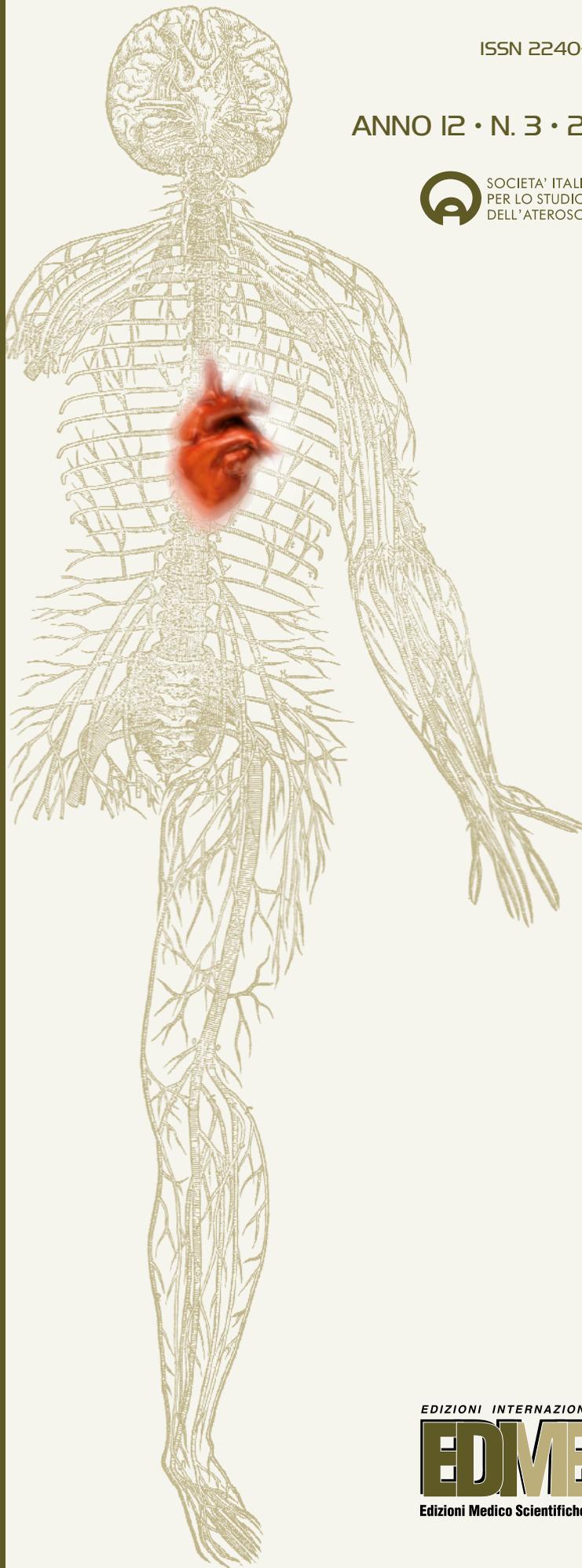


GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI



ISSN 2240-4821

ANNO 12 • N. 3 • 2021

 SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ARTERIOSCLEROSI

EDIZIONI INTERNAZIONALI s.r.l.

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. Salvoli
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. Pisciotto (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)

Anno 12 • N. 3 • 2021

SOMMARIO

■ IN MEMORIA

- Prof. Rodolfo Paoletti** 5
Gli allievi del dipartimento di scienze farmacologiche e biomolecolari
- Prof. Michele Muggeo** 7
Enzo Bonora, Riccardo Bonadonna, Paolo Moghetti a nome di tutti i suoi allievi

■ DEFICIT LCAT

- Eterogeneità genetica e fenotipica nel deficit LCAT** 10
Genetic and phenotypic heterogeneity in LCAT deficiency
Chiara Pavanello

■ LIPOPROTEINE AD ALTA DENSITÀ (HDL)

- Le lipoproteine ad alta densità: uno strumento polivalente contro il cancro?** 19
High density lipoproteins as a multitasking tool to fight cancer
Alice Ossoli, Monica Gomaschi

■ MEDICINA SPERIMENTALE

- Rigenerazione cardiaca: un traguardo possibile** 31
Cardiac regeneration: a possible goal
Mauro Giacca

■ LIPIGEN PEDIATRICO

- Migliorare la diagnosi e la gestione di bambini e adolescenti affetti da ipercolesterolemia familiare: il gruppo lipigen pediatrico** 44
Improving the diagnosis and management of children and adolescents with family hypercholesterolemia: the pediatric lipigen group
Marta Gazzotti, Giorgia Carlucci, Manuela Casula

■ MEDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ

- Cambiamenti climatici e salute** 52
Climate change and health
Filippo Giorgi

■ NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI

- European Atherosclerosis Society 2021** 56
Manuela Casula

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDIMES

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'ARTERIOSCLEROSI

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 Balzaretto, 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

■ Genetica

Deficit di LCAT

Questa rassegna sul deficit genetico di LCAT si fonda sull'esperienza acquisita dall'autrice nello studio genetico, biochimico e clinico della più grande coorte di famiglie ad oggi disponibile. Infatti, nonostante si tratti di una rara malattia monogenica, le manifestazioni biochimiche e cliniche possono essere molto diverse tra i portatori del difetto e non necessariamente la conseguenza dell'attività residua dell'enzima.

LCAT deficit

This review on the genetic deficiency of LCAT is based on the experience gained by the author in the genetic, biochemical and clinical study of the largest cohort of families available to date.

In fact, despite being a rare monogenic disease, the biochemical and clinical manifestations can be very different between the patients and not necessarily the consequence of the residual activity of the enzyme.

Lipoproteine ad alta densità (HDL)

La potenzialità delle HDL di opporsi al processo tumorale viene suggerita dal ruolo centrale nella modulazione dell'omeostasi del colesterolo cellulare e dalle loro azioni antiossidanti e antiinfiammatorie. Sulla base di queste premesse, l'articolo analizza le evidenze epidemiologiche relative all'associazione tra HDL-C e l'insorgenza di varie forme di tumore, gli studi in vitro su modelli animali e la possibilità di utilizzare le HDL ricostituite come veicolo di farmaci antineoplastici.

High Density Lipoproteins (HDL)

The potential of HDLs to oppose the tumor process is suggested by their central role in the modulation of cellular cholesterol homeostasis and by their antioxidant and anti-inflammatory actions. Based on these premises, the article analyzes the epidemiological evidence relating to the association between HDL-C and the onset of various forms of cancer, in vitro studies on animal models and the possibility of using reconstituted HDL as a drug vehicle of antineoplastics.

■ Medicina sperimentale

Rigenerazione cardiaca

Lo scompenso cardiaco rappresenta sovente la tappa finale della cardiopatia ischemica e delle altre cardiopatie con perdita di miocardiociti, la cui prognosi continua a mantenersi infausta con tassi di mortalità simili a quelli delle malattie neoplastiche. In questo articolo, lo stato attuale delle conoscenze sulla rigenerazione cardiaca, analizzato da uno dei pionieri di questa branca della medicina sperimentale nei suoi aspetti fisiopatologici e sperimentali, sembra suggerire che la rigenerazione cardiaca possa essere in un futuro prossimo un approccio terapeutico possibile nelle cardiopatie con perdita estesa di miocardiociti.

Cardiac regeneration

Heart failure often represents the final stage of ischemic heart disease and other heart diseases with loss of myocytes, whose prognosis continues to remain poor with mortality rates similar to those of neoplastic diseases. In this article, the current state of knowledge on cardiac regeneration, analyzed by one of the pioneers of this branch of experimental medicine in its pathophysiological and experimental aspects, seems to suggest that cardiac regeneration may be in the near future a possible therapeutic approach in heart disease with extensive loss of myocytes.

LIPIGEN pediatrico

Lo studio LIPIGEN pediatrico è stato istituito nel 2018 con lo scopo di migliorare lo screening, la diagnosi e la gestione clinica dei bambini e degli adolescenti affetti da ipercolesterolemia familiare (FH). L'integrazione con i parametri specifici dei soggetti di questa età rappresenta una tappa fondamentale per implementare l'algoritmo diagnostico, l'approccio farmacologico e gli obiettivi terapeutici della FH in età pediatrica.

