietà, il fumo, l'ipertensione, l'obesità e il diabete.

La precoce identificazione dei bambini con ipercolesterolemia dovrebbe garantire che l'aderenza a stili di vita corretti sia instaurata prima della pubertà, così da aumentare la probabilità che possa mantenersi nel tempo (8).

Terapia farmacologica

Per molti anni gli unici farmaci autorizzati per il trattamento dell'ipercolesterolemia in età pediatrica erano le resine a scambio ionico e in particolare in Europa la colestiramina. Tali farmaci che agiscono sequestrando gli acidi biliari, pur non pro-

vocando effetti collaterali sistemici, sono gravati da scarsa palatabilità e possono determinare disturbi gastro-intestinali.

Attualmente le statine rappresentano la terapia principale, hanno un'azione ipolipidemizzante attraverso l'inibizione della biosintesi endogena di colesterolo e l'*up-regolazione* dei recettori LDL localizzati a livello degli epatociti. Simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina e rosuvastatina, sono approvate in USA ed Europa per l'impiego in età pediatrica. Negli USA, sono approvate in bambini di età superiore ai 10 anni, con l'eccezione della pravastatina che può essere utilizzata a partire dagli 8 anni. In Europa, la rosuvastatina è stata approvata anche a partire dai 6 anni di età (28). La terapia con statine in età pediatrica si è dimostrata sicura, almeno nel breve e medio periodo. Un recente studio ha dimostrato il beneficio nell'inizio precoce della terapia con statine sulla riduzione del rischio cardiovascolare in età adulta (29).

Il trattamento dovrebbe iniziare con la dose più bassa raccomandata e in seguito la dose dovrebbe essere titolata in accordo con la riduzione dei livelli di LDL-C e la tollerabilità. Le linee guida raccomandano un target di LDL-C <130 mg/dL dall'età di 10 anni, o idealmente una riduzione del 50% rispetto ai valori pre-trattamento nei bambini di 8-10 anni (8). In alcuni casi, per il raggiungimento dei livelli target di LDL-C può essere necessaria una duplice terapia con l'aggiunta di ezetimibe o di resine (30, 31). L'ezetimibe, che inibisce selettivamente l'assorbimento intestinale di colesterolo, è approvato per l'uso a partire dall'età di 10 anni, è un farmaco ben tollerato con minimi effetti collaterali.

Nella pratica clinica, la proposta della terapia farmacologica deve essere sempre ben ponderata e motivata/discussa con i genitori e con il paziente. Infatti, frequen-

temente i genitori dei bambini (soprattutto dei più piccoli) possono avere difficoltà ad accettare la terapia con farmaci mentre gli adolescenti possono presentare uno scarso interesse nei confronti della patologia e una più bassa aderenza alla terapia.

Nei casi più gravi, in particolare nelle forme di ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH), può essere necessaria la LDL-afèresi, a partire dall'età di 2 anni nei centri specializzati. Due nuovi farmaci, la lomitapide (per via orale), un inibitore della proteina di trasferimento dei trigliceridi (MTP), e il mipomersen (per via sottocutanea), oligo-nucleotide anti mRNA, aventi entrambi come "bersaglio" la produzione epatica di lipoproteine contenenti apoB, sono stati approvati di recente come farmaci aggiuntivi nella terapia della HoFH. Nel campo delle nuove terapie in corso di sviluppo, quelle a base di anticorpi monoclonali contro PCSK9 (alirocumab, evolucumab e più di recente bococizumab) si sono mostrate promettenti, riducendo sia il livello di LDL-C che quello di Lp(a) (8).

Follow-up

Sono raccomandate visite periodiche (semestrali/annuali) per la valutazione del profilo lipidico, dell'aderenza al trattamento e per il controllo della crescita. Di fondamentale importanza è il monitoraggio dell'aderenza e della tollerabilità dei farmaci ipolipemizzanti, in particolare per coloro che svolgono attività sportiva intensa o assumono altri farmaci.

In età pediatrica gli effetti collaterali delle statine sono rari, ma dal momento che i più sono le miopatie e l'epatotossicità, è opportuno eseguire un dosaggio basale di transaminasi e CPK e successivamente monitorarne i livelli plasmatici durante la terapia (32).

Alle dosi raccomandate di statine la curva dose-risposta non è lineare: la gran parte

della riduzione dei livelli di LDL-C si verifica alle dosi più basse, mentre successivamente, anche raddoppiando la dose, si ottengono riduzioni del 6-7% (33). Pertanto, la necessità di intensificare il trattamento con dosi più elevate di statine dovrebbe essere valutata tenendo conto dei possibili effetti collaterali a lungo termine dovuti alla più prolungata esposizione al farmaco. L'aderenza e la risposta alla terapia con statine dovrebbero essere accuratamente valutate con maggiore attenzione nei bambini nei quali non si raggiunge il "target" di LDL-C, nonostante l'impiego di più farmaci.

Pazienti pediatriche con una FH non complicata e ben controllata possono essere gestiti dai medici responsabili delle cure primarie. Mentre i pazienti con livelli di LDL-C particolarmente elevati, che presentano multipli fattori di rischio cardiovascolare o complicanze della terapia farmacologica oppure gli affetti da HoFH, dovrebbero essere gestiti da specialisti che includano pediatri con competenze cardiologiche e lipidologiche.

Transizione

Gli adolescenti e i giovani adulti spesso dimostrano uno scarso interesse nei confronti dell'assistenza sanitaria e in questo periodo la *compliance* potrebbe essere scarsa. È per tale motivo che è opportuno educare i pazienti fin dall'infanzia sottolineando l'importanza della terapia, in modo da migliorare la loro aderenza a lungo termine (32).

Durante l'adolescenza, per i pazienti di sesso femminile in terapia farmacologica, devono essere sottolineati i possibili effetti teratogeni delle statine, se necessario si possono consigliare metodi contraccettivi. Allo stesso tempo, in caso di utilizzo di contraccettivi orali è fortemente raccomandato uno stretto controllo del profilo lipidico

perché questi possono determinare un consistente aumento dei livelli di trigliceridi e di LDL-C. Inoltre, è opportuno segnalare che l'uso delle statine dovrebbe essere interrotto almeno 3 mesi prima dell'eventuale concepimento e sospeso durante l'intera gravidanza ed allattamento (34). Proprio in considerazione dell'eventuale sospensione della terapia farmacologica durante tale periodo, nel paziente di sesso femminile è opportuno non procrastinare l'inizio della terapia.

La transizione dal pediatra specialista al medico lipidologo dell'adulto potrebbe avvenire tra i 16 e i 18 anni, idealmente alla fine dello sviluppo puberale (33). Nella pratica quotidiana questo passaggio viene frequentemente vissuto dal genitore come 'termine dell'infanzia' ed è molto elevata la richiesta di mantenere il Centro pediatrico come riferimento. In altri casi il genitore, soprattutto quando già seguito presso un Centro specialistico dell'adulto, trova naturale condividere con il figlio adolescente il proseguimento delle cure. In questo contesto si conferma fondamentale la presenza di un network che condivida impostazioni e modalità di trattamento.

Prospettive future

Come già precedentemente sottolineato, l'identificazione precoce dei soggetti ad alto rischio cardiovascolare e con ipercolesterolemia severa risulta fondamentale nella prevenzione dalla malattia aterosclerotica. Negli ultimi 10 anni sono state messe in atto diverse strategie di screening che coinvolgono l'intero nucleo familiare: screening selettivo, screening a cascata, screening inverso, screening universale, con l'obiettivo di identificare e trattare adeguatamente questi soggetti.