Pediatric LIPIGEN

The pediatric LIPIGEN study was established in 2018 with the aim of improving the screening, diagnosis and clinical management of children and adolescents with familial hypercholesterolemia (FH). The integration with the specific parameters of subjects of this age represents a fundamental step in implementing the diagnostic algorithm, the pharmacological approach and the therapeutic objectives of FH in pediatric age.

■ Medicina, Scienza e Società

Cambiamenti climatici e salute

Il riscaldamento globale è una delle grandi sfide scientifiche, tecnologiche, socio-economiche e culturali del ventunesimo secolo. L'impatto del riscaldamento del pianeta sulla salute umana viene affrontato in questo articolo da un rappresentante di quel gruppo di scienziati insigniti per il loro impegno del premio Nobel per la pace.

Climate change and health

Global warming is one of the great scientific, technological, socio-economic and cultural challenges of the twenty-first century. The impact of global warming on human health is addressed in this article by a representative of that group of scientists who were awarded the Nobel Peace Prize for their efforts in the field.

■ Notizie da Congressi Internazionali

Notizie dal Congresso dell'European Atherosclerosis Society 2021

News from the European Atherosclerosis Society 2021 Congress

IN MEMORIA DEL**Prof. RODOLFO PAOLETTI****GLI ALLIEVI DEL DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE E BIOMOLECOLARI**

SISA condivide e pubblica il ricordo del Professor Rodolfo Paoletti da parte dei suoi allievi e si associa al cordoglio per la scomparsa del Professore, una figura di riferimento per molti dei nostri soci, che ha contribuito in maniera disinteressata alle attività della nostra Società scientifica fin dalla sua fondazione.

Il ricordo degli allievi del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari dell'Università degli Studi di Milano e l'istituzione del "Premio alla ricerca Rodolfo Paoletti"

Rodolfo Paoletti nasce a Milano in una famiglia di medici. Il padre chirurgo assai abile, il fratello neurochirurgo di successo: di fatto obbligatoria quindi la Laurea in Medicina e Chirurgia, cui non segue però la consueta attività clinica. L'incontro con Emilio Trabucchi lo orienta infatti verso la ricerca. Dove? A Bethesda, da Bernard B. Brodie, allora numero uno della farmacologia nel mondo. Racconta Brodie: "*Paoletti si mise ad estrarre con solventi il tessuto adiposo, trovando quantità rilevanti di norepinephrina, e cominciò a pensare alla regolazione adrenergica del tessuto adiposo*".

Da qui deriva forse la più importante osservazione scientifica personale di Paoletti: Il controllo della "lipolisi". Un fenomeno per molti anni sulla cresta dell'onda, seguito da un periodo di silenzio ma tornato in auge in anni più recenti: l'aumentata lipolisi determina infatti non solo una salita dei precursori per i trigliceridi circolanti, fornendo anche un substrato energetico, ma costituisce un elemento di rischio per le

aritmie, le patologie vascolari, il diabete.

Il soggiorno a Bethesda porta Paoletti ad alcune conclusioni importanti sul suo futuro. Nota che la ricerca a quei tempi era di fatto un monopolio USA, con aperture quasi "caritatevoli" verso i colleghi Europei. Gli appare quindi evidente la necessità sia di muovere i più giovani ad esperienze oltreoceano, sia di aprire un'area organizzativa congressuale all'altezza di quella USA.

Nell'Istituto di Farmacologia dell'Università di Milano trova la sede ideale per questa sua missione. Organizza inizialmente convegni soprattutto nell'area della dinamica del tessuto adiposo, sempre frequentati ad altissimo livello. L'arrivo dei primi farmaci che regolano il colesterolo e i trigliceridi circolanti lo porta poi ad affrontare le dislipidemie e l'arteriosclerosi, con la storica iniziativa dei Drugs Affecting Lipid Metabolism (DALM), cui seguono una serie di attività nell'ambito della nutrizione umana e della prevenzione vascolare. La sua dinamica scientifica e organizzativa apre poi ampi spazi anche alla ricerca e all'organizzazione in campo neuropsicofarmacologico e tossicologico.

Dopo un brillante triennio di Ordinariato a Cagliari, tornato a Milano gli appare evidente come una sola Facoltà di Medicina a Milano stia obbiettivamente stretta ed avvia, assieme a Pietro Pratesi, leader della Chimica Farmaceutica, la Facoltà di Farmacia, con una nuova Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche. La nuova Facoltà inizia ad operare con l'A.A. 1970/71 e l'Ordinamento viene inserito nello Statuto

dell'Università degli Studi di Milano in data 24/7/1991, entrando in vigore nell'A.A. 1991/92. La Facoltà acquisisce una sede autonoma, in due edifici, uno dei quali, in via Balzaretti 9, realizzato con un fondo FAI, grazie all'appoggio del Ministro Pier Luigi Romita.

Le attività scientifiche dell'ormai esteso gruppo di ricerca guidato dal prof. Paoletti hanno ora una sede autonoma e grandi prospettive di sviluppo. Alla Facoltà di Farmacia fanno anche riferimento Centri Clinici come il Centro Grossi Paoletti di Niguarda, il Centro Cardiologico Monzino, il centro studi Aterosclerosi del Bassini e l'IRCCS MultiMedica, con numerosi ricercatori provenienti dalla Facoltà. La Fondazione Giovanni Lorenzini e la Nutrition Foundation of Italy offrono un importante supporto alle iniziative congressuali ed editoriali ed esportano la sua visione della ricerca in ambiti contigui a quello, in cui è maestro, della Farmacologia. Come riconoscimento indiscusso del suo ruolo nella farmacologia italiana ed internazionale viene eletto Presidente della Società Italiana di Farmacologia e Presidente della Federation of European Pharmacological Societies – EPHAR.

È un momento di grandissima visibilità internazionale del prof. Paoletti. Rappresenta l'Italia per oltre un decennio nel Consiglio Scientifico NATO a Bruxelles, e riceve, nel volgere di pochi anni, ben cinque lauree Honoris Causa (in Medicina presso il Karolinska Institutet di Stoccolma nel 1983, in Farmacia all'Università di Urbino nel 1985, nuovamente in Medicina, nel 1992, all'Università di Montpellier e nel 1996 all'Università di Gdansk, in Polonia). Chiude questa serie prestigiosa, nel 1999, la laurea ad honorem della Facoltà di Farmacia e Biochimica dell'Università di Buenos Aires.

Nel 1986 lancia il "Programma Nazionale di Educazione al Controllo del Colestero-

lo", con il patrocinio del Ministero della Sanità. Porta le sue competenze a servizio dell'intero Paese, dal 1986 al 1989 come membro del Consiglio Universitario Nazionale (CUN) per il Ministero della Pubblica Istruzione, e dal 1995 al 1999 della Commissione Unica del Farmaco (CUF), per il Ministero della Sanità. Nel 2007 viene nominato Professore Emerito di Farmacologia. È a lungo Preside della Facoltà di Farmacia a Tirana.

Il prof. Paoletti non ha mai abbandonato la sua intensa routine di viaggi e incontri (ricordava con un certo compiacimento di aver superato i 300 voli negli USA). Il successo nella sua attività di leader di una importante disciplina accademica, con le affermazioni di tanti suoi allievi, si è caratterizzato infatti per la sua costante presenza. La domanda era sempre la stessa: "Ci sarà Paoletti?". Sì, quando occorreva c'è sempre stato. È tuttora diffusa la gratitudine per l'opera del prof. Paoletti nello sviluppare convegni internazionali che hanno consentito ad allievi e ricercatori di tutto il mondo di comparire in sedi di prestigio, con conseguenti importanti sviluppi per le loro carriere. E per la creazione di un network (o più precisamente di una serie di network) che hanno consentito alle persone di interpretare la ricerca, come lui ha sempre sostenuto, come collaborazione, condivisione, interazione.

Gli ultimi anni proiettano purtroppo un'ombra oscura sulle vicende vitali del nostro Maestro. Ci ha lasciati in silenzio, ma non è stato per nulla dimenticato. Ricorderemo soprattutto la sua costante e riconosciuta capacità di essere sempre "qualche metro davanti agli altri" nella visione anticipatoria di quello che ci avrebbe portato il futuro.

Grazie, Professor Paoletti, grazie Rodolfo. Buon viaggio.

IN MEMORIA DEL**Prof. MICHELE MUGGEO****ENZO BONORA, RICCARDO BONADONNA, PAOLO MOGHETTI
A NOME DI TUTTI I SUOI ALLIEVI**

Nella notte fra il 22 e il 23 agosto 2021, all'età di 82 anni, si è spento serenamente nella sua abitazione di Padova, accanto alla sua amata moglie Maria, il prof. Michele Muggeo, fondatore della Scuola Endocrino-Metabolica di Verona e nostro illuminato Maestro.

Nato a Barletta nel 1938, il prof. Muggeo si è laureato a Padova nel 1964, formandosi e crescendo professionalmente nella Scuola dei Professori Patrassi e Crepaldi, dapprima come medico interno e poi come assistente volontario, assistente di ruolo e infine come aiuto universitario. Negli anni sessanta e settanta ha acquisito ben sei specializzazioni, nell'ordine Ematologia, Cardiologia, Medicina Interna, Gerontologia e Geriatria, Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Ricambio, e, giovanissimo, una libera docenza in Semeiotica Medica. Nella seconda metà degli anni settanta ha trascorso un lungo periodo di studio e ricerca come Visiting Scientist presso la Diabetes Branch dell'NIH di Bethesda, MD, USA, a fianco di ricercatori del calibro di Jesse Roth, Ronald Kahn, Philip Gorden, Jeffrey Flier, Robert Bar, Emmanuel Van Obberghen, Pierre De Meyts, Len Harrison, Barry Ginsberg. Nel 1980 è stato chiamato come Professore Ordinario di Endocrinologia dall'Università di Ancona e due anni dopo dall'Università di Verona, dove ha operato per quasi trent'anni, fino alla quiescenza nel 2009, essendone poi nominato Professore Emerito. Negli anni trascorsi presso l'Università di Verona ha di-

retto dapprima la Scuola di Specializzazione in Diabetologia e Malattie del Ricambio e la Scuola di Specializzazione in Endocrinologia e dal 1991 la Scuola di Specializzazione in Endocrinologia e Malattie del Metabolismo. Ha anche coordinato il Dottorato di Ricerca in Malattie Cronico-Degenerative e in seguito quello in Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali. Per oltre 25 anni è stato direttore del Centro di Verona del Gruppo di Studio delle Malattie Dismetaboliche e dell'Aterosclerosi.

La sua attività scientifica ha spaziato da studi sulla fisiopatologia della secrezione del GH a pioneristiche ricerche sul recettore insulinico, da studi sulla fisiopatologia dell'insulinoreistenza a ricerche sull'epidemiologia del diabete e delle sue complicanze. Numerosi i contributi derivati dal Verona Diabetes Study che lui ha ideato e guidato per anni. I suoi studi hanno portato alla pubblicazione di oltre 300 lavori, di cui oltre la metà su prestigiose riviste internazionali. Ha anche contribuito alla stesura di capitoli di numerosi trattati e atti di congressi nazionali e internazionali. Ha fatto parte dell'Editorial Board di numerose riviste e per moltissime riviste ha esercitato la funzione di revisore. La sua ricerca è stata finanziata dal Ministero dell'Università, dal Ministero della Salute, dal CNR e da varie altre istituzioni nazionali e internazionali.

Il prof. Muggeo è stato membro attivissimo della Società Italiana di Diabetologia (SID), svolgendo vari compiti fra cui il coordinamento del Gruppo di Studio per l'E-

ducazione (GISED, 1981-1991). È stato per due quadrienni membro del consiglio direttivo SID (1986-1990 e 1998-2002) e nel biennio 2000-2002 ne è stato Presidente, organizzandone il Congresso Nazionale a Verona nel 2002. La SID l'ha successivamente nominato Presidente Onorario. È stato anche componente del Consiglio Direttivo della Società Italiana di Endocrinologia (SIE) nel quadriennio 1982-1986, membro della Commissione designata a elaborare il nuovo statuto della società nel 1985 e organizzatore di due congressi nazionali tenutisi a Verona nel 1988 e nel 2007. È stato anche membro di altre società scientifiche in Italia, oltre che della American Diabetes Association e della European Association for the Study of Diabetes, del cui gruppo di studio sulla Epidemiologia (EDEG) ha organizzato un convegno a Verona nel 1999. Qualche anno prima, sempre a Verona, aveva organizzato il 4° International Symposium on Insulin Receptor and Insulin Action. Nel complesso, l'attività organizzativa di eventi scientifici locali, regionali, nazionali e internazionali è sempre stata intensa.

Michele Muggeo era una persona di un'onestà cristallina, incrollabilmente leale e sincero, generoso, disponibile, socievole e ospitale. Quanto era serio e impegnato nel lavoro, tanto diventava amicale, empatico e affettuoso nelle pause di lavoro e nella convivialità. Gli piaceva avere persone intorno a cui offrire qualcosa. Era un buono. Una brava persona.

Nel suo lavoro Michele Muggeo era appassionato, instancabile, meticoloso, tenace, lucido e lungimirante. Aveva un innato spirito di sacrificio, una inesauribile percezione del proprio dovere e un fortissimo senso di appartenenza. Fosse questa l'Università, l'Ospedale, la struttura che dirigeva, la comunità diabetologica ed endocrinologica italiana, la cerchia di amici e

colleghi italiani e di oltre confine. È stato uno straordinario promotore della endocrinologia e della diabetologia italiana in tutte le loro espressioni: scientifiche, cliniche, formative, divulgative e ha alimentato spesso collaborazioni per far crescere i suoi ma anche gli altri. Molti, in vari contesti, sono maturati e cresciuti professionalmente grazie ai suoi consigli e alle sue ispirazioni.

Tuttavia, i tre aggettivi che a nostro avviso meglio lo descrivono nel contesto lavorativo sono visionario, trascinatore e costruttore.

Visionario, nel senso positivo del termine, perché pensava in grande e vedeva certe cose prima di altri, nel campo scientifico, didattico e clinico. Intuì, lui che aveva solide basi in campo molecolare e fisiopatologico, l'importanza dell'epidemiologia nel campo del diabete. Intuì la necessità di essere innovativi nella trasmissione della conoscenza agli altri, fossero questi specialisti, medici del territorio, infermieri, farmacisti o altre figure professionali, persone con il diabete. Intuì, che certe patologie, come il piede diabetico o l'ipercolesterolemia familiare, meritavano più attenzione e compassione. Compassione che ebbe sempre in abbondanza, unitamente all'empatia, nella sua attività di medico.

Trascinatore perché quando individuava un obiettivo ti faceva complice nella passione per lo stesso, ti stimolava, ti faceva capire che era la scelta più appropriata anche quando tu eri perplesso e poi ti lasciava andare verso quell'obiettivo. Verso il successo che lui vedeva come un successo di gruppo più che suo personale.

Costruttore perché ha fondato dal nulla una scuola e una struttura assistenziale che hanno una collocazione di prestigio nel panorama nazionale e internazionale. Quando arrivò a Verona nel 1982 era solo e osteggiato dall'ambiente, percepito come un

estraneo forse di passaggio. Non si è arreso mai di fronte a nulla, indomito, e poco a poco, anno dopo anno, è riuscito ad attrarre persone, a ottenere spazi e attrezzature e personale di ruolo. E quando non otteneva personale di ruolo, generava posti precari cercando, fino allo sfinimento, fondi per sostenerli, senza abbandonare mai nessuno. È riuscito a far crescere in maniera esponenziale quello che aveva fondato dal nulla senza aiuti politici o accademici particolari, senza compromessi di sorta, solo duro lavoro. Non si è mai vantato di questo, eppure, da uomo solo a cui era stata concessa una stanzetta di 15 metri quadrati e l'uso di una porzione di un bancone di laboratorio, in 25 anni ha costruito una struttura in cui lavorano quasi 100 persone, producendo

scienza, formazione e assistenza come in poche altre sedi in Italia. Tutto perché lui nel 1982 aveva guardato oltre, gettato le fondamenta e lavorato alacremente per realizzare quello che allora sembrava un sogno impossibile. Lui, il visionario, il trascinatore, il costruttore.