Tuttavia, la consapevolezza della rilevanza epidemiologica e clinica della malat-

Questionario di auto-apprendimento

- 1) **A quale età inizia a svilupparsi l'aterosclerosi:**
 - a. A sviluppo puberale completo
 - b. Dai 6 anni
 - c. Dai 2 anni
 - d. Dall'epoca fetale

- 2) **Il periodo ottimale per eseguire lo screening lipidico in età pediatrica è:**
 - a. Alla nascita
 - b. All'età di 2 anni
 - c. Tra i 2 e 10 anni
 - d. Dopo i 10 anni

- 3) **In merito al trattamento dietetico, l'intervento principale consiste nel:**
 - a. Ridurre la quota di grassi insaturi
 - b. Ridurre la quota di grassi saturi
 - c. Aumentare la quota di carboidrati
 - d. Ridurre la quota di proteine

- 4) **Il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare in età pediatrica prevede:**
 - a. Terapia dietetica
 - b. Terapia dietetica e intervento sullo stile di vita
 - c. Terapia dietetica, intervento sullo stile di vita e trattamento farmacologico
 - d. Nessun intervento fino all'età adulta

- 5) **In età pediatrica si considera:**
 - a. Il colesterolo totale (CT)
alto se > 180 mg/dl
 - b. Il colesterolo HDL
accettabile se > 35 mg/dl
 - c. Il colesterolo LDL
accettabile se < 110 mg/dl
 - d. Il colesterolo non-HDL
alto se >130 mg/dl

Risposte corrette:
1D, 2C, 3B, 4C, 5C

tia aterosclerotica, l'importanza di una diagnosi precoce, fin dall'età pediatrica, e di un trattamento tempestivo, restano ancora scarsamente considerati e conosciuti dai professionisti della salute e dalla popolazione generale (35). La presenza di una rete specifica che consenta lo scambio di informazioni e promuova una attività clinica in linea con le più recenti raccomandazioni nazionali ed internazionali, potenzia la possibilità di identificare i pazienti con dislipi-

demia primitiva severa, facilita l'accesso alla diagnosi genetica e ottimizza il percorso clinico.

La costante collaborazione tra operatori sanitari (pediatri e specialisti dell'adulto), organizzazioni di pazienti e responsabili politici risulta fondamentale per sviluppare uno standard di cura dei pazienti pediatrici ad alto rischio cardiovascolare e delle loro famiglie.

Gli Autori dichiarano l'assenza di conflitti di interesse.

RIASSUNTO

La CVD ancora oggi rappresenta la prima causa di mortalità e morbilità nell'adulto nei paesi industrializzati. L'individuazione precoce dei soggetti ad alto rischio cardio-vascolare risulta fondamentale. La diagnosi tempestiva permette infatti di avviare il prima possibile un corretto stile di vita e un'appropriata terapia ipolipemizzante. Negli anni sono stati proposte e messe in atto diverse strategie di screening. L'APP nel 2008 ha identificato i criteri per l'esecuzione di uno screening mirato ed è ancora dibattuto l'utilizzo su larga scala di uno screening universale. Come test iniziale, preferibilmente da eseguire tra i 2 e i 10 anni di età, è consigliabile la determinazione del profilo lipidico completo: colesterolo totale, LDL-C, HDL-C, trigliceridi. Una volta confermata l'ipercolesterolemia, risulta fondamentale la rivalutazione della storia familiare attraverso l'anamnesi mirata alla ricerca di eventi cardio-vascolari precoci o successivi e/o ipercolesterolemia nei parenti di 1° e 2° grado. Il trattamento si basa inizialmente sulla promozione di uno stile di vita sano e una dieta prudente ipolipidica, dando enfasi alla dieta mediterranea. Per i soggetti ad alto rischio e con ipercolesterolemia severa deve essere valutato l'inizio di una terapia farmacologica. Attualmente il cardine terapeutico è rappresentato dalle statine, a cui si possono associare in combinazione le resine o l'ezetimibe. Sono raccomandate visite periodiche (semestrali/annuali) per la valutazione del profilo lipidico, per il controllo della crescita e dell'aderenza al trattamento, in particolare per coloro che svolgono attività sportiva intensa o assumono altri farmaci, al fine di mantenere una buona *compliance* alla terapia fino all'età adulta.

Parole chiave: *Ipercolesterolemia, Età pediatrica, Screening, Management, CVD.*

Bibliografia

1. Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe - epidemiological update 2015. *Eur Heart J.* 2015; 36: 2696-2705
2. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2680-2690.
3. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, et al. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *The Lancet.* 1999; 354: 1234-1241.
4. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and the early development of atherosclerosis. Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1650-1656.
5. Masoura C, Pitsavos C, Aznaouridis K, et al. Arterial endothelial function and wall thickness in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia and the effect of statins. A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2011; 214: 129-138.
6. Kusters DM, Wiegman A, Kastelein JJ, Hutten BA. Carotid intima-media thickness in children

- with familial hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2014; 114: 307-310.
7. Wiegman A. Lipid screening, Action, and Follow-up in Children and Adolescents. *Curr Cardiol Rep*. 2018; 20: 80.
 8. Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J*. 2015; 36: 2425-2437.
 9. 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): S213-256.
 10. Guardamagna O, Restagno G, Rolfo E, et al. The Type of LDLR Gene Mutation Predicts Cardiovascular Risk in Children with Familial Hypercholesterolemia. *J Pediatr*. 2009; 155: 199-204.
 11. Daniels SR, Greer FR, and the Committee on Nutrition. Lipid Screening and Cardiovascular Health in Childhood. *Pediatrics*. 2008; 122: 198-208.
 12. Averna M, Cefalù A, Casula M, et al. Familial hypercholesterolemia: The Italian Atherosclerosis Society Network (LIPIGEN). *Atherosclerosis Supplements*. 2017; 29: 11-16.
 13. Casula M, Olmastroni E, Pirillo A, et al. Evaluation of the performance of Dutch Lipid Clinic Network score in an Italian FH population: The LIPIGEN study. *Atherosclerosis*. 2018; 277: 413-418.
 14. Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, et al. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atherosclerosis Supplements*. 2017; 29: 17-24.
 15. Giovannini M, De Carlis S. Raccomandazioni per la prevenzione in età pediatrica dell'aterosclerosi. *Riv Ital Pediat*. 2000; 26: 13-28.
 16. Shinozaki K, Okuda M, Sasaki S, et al. Dietary fiber consumption decreases the risks of overweight and hypercholesterolemia in Japanese children. *Ann Nutr Metab*. 2015; 67: 58-64.
 17. Martino F, Martino E, Morrone F, et al. 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.
 18. European Food Safety Authority: Scientific opinion on dietary reference values for carbohydrates and dietary fiber. *EFSA J*. 2010; 8: 1462.
 19. Gylling H, Plat J, Turley S, et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2014; 232: 346-360.
 20. Ribas SA, Sichieri R, Moreira ASB, et al. 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.
 21. Assmann G, Cullen P, Erbey J, et al. 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.
 22. Guardamagna O, Abello F, Baracco V, et al. The treatment of hypercholesterolemic children: Efficacy and safety of a combination of red yeast rice extract and policosanols. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2011; 21: 424-429.
 23. Pirro M, Vetrani C, Bianchi C, et al. 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.
 24. Del Bo' C, Deon V, Abello F, et al. 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.
 25. 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.
 26. Helk O, Widhalm K. Effects of a low-fat dietary regimen enriched with soy in children affected with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2020; 36: 150-156
 27. Guardamagna O, Amaretti A, Puddu PE, et al. Bifidobacteria supplementation: effects on plasma lipid profiles in dyslipidemic children. *Nutrition*. 2014; 30: 831-836.
 28. Watts GF, Gidding S, Wierzbicki AS, et al. Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolaemia from the International FH Foundation. *Int J Cardiol* 2014; 171: 309-325.
 29. Ilse KL, Wiegman A, Kusters DM, Hof M, et al. 20-year follow-up of statins in children with familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2019; 381: 1547-1556
 30. Descamps OS, Tenoutasse S, Stephenne X, et al.

- Management of familial hypercholesterolemia in children and young adults: consensus paper developed by a panel of lipidologists, cardiologists, paediatricians, nutritionists, gastroenterologists, general practitioners and a patient organization. *Atherosclerosis*. 2011; 218: 272-280.
31. Martin AC, Coakley J, Forbes DA, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: a new paediatric model of care. *J Paediatr Child Health*. 2013; 49: E263-E272.
 32. Ramaswami U, Humphries SE, Priestley-Barnham L, et al. Current management of children and young people with heterozygous familial hypercholesterolaemia - HEART UK statement of care. *Atherosclerosis*. 2019; 290: 1-8.
 33. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011; 32: 1769-1818.
 34. Thorogood M, Seed M, De Mott K, Guideline Development Group. Management of fertility in women with familial hypercholesterolaemia: summary of NICE guidance. *Br J Obstet Gynaecol* 2009; 116: 478-479.
 35. Brett T, Qureshi N, Gidding S, et al. Screening for familial hypercholesterolaemia in primary care: Time for general practice to play its part. *Atherosclerosis*. 2018; 277: 399-406

MEDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ

L'"ARTERIOSCLEROSI SPERIMENTALE" E LA NASCITA DELL'IPOTESI LIPIDICA NELLA PATOGENESI DELL'ARTERIOSCLEROSI

The "Experimental Arteriosclerosis" and the birth of the lipid hypothesis in the pathogenesis of arteriosclerosis

ANDREA COZZA¹, GAETANO THIENE²

¹Medicina Umanistica, Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica, Università di Padova;

²Patologia Cardiovascolare, Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica, Università di Padova

Breve percorso storico attraverso le fonti documentali italiane tra la fine dell'Ottocento e i primi cinquant'anni del Novecento.