Questo è stato e per noi sempre sarà Michele Muggeo: un vero e inarrivabile Maestro nella ricerca, nella didattica e nella clinica. Non è stato però solo questo per noi, che per molti anni abbiamo avuto il privilegio di lavorare al suo fianco. È stato anche un formidabile esempio di grande umanità e dell'arte di saper cogliere nel quotidiano motivi per sorridere o per entusiasmarsi. A lui andrà sempre il nostro pensiero affettuoso e riconoscente.

DEFICIT LCAT

ETEROGENEITÀ GENETICA E FENOTIPICA NEL DEFICIT LCAT

Genetic and phenotypic heterogeneity in LCAT deficiency

CHIARA PAVANELLO

Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano

SUMMARY

Genetic LCAT deficiency is a very rare monogenic disorder of lipid metabolism due to loss-of-function mutation in the *LCAT* gene, which codes for the enzyme responsible for esterification of plasma cholesterol. The main feature is the low plasma HDL-cholesterol level. Other manifestations include corneal opacification, anemia and renal disease, which is the major cause of morbidity and mortality in carriers. Despite being monogenic, biochemical and clinical manifestations, as well as the clinical outcomes, may largely vary among carriers and may not be predicted by the residual enzymatic activity, neither by the type of *LCAT* mutation. Thus, the collection of large series of carriers of LCAT deficiency is needed to address various open questions on this disease, mainly related to the prediction of clinical outcome. In addition, despite some therapeutic attempts, serious clinical manifestations, which can occur already in the first decades of life, are presently with no cure. The timely diagnosis in carriers, together with the identification of disease biomarkers able to predict the evolution of clinical manifestations, would be of great help in the identification of carriers to address to future available therapies.

Key words: *Lecitin:cholesterol acyltransferase (LCAT), unesterified cholesterol, high-density lipoprotein.*

Introduzione

Il deficit genetico di lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT) è una malattia molto rara del metabolismo lipidico a trasmissione autosomica recessiva, dovuta

a mutazioni del gene *LCAT* con perdita di funzione (1). Seppur interessino lo stesso gene, le mutazioni di *LCAT* possono dare origine a due diverse sindromi: il deficit familiare di LCAT (FLD; OMIM #245900) e il fish-eye disease (FED; OMIM #136120). Mentre la prima è causata dall'assenza o dalla completa inattività dell'enzima, la seconda è causata da mutazioni che aboliscono selettivamente la capacità di esterificare il colesterolo in HDL, il principale substrato dell'enzima, che invece conserva intatta la sua capacità di esterificare il cole-

Indirizzo per la corrispondenza

Chiara Pavanello
Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento
di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano, Milano, Italy
E-mail: chiara.pavanello@unimi.it

sterolo nelle lipoproteine contenenti l'apolipoproteina B (apoB) (2). Di conseguenza, mentre gli FLD omozigoti non hanno virtualmente esteri del colesterolo circolanti, i FED ne mantengono livelli plasmatici normali o subnormali, tutti trasportati dalle lipoproteine contenenti apoB (VLDL e LDL).

Le manifestazioni cliniche del deficit LCAT includono l'opacità corneale bilaterale, un chiaro segno distintivo della patologia in tutti i casi, l'anemia emolitica e la malattia renale. Quest'ultima rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità in questo difetto genetico e può manifestarsi già nella seconda decade di vita (3). La maggior parte delle mutazioni del gene *LCAT* ad oggi conosciute sono state identificate e descritte in singoli casi clinici o in piccole famiglie. Negli ultimi vent'anni, il nostro gruppo di ricerca è riuscito invece a mettere insieme 33 diverse famiglie di portatori (4, 5), la più grande coorte disponibile ad oggi, che ha consentito di approfondire le caratteristiche cliniche e biochimiche dei soggetti con difetto genetico di LCAT.

Il ruolo della lecitina:colesterolo aciltransferasi nel metabolismo lipidico

Una singola copia del gene *LCAT* (~4.5 kb) è localizzata sul cromosoma 16 (regione 16q22); l'mRNA di LCAT si trova prevalentemente nel fegato, ma anche nel cervello e nei testicoli. L'enzima maturo è una glicoproteina di 416 amminoacidi con una massa molecolare di circa 67 kDa (2) e circola nel plasma ad una concentrazione che va tra i 3 e i 6 µg/mL, principalmente legato alle lipoproteine. LCAT è l'unico enzima in grado di esterificare il colesterolo nel plasma e negli altri fluidi biologici e la sua attività enzimatica comprende attività fosfoli-

Elenco degli argomenti trattati

LCAT e metabolismo lipidico
 Il deficit genetico di LCAT
 L'eterogeneità genetica nel deficit di LCAT
 L'eterogeneità biochimica nel deficit di LCAT
 L'eterogeneità clinica nel deficit di LCAT

pasiche e aciltransferasiche. Infatti, LCAT prima catalizza il taglio dell'acido grasso in posizione sn-2 della lecitina e il suo successivo trasferimento sul residuo Ser181; in seguito, transesterifica l'acido grasso sul gruppo libero 3-β idrossile del colesterolo, per generare gli esteri del colesterolo (2). In questo modo LCAT è responsabile della formazione della maggior parte degli esteri del colesterolo nel plasma. Il substrato lipidico preferenziale di LCAT è in HDL (6) dove viene attivato dall'apolipoproteina A-I (apoA-I) e dove esterifica il colesterolo mediante la sua attività definita α-LCAT. LCAT è però in grado di esterificare anche il colesterolo nelle lipoproteine contenenti apoB, tramite la sua attività definita β, utilizzando invece l'apolipoproteina E (apoE) come cofattore (7). Esterificando il colesterolo sulle HDL nascenti, discoidali (8), LCAT svolge un ruolo cruciale nel rimodellamento intravascolare delle HDL e nel determinare le concentrazioni plasmatiche di colesterolo HDL.

In aggiunta alla sua funzione nel metabolismo lipidico, LCAT è stato a lungo considerato un elemento cruciale del trasporto inverso del colesterolo (reverse cholesterol transport, RCT) nel macrofago, il processo mediante il quale il colesterolo in eccesso è rimosso dalle cellule periferiche e convogliato al fegato per essere escreto (9). Tuttavia, alcuni dati nel modello animale e umano di deficit di LCAT genetico ne hanno messo in discussione il suo ruolo critico (10, 11).

Il deficit genetico di lecitina:colesterolo aciltrasferasi

Il deficit di LCAT è stato descritto per la prima volta 50 anni fa da Norum e Gjone (12) in una donna norvegese che presentava opacità corneale bilaterale, anemia, proteinuria e dislipidemia. I livelli di colesterolo e trigliceridi plasmatici erano moderatamente elevati, con la maggior parte del colesterolo in forma non esterificata e colesterolo HDL non dosabile. Anche le sorelle della probanda mostravano un fenotipo simile (13) a suggerire la natura ereditaria del difetto. Tutte e tre i soggetti presentavano attività enzimatica di LCAT assente. Dopo questi, circa 130 casi di difetto parziale o completo di LCAT sono stati descritti.