Brief historical journey through the Italian documentary sources between the end of the nineteenth century and the first fifty years of the twentieth century.

Indirizzo per la corrispondenza

dr. Andrea Cozza MD
C/O Patologia Cardiovascolare
Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari
e Sanità Pubblica, Università di Padova
Via Gabelli 61 - 35121 Padova
E-mail: andrea.cozza@phd.unipd.it

Introduzione

Gli esperimenti e le considerazioni definite tra il 1908 e il 1913 da Alexander I. Ignatowski (1875-1955), da Nikolai N. Anitschkow (1885-1964) e altri innescarono, come è noto, un formidabile processo di rinnovamento nelle conoscenze sull'eziopatogenesi dell'aterosclerosi. Stando alle sperimentazioni condotte, si iniziò a comprendere come il colesterolo e una dieta ricca di questa sostanza potessero essere associati alla formazione della placca ateromatosa dell'intima.

Si intende in questo articolo analizzare brevemente come le riflessioni sul rapporto tra dieta, lipidi e aterosclerosi si siano estese e siano state recepite in Italia negli anni immediatamente successivi alla loro formulazione e sperimentazione, andando

così a delineare la diffusione delle stesse nella rete medico-scientifica italiana della prima metà del Novecento.

Materiali e metodi

L'elaborazione di tale indagine storica è stata condotta attraverso la metodologia di ricerca propria della Storia della Medicina, ossia tramite l'analisi di fonti dirette e indirette. Ci si è basati primariamente sullo studio della manualistica, trattatistica e stampa medica specialistica di produzione italiana, cronologicamente collocabile all'incirca tra gli ultimi dieci anni dell'Ottocento e i primi cinque decenni del Novecento. In secondo luogo si sono consultate alcune fonti indirette, italiane e straniere, di revisione sull'argomento e di più ampio intervallo cronologico.

La consultazione di opere antecedenti alle esperienze di Ignatowski e Anitschkow è stata ritenuta preliminare alla definizione dello stato dell'arte sulle conoscenze anatomico-patologiche dell'aterosclerosi, sulle quali si sono poi inserite e incardinate le "nuove" concezioni patogenetiche della lesione ateromastica.

L'analisi di tali fonti si è realizzata attraverso un approccio clinico e anatomicopatologico al fine di valutare descrizioni istopatologiche e meccanismi fisiopatologici, nell'ottica del loro divenire e della loro evoluzione storica.

Discussione

Le premesse

L'*arteriosclerosi*, come è noto, venne inquadrata sotto il profilo terminologico per la prima volta da Jean Lobstein (1777-1835) nel 1833, a cui susseguì la definizione di *aterosclerosi* proposta da Felix Marchand (1846-1928) nel 1904. Tra la fine dell'Ottocento e l'inizio del Novecento vennero pro-

dotti a livello italiano e estero numerosissimi studi intesi a definire l'eziopatogenesi e la clinica dell'*arteriosclerosi*. Ricordiamo che all'epoca il termine *arteriosclerosi* era usato spesso indistintamente per inquadrare tanto l'*arteriosclerosi* dei vasi di grosso e medio calibro quanto quella dei vasi di piccolo calibro (1, 2). Si distinguevano, tuttavia, l'*ateroma delle arterie* o *ateroma arterioso* dall'*arteriosclerosi* propriamente detta. In particolare, come descritto da Vincenzo Piazza-Martini *"l'ateroma e l'arterio-sclerosi non sono che due epifenomeni di uno stesso processo morboso delle arterie; la lesione essenziale, primitiva [...] è l'arterio-sclerosi, la lesione secondaria è l'ateroma, manifestazione clinica dell'arterio-sclerosi dei vasa vasorum delle grosse arterie"* (1). Tra gli inquadramenti nosografici maggiormente in auge all'epoca si riscontra quello dell'anatomopatologo fiorentino Guido Banti (1852-1925), che distinse una *arteriosclerosi ateromatosa* o *arteriosclerosi delle grosse arterie* con un predominante carattere di degenerazione e una *arteriosclerosi fibrosa* o *arteriosclerosi delle arterie parenchimali* con una predominanza di lesioni iperplastiche su quelle degenerative (3-5). La caratteristica distintiva dell'*arteriosclerosi ateromatosa* era, inoltre, la presenza di placche di cui vennero descritte varie tipologie (*p. ateromatose, fibrose, cartilaginee, gelatinose, calcaree*) (3-5). La maggior parte degli Autori a cavallo tra Ottocento e Novecento ritenevano, a seguito delle osservazioni microscopiche condotte, che la placca ateromatosa fosse costituita principalmente da *"goccioline adipose"*, cristalli di colesterina [colesterolo n.d.a.], acidi grassi, mielina, margarina e, talvolta, anche di *"gocciollette e [...] granuli proteici"* e pure da *"frammenti di cellule e di lamelle fibroelastiche dell'intima degenerate e necrosate"* (1-5). L'indagine sulle cause dell'arte-

riosclerosi, come pure la progressione dei momenti patogenetici di questa condizione, animarono il dibattito tra i medici e la ricerca scientifica in tal senso tra Otto e Novecento. Tra le molteplici teorie patogenetiche affermatesi al tempo si rammentano la “teoria distrofica” dell’obliterazione dei *vasa vasorum*; la teoria di Thoma della “malacia della media e conseguente proliferazione dell’intima”; le ricerche di Jores sull’iperplasia intimale, la teoria del “consumo precoce del sistema vasale” e la “teoria della colesterinemia” (6-8). Sullo scadere del XIX secolo, inoltre, si impose l’esigenza di un approccio sperimentale allo studio dell’arteriosclerosi: “era naturale - come scrisse il clinico dell’Università di Pavia Giovanni Galli - che nel fervore generalizzato di riconoscere meglio l’essenza dell’arteriosclerosi, si ricorresse anche alle ricerche sperimentali. Queste risalgono a una trentina di anni fa [a partire all’incirca dagli anni Novanta dell’Ottocento n.d.a.], quando si iniziavano i primi tentativi di riprodurre l’arteriosclerosi negli animali” (Figura 1).

L’epopea dell’arteriosclerosi sperimentale e della colesterina

I primi esperimenti intrapresi al fine di riprodurre delle lesioni simili a quelle tipiche dell’arteriosclerosi potrebbero essere definiti del tutto avveniristici per l’epoca.

Non ci sorprenda, dunque, che uno dei primi esperimenti illustrati nella letteratura italiana specialistica dell’epoca sia stato quello condotto attraverso iniezioni ripetute di adrenalina (O. Josué, 1903) nelle vene dell’orecchio di coniglio. Una volta soppresso l’animale e disseccato per finalità anatomico-patologiche, lo sperimentatore riscontrò l’aorta “slargata e con superficie esterna irregolare” e con dilatazioni aneurismatiche. Questa risultava, inoltre, difficile

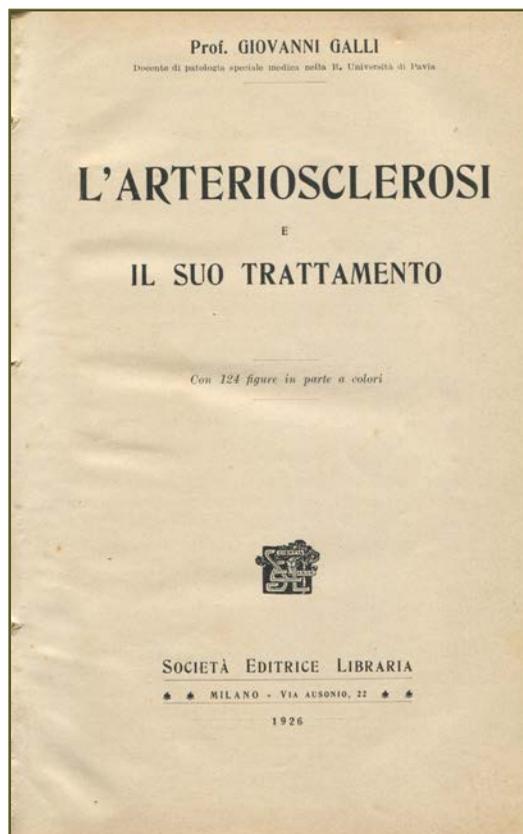


Figura 1 - Frontespizio dell’opera di Giovanni Galli “L’arteriosclerosi e il suo trattamento” (Società Editrice Libreria, Milano 1926).

da tagliare a causa delle calcificazioni presenti (4, 6). L’Autore di questo esperimento riteneva che le lesioni indotte nell’aorta del coniglio fossero del tutto sovrapponibili alle lesioni dell’arteriosclerosi nell’uomo (6). Questa analogia, tuttavia, venne in seguito rigettata dagli scienziati che preferirono parlare di “arterioneccrosi”, ossia di una “necrosi della media con calcificazione secondaria” (6). Secondo Giovanni Galli “la scoperta di Josué diede l’aire dovunque ad un numero di ricerche sperimentali, tanto numerose da poterle a mala pena seguire tutte. Oltre l’adrenalina vennero anche sperimentate le sostanze più diverse, viventi o morte, che appena lontanamente ritenute

erano causa dell'arteriosclerosi. Tabacco, alcool, veleni alimentari, microbi e tossine, gli stessi medicamenti vennero iniettati e, fatto singolare, tutta questa congerie di sostanze produsse nelle mani dei moltissimi ricercatori lesioni ateromatose" (Figura 1).

Nel novero di queste numerosissime sperimentazioni, Alessandro Lustig (1857-1937) e Gino Galeotti (1867-1921) nel loro *Trattato di Patologia generale* (4) riportano, ad esempio, alcuni esperimenti condotti sempre nel coniglio attraverso iniezioni di colture di stafilococco che, congiuntamente ad una alimentazione incongrua, avrebbero determinato quadri di arteriosclerosi.

La grande svolta degli studi sperimentali sull'arteriosclerosi si ebbe tuttavia a partire dal 1908, anno in cui l'arteriosclerosi stessa venne messa definitivamente in relazione con l'alimentazione. Alcuni ricercatori, tra cui Alexander I. Ignatowski e altri (Hueck, Lubarsch, Saltykow, Fahr, Stuckey) come testimoniato da Galli (6), alterarono la consueta dieta erbivora dei conigli da esperimento aggiungendo albumine animali derivanti da uova, latte e carne rossa (6, 7). A seguito di tali variazioni vennero riscontrate *"alterazioni di organi parenchimatosi (fegato, rene, ecc.), anche una sclerosi dell'aorta con necrosi della media e con calcificazione dell'intima, alterazioni che l'Autore [Ignatowski n.d.a.] attribuì all'azione dannosa dell'albumina eterogenea, come quella animale, per una specie ad alimentazione vegetale come il coniglio"* (7). Successivamente Steinbiss, aggiunse l'alimentazione del coniglio con albumine animali secche derivanti dalla frammentazione e polverizzazione di fegato, muscoli, timo e capsule surrenaliche determinando uno stato di glicosuria unitamente ad alterazioni aortiche e delle arterie periferiche (7).

Un ulteriore fondamentale passo fu

compiuto quando fu osservato (1912-1913) che nei modelli sperimentali animali era possibile indurre la formazione di lesioni arteriosclerotiche attraverso la somministrazione di colesterina pura aggiunta alla dieta degli animali stessi. Su questi esperimenti si concentrarono tanto Anitschkow e Chalатов quanto Wacker e Hueck, e ancora Aschoff, Zinserling, Versè, Albrecht (4, 6, 7). Il "razionale" dell'impiego della colesterina derivava dall'osservazione che le lesioni arteriose erano ricche di esteri della colesterina: *"tali risultati sperimentali hanno rafforzato - scrissero Lustig e Galeotti - l'ipotesi della dipendenza dell'arteriosclerosi da disturbi del ricambio colesterinico, ipotesi già formulata da Chauffard, da Pribram e da altri, in base alla constatazione di un certo grado di ipercolesterolemia negli arteriosclerotici, e al reperto istologico di notevoli depositi di colesterina nei focolai arteriosclerotici umani"* (4). Si inaugurò, dunque, l'epopea della *"malattia sperimentale da colesterina"* ricreata nell'animale da laboratorio e caratterizzata da *"ipercolesterinemia"* e da *"infiltrazione di lipoidi birifrangenti in quasi tutti i parenchimi"* che sarebbe esitata secondo il Versè, a livello sistemico, in una *"steatosi colesterinica generale"* (7). Gli scienziati testarono svariate condizioni di insorgenza della lesione arteriosa a seguito di somministrazione di colesterina esogena nei conigli. Seguirono numerose caratterizzazioni istologiche dell'arteriosclerosi sperimentale, le quali rilevarono principalmente *"nell'intima una cospicua infiltrazione di esteri colesterinici accompagnata poi da una moderata iperplasia di questa tonaca con neoformazione di connettivo e di fibre elastiche"* (7). Inoltre, l'anatomo-patologo dell'Università di Torino Ferruccio Vanzetti (1873-1942), scrisse che *"in seno all'intima si osserva la comparsa di grandi cellule rotondeggianti,*

a protoplasma schiumoso, ripiene di numerosissime goccioline di colesterina, appartenenti al gruppo dei macrofagi e dette anche fagociti della colesterina” (7) (Figura 2). Gli esperimenti si estesero anche agli animali onnivori per una determinazione più aderente alla fisiologia e alla patologia umana. In quel frangente, il grande quesito che necessariamente si posero gli scienziati era se quanto emerso dai test sugli animali potesse essere rappresentativo e assimilabile anche alla patologia umana. “Secondo Anitschkow, Aschoff, Versé, Wacker e Hueck, ecc., – scrisse Vanzetti – il processo arterioso riprodotto sperimentalmente mediante l'introduzione di colesterina si può identificare con quello della patologia umana ed anzi Anitschkow non esita a definire l'affezione provocata nell'animale dalla colesterina come una vera arteriosclerosi sia per il reperto istologico, che per i caratteri microchimici del grasso, il tipo della reazione iperplastica della parete vasale, la sua localizzazione ed il suo sviluppo” (7). In ogni caso c'era chi invitava alla prudenza nell'intravedere un'assoluta sovrapposizione tra patologia umana e modello sperimentale: “giova comunque in tema di esperimenti negli animali - scrisse il Galli - andare guardando nelle illazioni e i risultati vanno considerati cum grano salis e non si devono trasportare tali e quali nella patologia umana. Nel caso della colesterinemia artificiale noi somministriamo alimenti e sostanze profondamente innaturali, come è impossibile avvenga nell'uomo. Si sono alimentati i conigli, animali erbivori per eccellenza, con uova e latte, con fegato, con carne di cavallo, eventualmente con l'aggiunta di alcool e di acido lattico. Questo è un complesso di alimentazione straordinariamente innaturale e perverso, come non si può mai verificare nell'uomo. Questo poi da tempo immemorabile è abituato

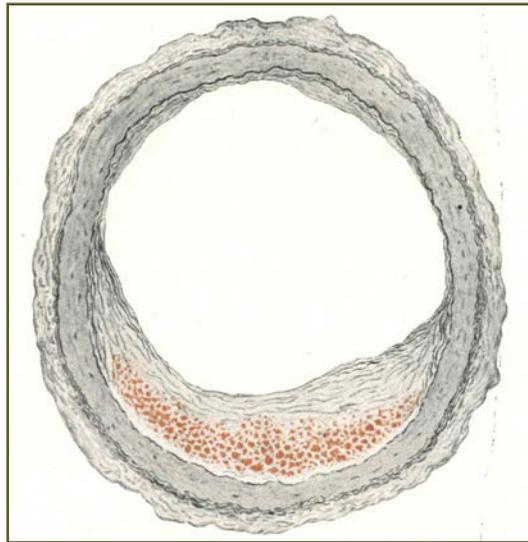


Figura 2 - Aterosclerosi di un'arteria carotide: si noti una proliferazione dell'intima con, in profondità, un focolaio ateromatoso (tratto da: Ferruccio Vanzetti, *Sistema circolatorio*, in “Trattato di Anatomia Patologica per Medici e Studenti” pubblicato dal Prof. Pio Foà”, Unione Tipografico-Editrice Torinese, Torino 1920, p. 95).

a cibarsi con alimenti svariati, con le più diverse sostanze albuminoidi ed è per eccellenza onnivoro” (6). Essendoci, tuttavia, ancora incertezza sia sui modelli animali che sugli eventi patogenetici che avrebbero contraddistinto l'arteriosclerosi, i medici si appellavano ad una misurata cautela nel far collimare univocamente la lesione sperimentale con quella umana (7). In modo prudenziale, per la maggior parte, si affermava dunque che “l'ipotesi di uno stretto rapporto fra alterazioni del ricambio della colesterina ed arteriosclerosi sia anche per la patologia umana accettabile e che pure abbia un fondamento l'affermazione di Anitschkow ed altri, che l'arteriosclerosi consista in un processo di infiltrazione primaria della parete con esteri colesterinici, sia che avvenga in una parete normale quanto precedentemente alterata” (7).