L'eterogeneità genetica nel deficit di LCAT

Le mutazioni causative di FLD possono sia abolire completamente la sintesi di LCAT, sia risultare nella sintesi di un enzima senza alcuna attività sulle lipoproteine (quindi senza attività- α né attività- β). Le mutazioni causative per FED invece aboliscono solo l'attività- α , mantenendo quella β (1). La diagnosi differenziale tra FLD e FED è possibile solo nei portatori di due alleli *LCAT* mutati e richiede la misurazione della capacità del plasma del soggetto di esterificare il colesterolo sulle lipoproteine endogene (attività- α e attività- β insieme, CER, cholesterol esterification rate) e su un substrato esogeno standardizzato costituito da una HDL sintetica (solo attività- α , LCAT activity) (4). Entrambe le misurazioni devono risultare nulle negli FLD, mentre nei FED, la prima è normale o subnormale, mentre la seconda è nulla (*Tabella 1*). I portatori di un solo allele *LCAT* mutato non possono invece essere classificati come FLD o FED sulla base dei criteri biochimici, e la diagnosi differenziale richiede l'espressione del mutante di LCAT in col-

ture di fibroblasti, e la successiva misurazione della concentrazione e della attività di LCAT nel medium (14).

Ad oggi sono state riportate 120 diverse mutazioni, la maggior parte delle quali descritte come varianti private. Tra queste, 80 sono state classificate come FLD e 12 con FED, mentre 28 varianti non sono state classificate. Da notare come le mutazioni siano distribuite uniformemente per tutta la sequenza del gene *LCAT*, spesso in regioni anche distanti dal sito catalitico dell'enzima e probabilmente importanti nel mantenimento della struttura dell'enzima. Tutte portano all'abolizione dell'attività- α , mentre non sono state mai descritte mutazioni che aboliscano selettivamente l'attività- β . Sembra perciò che l'interazione tra LCAT e le lipoproteine contenenti apoA-I sia molto più sensibile ai cambiamenti strutturali di LCAT rispetto all'interazione tra l'enzima e le lipoproteine contenenti apoB.

Nonostante sia disponibile il modello tridimensionale dell'enzima (15), e gli sforzi di vari gruppi di ricerca abbiano portato a definire l'impatto delle diverse mutazioni sulla relazione struttura-attività enzimatica (16, 17), ad oggi non è ancora possibile predire il fenotipo (FED, FLD) associato alle mutazioni naturalmente presenti in natura. Questo può essere verosimilmente spiegato dalla complessità della reazione catalizzata da LCAT, che non è solo dipendente dall'enzima stesso, ma anche dai suoi substrati e dagli attivatori.

L'analisi molecolare dei 31 portatori di deficit di LCAT appartenenti alla coorte italiana ha consentito di identificare 34 diverse mutazioni, confermando l'eterogeneità genetica della malattia. Ventitré dei 128 individui appartenenti alle 31 famiglie esaminate sono portatori di due alleli *LCAT* mutati (13 omozigoti e 10 eterozigoti composti), 66 sono portatori di un allele mutato e 39 non presentano la mutazione. Undici dei 18 por-

tatori di due alleli mutati non presentano alcuna attività- α né attività- β e sono stati quindi catalogati come FLD; sette individui hanno invece attività- β misurabile e attività- α nulla, pertanto sono stati classificati come FED.

L'eterogeneità biochimica nel deficit di LCAT

Il difetto di LCAT comporta drammatiche alterazioni del profilo lipidico e lipoproteico sia negli FLD che nei FED (4, 5). Le principali differenze sono riportate in tabella 1. I ridotti livelli plasmatici di colesterolo HDL rappresentano una caratteristica comune della patologia: tuttavia, la gravità della ipoalfalipoproteinemia varia grandemente tra i portatori di diversi genotipi, come dimostrato dalle ampie variazioni dei livelli di colesterolo HDL (da 3 a 27 mg/dL) misurato nella coorte italiana (4, 18).

Le HDL circolanti nei portatori non sono alterate solo in termini di concentrazione di colesterolo, ma anche in termini di distribuzione delle sottoclassi di HDL, con un aumento di quelle piccole e discoidali, e una completa mancanza di quelle grandi mature e sferiche (19). I livelli di colesterolo totale e LDL, così come i livelli di trigliceridi mostrano un'ampia variabilità interindividuale (18), anche tra soggetti appartenenti alla stessa famiglia e quindi portatori della stessa mutazione genetica (4). Tale variabilità può essere attribuita a

fattori genetici, come la coereditarietà di mutazioni nei geni *LDLR* o *APOB* (20, 21), o a fattori metabolici e ambientali.

La variabilità del profilo lipidico non sembra essere correlata al difetto funzionale dell'enzima LCAT, poiché soggetti con difetto parziale o con assenza completa di attività di LCAT possono avere profili lipidici molto simili (18). Tuttavia, almeno due parametri sono inequivocabilmente determinati dall'attività enzimatica residua. Uno di questi è il colesterolo non esterificato e, ancora più sensibilmente, il rapporto colesterolo esterificato su colesterolo totale. Entrambi sono aumentati notevolmente negli FLD, e questo consente di distinguerli dai casi di FED (*Figura 1*). I livelli circolanti di colesterolo esteri sono invece considerevolmente ridotti solo negli FLD, e non nei FED, eccetto per alcune sovrapposizioni (*Figura 1*). Anche i livelli di apoB sono sorprendentemente bassi negli FLD (18), nonostante i livelli di colesterolo LDL siano comparabili tra i due fenotipi (18). L'accumulo plasmatico di colesterolo non esterificato negli FLD è infatti responsabile della formazione di una lipoproteina anomala, generalmente assente in condizioni fisiologiche, chiamata LpX, che non contiene apoB ed è principalmente costituita da fosfolipidi e colesterolo non esterificato. La LpX è assente nei FED e questo può per-

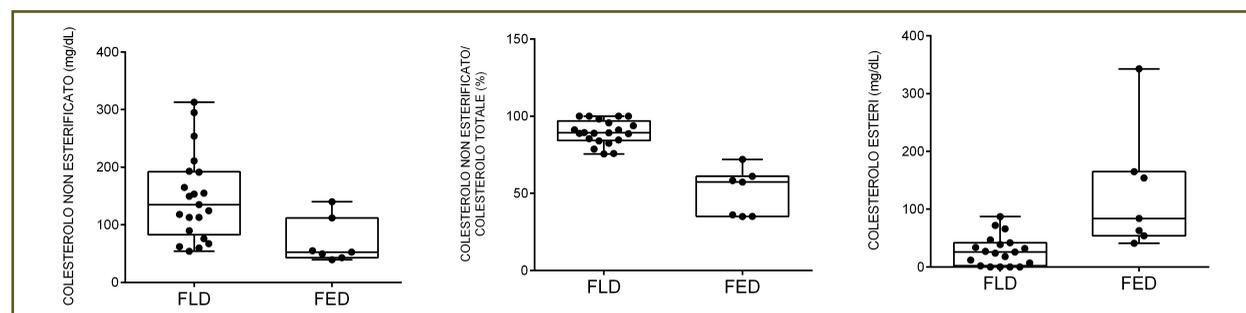


Figura 1 - Livelli plasmatici di colesterolo non esterificato, colesterolo esteri e rapporto colesterolo non esterificato/colesterolo totale nella coorte italiana di portatori di deficit familiare di LCAT (FLD) e di fish-eye disease (FED). I box-plot riportano i valori mediani con il 25° e il 75° percentile; i valori minimo e massimo.

ciò dare conto della differenza nei livelli di apoB tra i due fenotipi (*Tabella 1*).

I portatori di un solo allele *LCAT* mutato mostrano un profilo biochimico intermedio a quello degli omozigoti e dei controlli, a suggerire quindi che la malattia, che è descritta come recessiva, sia piuttosto co-dominante per il fenotipo biochimico. Come per gli omozigoti e gli eterozigoti composti, i livelli di colesterolo HDL e di apoA-I sono generalmente ridotti rispetto ai controlli (4), e la distribuzione delle sottoclassi HDL è alterata, con un arricchimento di particelle piccole e discoidali (22). Nessuna differenza si può notare invece tra eterozigoti FLD e FED.