I lipidi ematici

Le fasi successive della ricerca del rapporto tra colesterolo e arteriosclerosi furono focalizzate nel tentativo di stabilire una relazione tra lesioni ateromatose e livelli di colesterina nel siero umano. I medici infatti, rilevavano spesso che soggetti arteriosclerotici avevano un elevato tasso di colesterina nel sangue. Alcune volte, tuttavia, venivano evidenziati livelli di colesterina nella norma in soggetti definiti ugualmente arteriosclerotici e cautamente si affermò che “*si può concludere che fra ipercolesterinemia plasmatica ed arteriosclerosi –come sostenuto dal medico laboratorista di Milano Giulio Vanzetti (1912-2000, da non confondere col sopraccitato Ferruccio Vanzetti) - esiste solo un rapporto di frequente coincidenza, non un rapporto di causa ed effetto*” (9). Le indagini in tal senso dovevano tuttavia ancora pienamente delinearci.

Dopo alcune ricerche su animali miranti ad indagare il rapporto tra arteriosclerosi, grassi e colesterolo ad opera di Christianson, rilevanti furono le esperienze condotte tra il 1939 e il 1945 da Wilhelm Carl Hueper (1894-1978) sull'iniezione di sostanze cosiddette “*macromolecolari*” e lo sviluppo di cellule schiumose (“*foam cells*”). Di queste esperienze ce ne dà ancora notizia Giulio Vanzetti, in un suo articolo di aggiornamento sull'importanza dei lipidi nella patogenesi dell'arteriosclerosi, nel quale descrisse le procedure di Hueper. Quest'ultimo inoculò per via endovenosa in topi, conigli e cani alcune sostanze tra le quali pectina di cedro pura, metilcellulosa, alcoli polivinilici e gomma arabica e ne osservò l'accumulo a livello intimale in localizzazioni arteriose “*tipiche*” delle lesioni ateromasiche. A seguito di osservazioni di carattere istologico riscontrò la presenza, nell'intima, di cellule schiumose, con accumuli delle

sostanze iniettate anziché di lipidi le quali avrebbero configurato un quadro di quella che definì “*arteriosclerosi macromolecolare*” di tipo sperimentale (9).

Le ricerche di Hueper, sottolinea il Vanzetti, furono riprese e sviluppate da John R. Moreton (1919-2013) che tra il 1947 e il 1948 delineò una “*teoria dismetabolica*” dell'arteriosclerosi. “*Moreton attribuisce - scrisse Giulio Vanzetti - ai «chilomicron» (emoconi), corpuscoli di grasso presenti nel sangue in seguito all'assorbimento di grasso alimentare, un ruolo essenziale nella patogenesi dell'ateromasia delle arterie. I chilomicron verrebbero fagocitati dai macrofagi presenti nell'intima delle arterie, dando luogo alle caratteristiche «cellule schiumose», e successivamente, nel corso degli anni, alle tipiche lesioni ateromatose ed arteriosclerotiche*” (9). Vanzetti inoltre rese note, nella sua analisi, le metodiche attraverso le quali Moreton analizzò i lipidi nel sangue. Lo statunitense si avvale dell'osservazione diretta e della *fotomicrografia* dei chilomicroni, della nefelometria sierica (misura della torbidità) e della centrifugazione del siero. In particolare Moreton riscontrò che in determinate condizioni quali *diabete, nefrosi, xantomatosi, ipercolesterinemia sperimentale del coniglio*, sussisteva un incremento del grado di torbidità sierica dopo somministrazione di grassi (9).

A partire dal 1949, come riferisce il Vanzetti, Gerald Herbert Becker (1922-2005) e Colleghi si dedicarono a studi approfonditi sulla curva temporale dei chilomicroni (chilomicrogramma). Essi somministrarono una dose standardizzata di grassi a individui giovani e ad individui anziani e rilevarono due diversi picchi orari di chilomicroni ematici. Riscontrarono, inoltre, che i soggetti anziani presentavano valori di “*chilomicron*” tre volte più elevati rispetto ai giovani. Que-

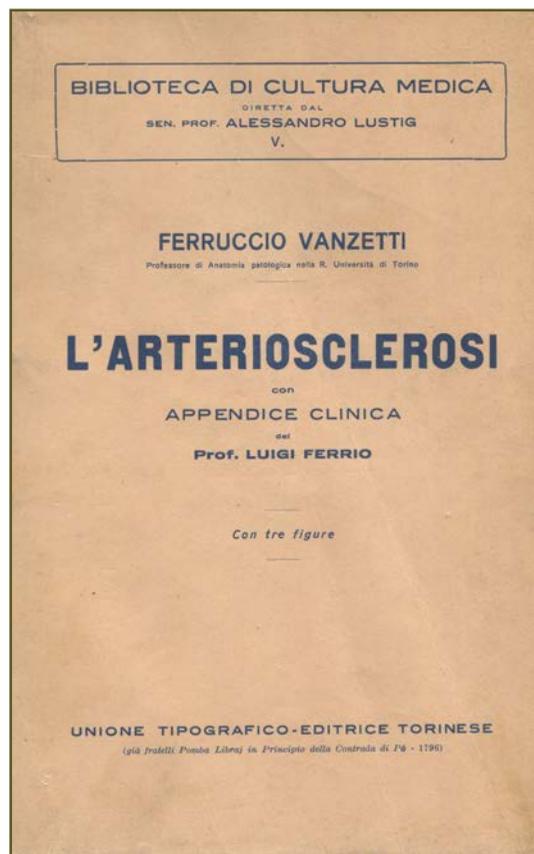


Figura 3 - Frontespizio dell'opera di Ferruccio Vanzetti "L'arteriosclerosi con appendice clinica del prof. L. Ferrio" (Unione Tipografico-Editrice torinese, Torino 1928).

sta *iperchilomicronemia* (o *iperlipidemia*) era attribuita ad una diminuita quantità di lipasi pancreatiche la quale era ritenuta fisiologicamente ridotta negli anziani (9).

Particolarmente all'avanguardia, infine, furono ritenute da Vanzetti le ricerche sperimentali di John W. Gofman (1918-2007), Frank T. Lindgren (1924-2008) e Collaboratori sulle lipoproteine (1950). Il gruppo di ricercatori americani effettuò degli studi sul siero di alcuni animali e dell'uomo attraverso l'impiego dell'ultracentrifuga. Nel siero di conigli nutriti con una alimentazione ricca in colesterolo riscontrarono la presenza di una "compo-

nente anormale" la quale presentava una velocità di ascesa (*flotation rate*) di 10-30 Unità Svedberg. Questa componente anomala nel processo di ultracentrifugazione venne imputata alla presenza di "micelle di lipidi" o "lipoproteine" ed era maggiormente presente nel siero di conigli che, una volta dissecati, presentavano lesioni arteriosclerotiche. Risultava, invece, assente nei conigli che non presentavano alterazioni aterosclerotiche dell'albero arterioso. Le osservazioni vennero condotte anche nel campo della patologia umana: la presenza di micelle con analoga velocità di flotazione all'ultracentrifuga vennero rilevate anche nel siero di pazienti (95% dell'insieme di soggetti) che erano incorsi in un infarto miocardico. Tali micelle erano quasi del tutto assenti in donne di età compresa tra i 20 e i 40 anni, mentre la loro rilevazione era assai frequente in uomini e donne di età superiore ai 40 anni e in pazienti diabetici (9). "Le osservazioni di Gofman e collaboratori - sintetizzò il Vanzetti - fanno pensare ad uno stretto rapporto fra la presenza delle suaccennate micelle, di natura evidentemente lipidica o lipoproteica, ma diverse e assai più piccole dei chilomicron, e la comparsa di fatti di arteriosclerosi a carico delle arterie. È ovvio che anche altri fattori non metabolici debbono essere in gioco nella patogenesi dell'arteriosclerosi (basti pensare all'influenza degli stati ipertensivi). [...] Sarebbe comunque un errore credere che le ricerche biochimiche e chimico-fisiche abbiano soltanto carattere speculativo. È assai probabile invece che il tipo di alimentazione abbia grande importanza nella patogenesi dell'arteriosclerosi" (9).

Molte scoperte erano state dunque fatte, molte osservazioni e correlazioni dovevano però ancora essere stabilite. Vanzetti, infine, conscio del molto lavoro ancora da effettuare, incitò alla prosecuzione delle

ricerche nell'ottica di un progresso con ricadute positive non solo nel campo della patogenesi ma anche nella profilassi e nella terapia dell'arteriosclerosi.

Conclusioni

Oggi è noto a tutti come una dieta iper-calorica e/o ricca in grassi saturi, l'ipercolesterolemia, elevate concentrazioni di LDL, ridotte quantità di HDL, l'ipertrigliceridemia concorrano, in qualità di fattori di rischio (per altro potenzialmente modificabili!), all'insorgenza dell'aterosclerosi. Se questi elementi sono un dato di fatto nell'attuale conoscenza dell'aterosclerosi nei suoi aspetti multifattoriali, è anche grazie alla creazione dei modelli sperimentali che sono stati descritti. Attraverso questi stessi modelli gli scienziati poterono disporre di potenti strumenti per la comprensione dell'aterosclerosi umana e del ruolo dei lipidi nella sua patogenesi, aprendo definitivamente la strada alla nascita della lipidologia contemporanea.

Bibliografia

1. Piazza-Martini V. Ateroma e sclerosi delle arterie. In "Trattato Italiano di Patologia e Terapia medica", Vol. IV, p. II, Cantani A, Maragliano E, eds, Milano, Casa Editrice Dottor Francesco Vallardi. 1895: 548-563.
2. Oettinger W. Malattie dei vasi sanguigni. In "Trattato di Medicina", Charcot, Brissaud, Bouchard, eds, Torino, Unione Tipografico-Editrice. 1895: 383-408.
3. Banti G. Anatomia Patologica. Vol. I, Milano, Società Editrice Libreria. 1907: 597-609.
4. Lustig A, Galeotti G. Trattato di Patologia Generale. Vol. II, Milano, Società Editrice Libreria. 1921: 301-310.
5. Peruzzi M. Compendio di Anatomia Patologica generale e sistematica. Milano, Ulrico Hoepli. 1927: 750-760.
6. Galli G. L'arteriosclerosi e il suo trattamento. Milano, Società Editrice Libreria. 1926: 69-99.
7. Vanzetti F. L'arteriosclerosi (con appendice clinica del prof. L. Ferrio). Torino, Unione Tipografico-Editrice torinese. 1928: 76-88.
8. Vanzetti F. Sistema circolatorio. In "Trattato Italiano di Anatomia Patologica", Vol. I, Vanzetti F, eds, Torino, Unione Tipografico-Editrice torinese. 1938: 88-98.
9. Vanzetti G. L'importanza dei lipidi nella patogenesi dell'arteriosclerosi. L'Ospedale Maggiore. 1950; 6: 316-18.

NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI**ESC 2020****MANUELA CASULA**

SEFAP - Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva,
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

Nei giorni dal 29 agosto all'1 settembre 2020 si è tenuto il meeting annuale dell'European Society of Cardiology (ESC), completamente online. Tra gli argomenti discussi durante il Congresso, alcuni aggiornamenti delle recenti linee guida dalla Società e gli ultimi risultati dei trial clinici.

Evolocumab sicuro ed efficace nei soggetti pediatrici con FH: il trial HAUSER

L'anticorpo monoclonale PCSK9 evolocumab (Repatha, Amgen) è risultato ben tollerato e ha ridotto efficacemente il colesterolo LDL del 38% rispetto al placebo in uno studio controllato randomizzato in pazienti pediatrici con ipercolesterolemia familiare eterozigote (FH), che già assumevano statine, con o senza ezetimibe.

Lo studio di 24 settimane, randomizzato, in doppio cieco, controllato contro placebo, ha coinvolto 157 pazienti di età compresa tra 10 e 17 anni con FH eterozigote che già assumevano statine, con o senza ezetimibe, e che avevano un livello di colesterolo LDL di 130 mg/dL o più e un livello di trigliceridi di 400 mg/dL o inferiore. I pazienti

sono stati assegnati in modo casuale, in un rapporto 2: 1, a ricevere iniezioni sottocutanee mensili di evolocumab (420 mg) o placebo. I risultati hanno mostrato che alla settimana 24 la variazione percentuale media dal basale del livello di colesterolo LDL era -44,5% nel gruppo evolocumab e -6,2% nel gruppo placebo. La variazione assoluta del livello di colesterolo LDL è stata di -77,5 mg/dL nel gruppo evolocumab e -9,0 mg/dL nel gruppo placebo, con una differenza di -68,6 mg/dL. I risultati per tutti gli altri parametri lipidici sono stati significativamente migliori con evolocumab rispetto al placebo. L'incidenza degli eventi avversi che si sono verificati durante il periodo di trattamento è stata simile nei gruppi evolocumab e placebo.

Il beneficio degli SGLT2 inibitori si osserva anche nella nefropatia cronica in assenza di diabete: il trial DAPA-CKD

I pazienti con malattia renale cronica, con o senza diabete, si aggiungono all'elenco crescente di persone che traggono be-

Indirizzo per la corrispondenza

Manuela Casula
SEFAP, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano
E-mail: manuela.casula@unimi.it

neficio dal trattamento con un inibitore SGLT2.

Nello studio DAPA-CKD, il trattamento con l'inibitore del co-trasportatore sodio-glucosio-2 (SGLT2) dapagliflozin (Farxiga, AstraZeneca), aggiunto a trattamento standard, ha ridotto l'incidenza di peggioramento della malattia renale cronica (CKD) in media del 39% rispetto al placebo, con un numero necessario da trattare per prevenire un esito primario di 19 dopo una media di 2,4 anni.

Il livello di beneficio era simile sia in un terzo dei pazienti arruolati senza diabete che nei due terzi con diabete, mostrando una riduzione statisticamente significativa del 50% dell'*end point* primario. Questa evidenza inaugura un'era completamente nuova nella gestione della malattia renale cronica. I risultati hanno mostrato che dapagliflozin è un farmaco "rivoluzionario" per CKD, dopo l'introduzione degli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-I) e dei bloccanti il recettore dell'angiotensina (ARB).

Coerentemente con i risultati di diversi altri studi, che hanno documentato una protezione renale significativa da parte di inibitori SGLT2 diversi, i risultati di questo singolo studio indicano in modo convincente dapagliflozin come farmaco standard di cura da utilizzare nei pazienti con caratteristiche simili a quelli inclusi in questo trial. Lo studio DAPA-CKD ha arruolato 4.304 pazienti con albuminuria, sulla base di un rapporto albuminuria/creatininuria di almeno 200 mg/g e una velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) da 25 a 75 ml/min per 1,73 m² (il 90% dei pazienti presentava eGFR <60 mL/min per 1,73 m²); il 97% stava ricevendo un trattamento con un farmaco bloccante il sistema renina-angiotensina. L'*end point* primario era la percentuale combinata di riduzione dell'eGFR di almeno il 50% ri-

spetto al basale, la progressione alla malattia renale allo stadio terminale o la morte renale o cardiovascolare. I risultati di questo trial dovrebbero costituire un valido argomento nel convincere i medici dell'opportunità di usare dapagliflozin o altri farmaci inclusi nella classe degli inibitori SGLT2 in pazienti con funzione renale sostanzialmente depressa.