L'eterogeneità clinica nel deficit di LCAT

Come detto, le manifestazioni cliniche tipiche del deficit di *LCAT* includono l'o-

pacità corneale, l'anemia emolitica e la malattia renale (1). Caratteristiche meno comuni della patologia, come la presenza di lieve trombocitopenia, sono state descritte recentemente in una grande famiglia di FLD (23).

L'opacità corneale è una caratteristica tipica della malattia, presente sia negli FLD che nei FED. Viene spesso individuata durante l'infanzia, anche se esiste un'ampia variabilità nell'esordio e nella severità tra i diversi portatori. L'analisi istochimica e chimica della cornea mostra la presenza di depositi extracellulari di colesterolo non esterificato e fosfolipidi (24). In alcuni casi, quando lo scempenso visivo è grave, è richiesto il trapianto di cornea (25, 26). La maggior parte degli FLD, e alcuni FED, mostrano una lieve anemia normocromica, legata all'alterazione della membrana eri-

Tabella 1 - Riassunto delle principali caratteristiche genetiche, biochimiche e cliniche del deficit familiare di *LCAT* (FLD) e del fish-eye disease (FED).

	FLD	FED
<i>Genetica</i>		
Ereditarietà	Autosomica recessiva	Autosomica recessiva
<i>Biochimica</i>		
HDL colesterolo	↓↓	↓↓
Apolipoproteina A-I	↓↓	↓↓
Colesterolo non esterificato/colesterolo totale	↑↑	↑
Colesterolo totale	↓=	↑=
Trigliceridi	↑	=
Colesterolo LDL	↓=	=
Apolipoproteina B	↓	=
Lipoproteina X	Presente	Assente
LCAT activity	0	0
CER	0	Normale/ridotta
<i>Clinica</i>		
Opacità corneale	Presente	Presente
Anemia emolitica	Presente	Assente (rara)
Malattia renale	Presente	Assente
IMT carotideo	Ridotta	Normale/aumentata

trocitaria che si arricchisce in colesterolo non esterificato e fosfolipidi (27). Mediante studi di proteomica il nostro gruppo ha di recente riportato una riduzione dell'aptoglobina, nello specifico delle catene beta, nel plasma degli FLD, come indicatore di anemia emolitica (28).

La malattia renale si sviluppa unicamente negli FLD, e ne rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità. La proteinuria può insorgere già durante la prima decade di vita (3) e può progredire in maniera imprevedibile ad insufficienza renale fino a richiedere il trattamento sostitutivo. La patogenesi della malattia renale è stata compresa solo in parte, ma è chiaramente correlata alle alterazioni sistemiche, come è infatti dimostrato dal ripresentarsi del danno renale nei portatori trapiantati (29). La comparsa e la progressione dell'insufficienza renale è variabile tra gli FLD ed è verosimilmente correlata al fenotipo biochimico piuttosto che alla mutazione genetica (30). In un recente studio il nostro gruppo ha identificato nei livelli di colesterolo non esterificato uno dei fattori predittivi di malattia renale cronica (31). Studi nell'animale hanno dimostrato che la lipoproteina anomala individuata nel plasma degli FLD, la LpX, può rimanere intrappolata nel circolo capillare e provocare danno renale (32, 33); la patogenicità di questa lipoproteina è confermata anche dal trattamento con LCAT ricombinante, che riducendo la quota di colesterolo non esterificato, riduce l'accumulo plasmatico e tissutale di LpX, prevenendo quindi il danno renale (34).

Le ridotte concentrazioni plasmatiche di HDL colesterolo negli FLD e nei FED suggerirebbero un aumento del rischio cardiovascolare. Diversi gruppi hanno esaminato la situazione vascolare nel deficit di LCAT, con risultati spesso controversi (14, 35-37). In un recente studio, che ha messo insieme due coorti numerose di portatori di deficit

Glossario

apoA-I: apolipoproteina A-I

apoB: apolipoproteina B

apoE: apolipoproteina E

CER: cholesterol esterification rate; velocità di esterificazione del colesterolo

FED: fish-eye disease

FLD: familial LCAT deficiency; deficit familiare di LCAT

IMT: intima media thickness; ispessimento medio intimale

LCAT: lecitina:colesterolo aciltransferasi

RCT: reverse cholesterol transport, trasporto inverso del colesterolo

di LCAT e ha valutato l'ispessimento medio intimale (IMT) carotideo come marker surrogato di aterosclerosi preclinica, è emerso che gli FLD mostrano una ridotta aterosclerosi preclinica, mentre i FED hanno un leggero aumento di aterosclerosi carotidea rispetto ai controlli (38). Il diverso fenotipo vascolare tra FED e FLD è stato attribuito alle diverse concentrazioni plasmatiche di esteri del colesterolo in LDL, che sono significativamente ridotte negli FLD, ma aumentate nei FED.

Conclusioni

FLD e FED sono due sindromi causate da mutazioni con perdita di funzione nel gene *LCAT*. Le due sindromi condividono alcune caratteristiche biochimiche, ma mostrano importanti differenze nelle lipoproteine circolanti e nelle manifestazioni cliniche. Il colesterolo non esterificato si accumula nel plasma degli FLD, principalmente trasportato da lipoproteine anomale e può depositarsi nella cornea, negli eritrociti e nelle cellule renali, provocando le manifestazioni cliniche descritte. Il ridottissimo contenuto di esteri del colesterolo in tutte le lipoproteine plasmatiche limita il deposito di colesterolo nella parete arteriosa,

proteggendo di fatto gli FLD dallo sviluppo di aterosclerosi. I FED hanno invece livelli di esteri del colesterolo normali o aumentati in tutte le lipoproteine contenenti apoB, che quindi si depositano nella parete arteriosa provocando un aumento del grado di

aterosclerosi. Il diverso profilo clinico delle due sindromi sottolinea la necessità di una tempestiva diagnosi differenziale nei portatori di mutazioni del gene *LCAT* al fine di indirizzare i pazienti a programmi di prevenzione e ai futuri trattamenti disponibili.

Questionario di auto-apprendimento

1. Mediante la sua attività- β LCAT esterifica il colesterolo:

- a) sulle HDL
- b) sulle LDL
- c) su tutte le lipoproteine

2. Nei portatori di fish-eye disease:

- a) CER e LCAT activity sono nulle
- b) CER è aumentata e LCAT activity è ridotta
- c) CER è normale o ridotta, LCAT activity è nulla

3. I portatori di un solo allele *LCAT* mutato:

- a) possono essere classificati come FED o FLD sulla base della biochimica
- b) possono essere classificati come FED o FLD sulla base dell'attività enzimatica residua

- c) possono essere classificati come FED o FLD solo dopo studi di mutagenesi

4. Quale tra queste affermazioni sulla LpX è falsa:

- a) contiene apoB
- b) è costituita da colesterolo non esterificato e fosfolipidi
- c) non contiene colesterolo esterificato

5. L'ispessimento medio intimale carotideo nei deficit genetici di LCAT:

- a) è aumentato solo negli FLD
- b) è aumentato solo nei FED
- c) è ridotto sia nei FED che negli FLD

Risposte corrette: 1b, 2c, 3c, 4a, 5b

RIASSUNTO

Il deficit genetico di LCAT è un disordine monogenico molto raro del metabolismo lipidico, dovuto a mutazioni con perdita di funzione del gene *LCAT*, che codifica per l'enzima responsabile dell'esterificazione del colesterolo nel plasma. La principale caratteristica del deficit di LCAT sono i bassi livelli plasmatici di colesterolo HDL, mentre tra le altre manifestazioni si possono annoverare l'opacità corneale, l'anemia e la malattia renale. Quest'ultima rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nei portatori. Nonostante si tratti di una malattia monogenica, le manifestazioni biochimiche e cliniche, così come le conseguenze cliniche, possono essere molto diverse tra i portatori del deficit di LCAT e non sono necessariamente conseguenza dell'attività residua dell'enzima, né del tipo di mutazione. Per questo motivo è necessaria la raccolta di un'ampia casistica di portatori di deficit di LCAT che consenta di rispondere ad una serie di quesiti aperti sulla malattia, principalmente correlati alla previsione delle sue conseguenze cliniche. Inoltre, nonostante alcuni approcci terapeutici siano stati perseguiti, le manifestazioni cliniche gravi, che possono già presentarsi nella prima decade di vita, sono ad oggi senza cura. La diagnosi tempestiva, insieme all'identificazione di marcatori della malattia capaci di predirne l'evoluzione delle manifestazioni cliniche, potrebbe essere di aiuto per individuare i pazienti da indirizzare alle future terapie disponibili.

Parole chiave: *Lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT), colesterolo non esterificato, lipoproteine ad alta densità.*

Bibliografia

1. Santamarina-Fojo S, Hoeg JM, Assmann G, Brewer HBJ. Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: McGraw-Hill. 2001; 2817-2833.
2. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *BiochimBiophysActa*. 2000; 1529: 245-256.
3. Holleboom AG, Kuivenhoven JA, van Olden CC, et al. Proteinuria in early childhood due to familial LCAT deficiency caused by loss of a disulfide bond in lecithin:cholesterol acyl transferase. *Atherosclerosis*. 2011; 216: 161-165.
4. Calabresi L, Pisciotta L, Costantin A, et al. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 1972-1978.
5. Calabresi L, Simonelli S, Gomaschi M, Franceschini G. Genetic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2012; 222: 299-306.
6. Nakamura Y, Kotite L, Gan Y, et al. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport: reaction of pre-beta-migrating high-density lipoprotein with plasma lecithin/cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. 2004; 43: 14811-14820.
7. Zhao Y, Thorngate FE, Weisgraber KH, et al. Apolipoprotein E Is the Major Physiological Activator of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT) on Apolipoprotein B Lipoproteins. *Biochemistry*. 2005; 44: 1013-1025.
8. Manthei KA, Patra D, Wilson CJ, et al. Structural analysis of lecithin:cholesterol acyltransferase bound to high density lipoprotein particles. *Commun Biol*. 2020; 3: 28.
9. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 2006; 113: 2548-2555.
10. Calabresi L, Favari E, Moleri E, et al. Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis*. 2009; 204: 141-146.
11. Tanigawa H, Billheimer JT, Tohyama JI, et al. Lecithin:cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2009; 120: 160-169.
12. Norum KR, Gjone E. Familial serum-cholesterol esterification failure. A new inborn error of metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1967; 144: 698-700.
13. Torsvik H, Gjone E, Norum KR. Familial plasma cholesterol ester deficiency. Clinical studies of a family. *Acta Med Scand*. 1968; 183: 387-391.
14. Calabresi L, Baldassarre D, Castelnuovo S, et al. Functional lecithin:cholesterol acyltransferase is not required for efficient atheroprotection in humans. *Circulation*. 2009; 120: 628-635.
15. Manthei KA, Ahn J, Glukhova A, et al. A retractable lid in lecithin:cholesterol acyltransferase provides a structural mechanism for activation by apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*. 2017; 292: 20313-20327.
16. Peelman F, Verschelde JL, Vanloo B, et al. Effects of natural mutations in lecithin:cholesterol acyltransferase on the enzyme structure and activity. *J Lipid Res*. 1999; 40: 59-69.
17. Sensi C, Simonelli S, Zanotti I, et al. Distant Homology Modeling of LCAT and Its Validation through In Silico Targeting and In Vitro and In Vivo Assays. *PLoS One*. 2014; 9: e95044.
18. Pavanello C, Calabresi L. Genetic, biochemical, and clinical features of LCAT deficiency: update for 2020. *Curr Opin Lipidol* 2020; 31: 232-237
19. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, et al. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res*. 2007; 48: 592-599.
20. Pisciotta L, Calabresi L, Lupattelli G, et al. Combined monogenic hypercholesterolemia and hypoalphalipoproteinemia caused by mutations in LDL-R and LCAT genes. *Atherosclerosis*. 2005; 182: 153-159.
21. Nanjee MN, Stocks J, Cooke CJ, et al. A novel LCAT mutation (Phe(382)->Val) in a kindred with familial LCAT deficiency and defective apolipoprotein B-100. *Atherosclerosis*. 2003; 170: 105-113.
22. Gomaschi M, Ossoli A, Castelnuovo S, et al. Depletion in LpA-I:A-II particles enhances HDL-mediated endothelial protection in familial LCAT deficiency. *J Lipid Res*. 2017; 58: 994-1001.
23. Fountoulakis N, Lioudaki E, Lygerou D, et al. The P274S Mutation of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT) and Its Clinical Manifestations in a Large Kindred. *Am J Kidney Dis*. 2019;74: 510-522.
24. Flores R, Jin X, Chang J, et al. LCAT, ApoD, and ApoA1 Expression and Review of Cholesterol Deposition in the Cornea. *Biomolecules*. 2019; 9: 785.
25. Blanco-Vaca F, Qu SJ, Fiol C, et al. Molecular basis of fish-eye disease in a patient from Spain. Characterization of a novel mutation in the LCAT gene and lipid analysis of the cornea. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 1382-1391.
26. Zemsky CJ, Sherman SW, Schubert HD, Suh LH. Case Report: Management of Corneal Clouding

- from Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Deficiency. *Optom Vis Sci.* 2019; 96: 137-141.
27. Suda T, Akamatsu A, Nakaya Y, et al. Alterations in erythrocyte membrane lipid and its fragility in a patient with familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. *J Med Invest.* 2002; 49: 147-155.
 28. Simonelli S, Ossoli A, Banfi C, et al. A proteomic approach to identify novel disease biomarkers in LCAT deficiency. *J Proteomics.* 2019; 198: 113-118.
 29. Strom EH, Sund S, Reier-Nilsen M, et al. Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) Deficiency: Renal Lesions with Early Graft Recurrence. *Ultrastruct Pathol.* 2011; 35: 139-145.
 30. Lamiquiz-Moneo I, Civeira F, Gomez-Coronado D, et al. Lipid Profile Rather Than the LCAT Mutation Explains Renal Disease in Familial LCAT Deficiency. *J Clin Med.* 2019; 8: 1860.
 31. Pavanello C, Ossoli A, Arca M, et al. Progression of chronic kidney disease in familial LCAT deficiency: a follow-up of the Italian cohort. *J Lipid Res.* 2020; 61: 1784-1788.
 32. Ossoli A, Neufeld EB, Thacker SG, et al. Lipoprotein X Causes Renal Disease in LCAT Deficiency. *PLoS One.* 11: e0150083.
 33. Lambert G, Sakai N, Vaisman BL, et al. Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin:cholesterol acyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem.* 2001; 276: 15090-15098.
 34. Vaisman BL, Neufeld EB, Freeman LA, et al. LCAT Enzyme Replacement Therapy Reduces LpX and Improves Kidney Function in a Mouse Model of Familial LCAT Deficiency. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019; 368: 423-434.
 35. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, et al. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res.* 1997; 38: 191-205.
 36. Ayyobi AF, McGladdery SH, Chan S, et al. Lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency and risk of vascular disease: 25 year follow-up. *Atherosclerosis.* 2004; 177: 361-366.
 37. Hovingh GK, Hutten BA, Holleboom AG, et al. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis. *Circulation.* 2005; 112: 879-884.
 38. Oldoni F, Baldassarre D, Castelnovo S, et al. Complete and Partial LCAT Deficiency are Differentially Associated with Atherosclerosis. *Circulation.* 2018; 138: 1000-1007.

LIPOPROTEINE AD ALTA DENSITÀ (HDL)

LE LIPOPROTEINE AD ALTA DENSITÀ: UNO STRUMENTO POLIVALENTE CONTRO IL CANCRO?