Benefici del trattamento antipertensivo anche nei soggetti con livelli pressori normali o moderatamente elevati

L'abbassamento della pressione arteriosa con farmaci antipertensivi riduce gli eventi cardiovascolari futuri anche in individui con pressione normale o solo leggermente elevata. Una meta-analisi dalla Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration (BPLTTC) sui dati di singoli pazienti ricavati da 48 studi sul trattamento antipertensivo, per un totale di 348.854 partecipanti, ha infatti mostrato che l'abbassamento della pressione arteriosa è associato a riduzione del rischio relativo di eventi cardiovascolari futuri nell'intero spettro delle pressioni basali fino a una sistolica di 115 mm Hg, indipendentemente dal fatto che gli individui abbiano o meno malattie cardiache preesistenti. In una media di 4 anni di follow-up, ogni riduzione di 5 mm Hg della pressione arteriosa sistolica ha ridotto il rischio relativo di eventi cardiovascolari maggiori di circa il 10%. Il rischio di ictus, cardiopatia ischemica, insufficienza cardiaca e morte per CVD è stato ridotto rispettivamente del 13%, 7%, 14% e 5%.

Come sottolineato dagli autori, l'ipertensione è forse meno rilevante come diagnosi, ma il trattamento della pressione arteriosa sta diventando sempre più importante come modificatore del rischio cardiovascolare basale anche in presenza di pressioni iniziali relativamente basse.

Possibile ruolo della colchicina a supporto delle terapie standard in prevenzione secondaria: il trial LoDoCo2

Il farmaco antinfiammatorio colchicina è stato confermato come possibile supporto nella prevenzione secondaria nella malattia coronarica cronica, riducendo il rischio di eventi cardiovascolari di un terzo quando aggiunto alle terapie di prevenzione standard. Nello studio in doppio cieco LoDoCo2, con un follow-up medio di 29 mesi e su più di 5.000 pazienti, la randomizzazione a colchicina ha portato a un rischio di morte cardiovascolare (CV), infarto miocardico (IM), ictus ischemico o rivascolarizzazione coronarica inferiore del 31% rispetto al placebo. L'effetto benefico della colchicina a basso dosaggio (0,5 mg al giorno) è stato osservato precocemente e si è accumulato nel tempo, estendendosi a 5 degli 8 *end point* secondari, inclusa una riduzione di quasi il 30% nel composito di eventi cardiaci avversi maggiori, nonché riduzioni degli *end point* individuali di IM e di rivascolarizzazione guidata dall'ischemia. L'effetto era coerente in 13 sottogruppi, inclusi soggetti con e senza ipertensione, diabete o precedente sindrome coronarica acuta (ACS).

La colchicina ha dimostrato benefici simili nel più piccolo studio in aperto LoDoCo, in cui però 1 paziente su 10 non poteva tollerare il farmaco, per lo più a causa di problemi gastrointestinali. I ricercatori di LoCoDo2 hanno optato molto saggiamente per un periodo di *run-in* di 30 giorni per la tolleranza: il 90% dei pazienti in ciascun braccio ha continuato il trattamento in studio mentre il 3,4% si è fermato a causa degli effetti collaterali. I medici dovrebbero tenere presente i potenziali effetti avversi e le interazioni con altri farmaci, in particolare le statine, per questo è indicato il monitoraggio degli esami ematochimici,

in particolare la conta delle cellule del sangue, le transaminasi e la creatinichinasi. Inoltre, la colchicina può essere pericolosa nei pazienti con malattia renale cronica, poiché viene escreta per via renale, in particolare se i pazienti assumono anche alcuni antibiotici comuni come la claritromicina. Per questi motivi, nonostante questi dati confermino l'importanza dell'inibizione dell'infiammazione nella malattia coronarica stabile, la colchicina non è indicata in tutti i pazienti.

Primo studio randomizzato rassicura su ACE-inibitori e sartani in pazienti con COVID-19: il trial BRACE CORONA

Il primo studio randomizzato disegnato per confrontare l'uso continuativo con l'interruzione della terapia con inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-I) o i bloccanti del recettore dell'angiotensina (ARB) nei pazienti con COVID-19 non ha mostrato alcuna differenza negli *end point* primari tra i due approcci.

Lo studio BRACE CORONA - condotto su pazienti che stavano assumendo un ACE-I o un ARB a lungo termine e che sono stati successivamente ricoverati in ospedale con COVID-19 - non ha mostrato differenze nell'*end point* primario del numero di giorni di vita e fuori dall'ospedale tra quelli in cui il farmaco è stato sospeso per 30 giorni e quelli che hanno continuato il trattamento con questi agenti.

Ci sono due ipotesi contrastanti sul ruolo degli ACE-I e degli ARB in COVID-19. Un'ipotesi suggerisce che l'uso di questi farmaci potrebbe essere dannoso, poiché aumenterebbe l'espressione dei recettori ACE2 (che il virus SARS-CoV-2 utilizza per l'ingresso nelle cellule), favorendo così l'azione virale. L'altra suggerisce che gli ACE-I e gli ARB potrebbero essere pro-

tettivi, riducendo la produzione di angiotensina II e aumentando la sintesi di angiotensina 1-7, che attenua l'infiammazione e la fibrosi e di conseguenza il danno polmonare.

Lo studio BRACE CORONA ha arruolato 659 pazienti da 29 siti in Brasile. L'età media dei pazienti era di 56 anni, il 40% erano donne, il 52% obesi. Gli ACE-I venivano assunti dal 15% dei partecipanti allo studio, gli ARB dall'85%. La durata mediana del trattamento con ACE-I/ARB è stata di 5 anni. I pazienti erano arruolati a una mediana di 6 giorni dall'insorgenza dei sintomi COVID. Per il 30% dei pazienti, la saturazione di ossigeno all'ingresso era inferiore al 94%. In termini di sintomi COVID, il 57% è stato classificato come lieve e il 43% come moderato. I risultati hanno mostrato che, a 30 giorni, il numero medio di giorni in cui i pazienti sono risultati in vita e fuori dall'ospedale era di 21,9 giorni in quelli che hanno interrotto l'assunzione di ACE-I/ARB e di 22,9 giorni in quelli che ne hanno continuato l'assunzione. La differenza media tra i gruppi è stata di -1,1 giorni, per un rapporto di 0,95 (95% CI, 0,90 - 1,01; P=0,09). La percentuale di pazienti in vita e fuori dall'ospedale entro 30 giorni nel gruppo che ha sospeso i farmaci era del 91,8%, contro il 95% nel gruppo che li ha continuati. Nei due gruppi è stato osservato un tasso di mortalità a 30 giorni simile, rispettivamente del 2,8% e del 2,7% (rischio relativo 0,97).

Nuove linee guida sugli infarti NSTEMI

La prima revisione dal 2015 alle linee guida della Società Europea di Cardiologia per la Diagnosi e la Gestione della Sindrome Coronarica Acuta senza Sopraslivellamento del Tratto ST ha posto un maggiore affidamento sul test della troponina cardiaca ad alta sensibilità (hs-cTn) per la diagnosi e ha adottato la TC coronarica per escludere

pazienti a basso rischio. Ha inoltre evidenziato la necessità di regimi antiplastrinici personalizzati, sistemi di cura e miglioramento della qualità.

Tra le nuove raccomandazioni relativamente ai trattamenti medici per ridurre al minimo l'ischemia, è riportato l'avvertimento di non utilizzare il pretrattamento di routine con un inibitore del recettore P2Y12 (come il clopidogrel) prima che il test determini l'anatomia coronarica. Un approccio antiaggregante piastrinico più selezionato e differito sarebbe migliore qualora l'angiografia mostri la necessità di un intervento chirurgico di bypass coronarico. I risultati di studi recenti non hanno mostrato alcun beneficio aggiuntivo dal pretrattamento e il suo utilizzo può essere particolarmente problematico nei pazienti destinati a una strategia invasiva pianificata.

Le nuove linee guida forniscono anche indicazioni su come applicare una strategia invasiva, con un'enfasi sull'intervento immediato entro 2 ore per i pazienti ad altissimo rischio e un intervento precoce entro 24 ore per i pazienti ad alto rischio.

Una nuova sezione delle nuove linee guida è dedicata a misure di qualità che possono aiutare i sistemi sanitari e i centri medici a monitorare l'aderenza alle raccomandazioni delle linee guida, a valutare le loro prestazioni rispetto alle istituzioni di pari livello e a seguire i cambiamenti nelle prestazioni che rispondono a miglioramento della qualità. È una sorta di passo "futuristico" per una linea guida, con l'obiettivo di persuadere gli amministratori a implementare il monitoraggio di queste misure e migliorare i risultati per i pazienti.

Acido Icosapentil Etilico, i risultati finali del trial EVAPORATE

I risultati finali a 18 mesi dello studio EVAPORATE suggeriscono che l'acido Icosapentil Etilico (Vascepa) rallenta ulte-

riormente la progressione della placca coronarica quando aggiunto alle statine nei pazienti con alti livelli di trigliceridi.

Lo studio è stato progettato per esplorare un potenziale meccanismo alla base della riduzione degli eventi cardiovascolari in REDUCE-IT. I risultati intermedi riportati in precedenza hanno mostrato che, dopo 9 mesi, il composto ha rallentato significativamente la progressione di diversi tipi di placca, ma non l'*end point* primario della riduzione di volume della placca a bassa attenuazione alla TC multidetector.

Dal basale al follow-up di 18 mesi, tuttavia, l'*end point* primario è stato significativamente ridotto del 17% nel gruppo in trattamento, mentre i volumi di placca a bassa attenuazione sono aumentati del 109% nel gruppo placebo ($p=0,0061$). I risultati coincidono con quelli recenti di REDUCE-IT REVASC, in cui l'acido Icosapentil Etilico a 4 g/die ha fornito un beneficio molto precoce sui primi eventi di rivascularizzazione, che hanno raggiunto una significatività statistica dopo soli 11 mesi (hazard ratio 0,66),

La somministrazione precoce di evolocumab abbassa rapidamente le LDL dopo PCI

La somministrazione precoce di evolocumab ha ridotto significativamente i livelli di colesterolo LDL nei pazienti con sindrome coronarica acuta sottoposti a intervento coronarico percutaneo (PCI), secondo i dati di uno studio randomizzato in aperto su 102 adulti in Giappone.

I dati di studi precedenti hanno dimostrato che gli inibitori di PCSK9 possono ridurre il colesterolo LDL nei pazienti con sindrome coronarica acuta. In particolare, lo studio EVOPACS ha riportato che la terapia con evolocumab iniziata in una fase precoce di ACS ha portato a una riduzione del livello di colesterolo LDL a 4-8 settimane. Tuttavia, l'efficacia entro 4 settimane non

è nota. I ricercatori hanno randomizzato 52 pazienti a ricevere 140 mg di evolocumab per via sottocutanea entro 24 ore dall'intervento coronarico percutaneo e dopo 2 settimane. Un gruppo di 50 controlli ha ricevuto evolocumab solo dopo PCI, ma nessuna dose aggiuntiva dopo 2 settimane. I livelli basali di colesterolo LCL erano 120,8 mg/dL e 124,7 mg/dL rispettivamente nel gruppo evolocumab e nel gruppo di controllo. Le variazioni rispetto al basale sono risultate significativamente maggiori nel gruppo evolocumab rispetto ai controlli, rispettivamente -76% e -33%. Tutti i pazienti nel gruppo evolocumab e il 27% dei pazienti nei gruppi di controllo hanno raggiunto livelli di colesterolo LDL inferiori a 70 mg/dL a 4 settimane. Inoltre, il 92% e il 96% dei pazienti con evolocumab ha raggiunto livelli di colesterolo LDL inferiori a 55 mg/dL rispettivamente a 2 e 4 settimane.

Le variazioni complessive del colesterolo non HDL, del colesterolo HDL e delle LDL piccole e dense nel gruppo in evolocumab e nel gruppo di controllo sono state -66,2% e -26,0%; 2,8% e -0,7%; -67% e -13,8%, rispettivamente. Di questi, i cambiamenti del colesterolo non HDL e delle LDL piccole e dense erano significativamente differenti tra i gruppi. Inoltre, i pazienti nel gruppo evolocumab hanno mostrato una diminuzione del 3% della lipoproteina(a), rispetto a un aumento dell'82% nel gruppo di controllo. Questo suggerisce l'ulteriore vantaggio di evolocumab per la gestione del rischio residuo in pazienti con livelli elevati di lipoproteina(a) dopo infarto acuto del miocardio. Gli eventi avversi totali e quelli gravi erano simili tra i gruppi.

Somministrazione precoce di colchicina nei soggetti post-infartuati: il trial COLCOT

Secondo una nuova analisi dello studio COLCOT il beneficio è tanto maggiore

quanto prima viene iniziato il farmaco antinfiammatorio colchicina dopo un infarto del miocardio (IM).

Lo studio COLCOT è stato condotto in pazienti con recente infarto del miocardio, aggiungendo 0,5 mg di colchicina alla cura standard. Come riportato in precedenza, la colchicina ha ridotto significativamente il rischio dell'*end point* primario - un composto di morte cardiovascolare (CV), arresto cardiaco rianimato, IM, ictus o ricovero urgente per angina che richiede rivascolarizzazione - del 23% rispetto al placebo. Questa nuova analisi mostra che il rischio è stato ridotto del 48% nei pazienti che ricevevano colchicina entro 3 giorni dall'infarto (4,3% vs 8,3%; hazard ratio aggiustato [HR] 0,52; IC 95%, 0,32-0,84, p=0,007). Il rischio dell'*end point* secondario di efficacia - morte CV, arresto cardiaco rianimato, IM o ictus - è stato ridotto del 45% su un follow-up medio di 22,7 mesi (3,3% vs 6,1%; HR aggiustato 0,55; IC 95%, 0,32-0,95, p=0,031). I risultati supportano l'inizio precoce in ospedale della colchicina per la prevenzione post-IM. Sono stati accumulati dati positivi per la colchicina dagli studi COLCOT, LoDoCo e, più recentemente, LoDoCo2, anche se un altro farmaco antinfiammatorio, il metotrexato, non si è dimostrato efficace in prevenzione secondaria cardiovascolare nello studio CIRT. Il nuovo sotto-studio del trial COLCOT ha incluso 4661 dei 4.745 pazienti originali ed ha esaminato l'inizio del trattamento utilizzando tre strati: entro 0-3 giorni (n=1193), 4-7 giorni (n=720) e 8-30 giorni (n=2748). I pazienti che hanno ricevuto il trattamento entro 3 giorni erano leggermente più giovani, avevano più probabilità di essere fumatori e di avere un tempo più breve dall'infarto miocardico alla randomizzazione (rispettivamente 2,1 giorni contro 5,1 giorni contro 20,8 giorni).

Nel sottogruppo che ha ricevuto il trattamento entro 3 giorni, quelli in colchicina hanno avuto lo stesso numero di decessi cardiaci di quelli trattati con placebo (2 vs 2), ma meno arresti cardiaci rianimati (1 vs 3), IM (17 vs 29), ictus (1 vs 5) e ricoveri urgenti per angina richiedenti rivascolarizzazione (6 vs 17). Gli autori sottolineano però che 1 paziente su 10 non era in grado di tollerare il farmaco, soprattutto a causa degli effetti gastrointestinali.

Un secondo sotto-studio del trial COLCOT mirava a identificare i marcatori genetici predittivi della risposta alla colchicina e ad acquisire informazioni sui meccanismi. Ha compreso 767 pazienti trattati con colchicina e 755 con placebo, ovvero circa un terzo dei pazienti dello studio originale. I risultati, sebbene preliminari, supportano la potenziale necessità di un approccio personalizzato alla riduzione dell'infiammazione per la prevenzione cardiovascolare.

Riduzioni lipidiche con acido bempedoico in aggiunta alle statine: il trial CLEAR Harmony

L'estensione a 78 settimane in aperto del trial CLEAR Harmony ha mostrato che l'acido bempedoico mantiene una tollerabilità costante e una buona efficacia in oltre 2,5 anni di trattamento.

Il trial CLEAR Harmony, della durata di 52 settimane, aveva già dimostrato che l'acido bempedoico, per l'intero periodo dello studio, era stato generalmente ben tollerato e riduceva significativamente il colesterolo LDL rispetto al placebo a 12 settimane, se aggiunto a statine o ad altri ipolipemizzanti orali. I risultati dello studio di estensione hanno mostrato che il trattamento ha ridotto significativamente il colesterolo LDL del 14,4%, coerentemente con quanto osservato nello studio originale.