High density lipoproteins as a multitasking tool to fight cancer

ALICE OSSOLI, MONICA GOMARASCHI*Centro Enrica Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano***SUMMARY**

High density lipoproteins are well known for their cardioprotective role. Their ability to inhibit the development and progression of atherosclerosis is likely due to their role in the reverse transport of cholesterol from peripheral tissues to the liver for excretion and to their antioxidant and anti-inflammatory properties. Since lipids, oxidative stress and inflammation can promote cancer cell proliferation, HDL could affect tumor development and progression through the same mechanisms as well. Several alterations of cellular metabolism, including those affecting cholesterol, are shared by many types of cancers. Besides fatty acids, cholesterol and its metabolites were shown to play a key role in cancer cell proliferation. In this context, when cancer cells are exposed to HDL, cholesterol content is reduced, with an overall rewiring of cell metabolism. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies showed that HDL could limit the formation and availability of pro-oxidant and pro-inflammatory molecules in the tumor microenvironment. Here, HDL can also promote immune surveillance and reduce angiogenesis. Finally, HDL-like particles can be used as delivery agents for the selective uptake of antineoplastic agents by cancer cells, thanks to their binding to the scavenger receptor BI. In this context, a key advantage is that the delivery agent has an intrinsic antitumor activity *per se*, thus likely rendering cancer cells more sensitive to antineoplastic agents.

Key words: *High density lipoproteins; cancer; tumor microenvironment; drug delivery.*

Dall'arteriosclerosi al tumore: una condivisione di fattori predisponenti

Lipoproteine ad alta densità e ateroprotezione

Al contrario delle lipoproteine contenenti apolipoproteina B (apoB), le HDL sono ben note per la loro attività protettiva

Indirizzo per la corrispondenza

Monica Gomaraschi, Centro Enrica Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti 9, 20133 Milano
E-mail: monica.gomaraschi@unimi.it

Elenco degli argomenti trattati

- L'arteriosclerosi e il tumore condividono numerosi fattori predisponenti l'insorgenza e la progressione della patologia, tra cui i lipidi, lo stress ossidativo e l'infiammazione. Le HDL modulano l'omeostasi del colesterolo cellulare e hanno azioni antiossidanti e antinfiammatorie; pertanto, attraverso questi meccanismi potrebbero opporsi non solo al processo arteriosclerotico ma anche tumorale.
- Le evidenze epidemiologiche relative all'associazione tra livelli plasmatici di HDL-C e insorgenza di varie forme di tumore sono ad oggi contraddittorie. Al contrario, la relazione tra HDL-C e prognosi è ben nota: livelli più elevati di HDL-C si associano a riduzione della mortalità e dell'incidenza di recidiva.
- Studi *in vitro* ed in modelli animali hanno evidenziato che le HDL riducono la proliferazione delle cellule tumorali modulando il contenuto di colesterolo cellulare e/o dei suoi metaboliti, riducendo la presenza di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie, e limitando la tolleranza immunitaria.
- Le HDL ricostituite possono essere utilizzate come veicolo per i farmaci antineoplastici, aumentandone la captazione selettiva nella massa tumorale. Tale approccio aumenta la tollerabilità dei farmaci ed il loro effetto citotossico.

contro l'insorgenza e lo sviluppo delle placche aterosclerotiche (1). La maggioranza delle HDL circolanti ha forma sferica, mentre una percentuale tra il 10 ed il 15% ha forma discoidale. Nelle particelle sferiche, il core di lipidi apolari (esteri del colesterolo e trigliceridi) è circondato da uno strato superficiale di lipidi anfipatici, quali fosfolipidi, sfingolipidi e colesterolo non esterificato, e di apolipoproteine (2). Nelle particelle discoidali, il core è assente. La principale componente proteica delle HDL è l'apoA-I, che presenta la classica struttura ad α -eliche anfipatiche (2). Oltre alla sua azione strutturale, l'apoA-I esercita un ruolo chiave nel metabolismo e nella funzionalità delle HDL, agendo da cofattore enzimatico e da ligando per recettori e trasportatori. La maggioranza delle HDL si forma per sinte-

si e secrezione dell'apoA-I da parte di epatociti ed enterociti; l'apoA-I viene immediatamente lipidata per interazione con il trasportatore di colesterolo e fosfolipidi ATP-binding cassette A1 (ABCA1) con formazione delle HDL discoidali, convertire poi in particelle sferiche per azione della lecitina:colesterolo aciltransferasi (3).

Storicamente, l'azione ateroprotettiva delle HDL si ascrive al loro ruolo centrale nel processo noto come "trasporto inverso del colesterolo". In tale processo, il colesterolo viene trasportato dai tessuti periferici, inclusa la parete arteriosa, al fegato per l'eliminazione e le HDL rappresentano il principale veicolo di questo trasporto (3). Il trasporto inverso del colesterolo è considerato un processo chiave dell'omeostasi cellulare di colesterolo, poiché, contrariamente agli epatociti, la maggioranza delle cellule non è in grado di catabolizzarlo. Il primo *step* del trasporto inverso è l'efflusso di colesterolo cellulare verso accettori extracellulari. L'apoA-I non lipidata e le HDL discoidali sono i principali accettori nell'efflusso mediato dai trasportatori della famiglia *ATP-binding cassette* ABCA1 e G1, processo attivo e saturabile. Le HDL sferiche sono invece accettori di colesterolo nel processo mediato dal recettore *scavenger* di tipo BI (SR-BI) in seguito al legame con l'apoA-I (3). In questo caso, SR-BI favorisce la diffusione di colesterolo secondo gradiente di concentrazione, potendo potenzialmente promuoverne l'influsso. SR-BI è anche espresso sulla superficie degli epatociti, dove media la captazione selettiva di colesterolo dalle HDL senza endocitosi della lipoproteina (4). Questo processo di captazione si differenzia da quello delle lipoproteine contenenti apoB, in cui la lipoproteina viene internalizzata e degradata nel compartimento lisosomiale.

Le HDL esercitano numerose altre azioni che possono contribuire alla loro attività

anti-aterogena. Hanno azione antiossidante, poiché possono captare i lipidi ossidati e spegnere la cascata ossidativa grazie alla loro componente proteica. Inoltre, le HDL hanno azione antinfiammatoria verso numerosi tipi cellulari coinvolti nel processo arteriosclerotico, quali cellule endoteliali e immunitarie, azione antitrombotica e di regolazione della sintesi di numerose molecole vasoattive (5). Molte di queste proprietà possono essere rilevanti non solo per la patogenesi dell'arteriosclerosi, ma anche per rallentare la progressione di alcuni tipi di tumori (6). Le HDL possono infiltrarsi nella massa tumorale grazie alla loro dimensione ridotta ed interagire direttamente con le cellule tumorali, che generalmente esprimono SR-BI in elevate quantità (7).

Alterazioni metaboliche delle cellule tumorali

Dal punto di vista metabolico, l'elevata velocità di proliferazione delle cellule tumorali deve essere supportata da una aumentata disponibilità di molecole quali acidi nucleici, proteine e lipidi. Pertanto, il metabolismo cellulare subisce modifiche atte ad aumentare la capacità di sintetizzare ed accumulare i precursori di tali molecole. Generalmente, queste alterazioni metaboliche sono comuni a tumori di diverso tipo ed eziologia e sono indotte da mutazioni genetiche o modificazioni epigenetiche. Normalmente, le cellule utilizzano gli acidi grassi e la fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale per la produzione di ATP; al contrario, le cellule tumorali utilizzano la glicolisi anaerobica come fonte di energia, soprattutto a livello del core ipossico della massa tumorale. Tuttavia, la glicolisi può avvenire anche in condizioni aerobiche, il cosiddetto "effetto Warburg", come osservato nel 70-80% dei tumori. Questo effetto è anch'esso dovuto a instabilità e/o aberrazioni genetiche, con conseguenti alterazio-

ni coordinate di numerose vie di segnale. Inoltre, lo spostamento del bilancio energetico verso la glicolisi può essere il risultato di una disfunzione mitocondriale, che riduce l'efficacia del processo di fosforilazione ossidativa con parallelo aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tale disfunzione è spesso guidata da mutazioni a livello dei geni codificanti per componenti del ciclo degli acidi tricarbossilici e della catena di trasporto degli elettroni (9).

Anche il metabolismo lipidico subisce importanti alterazioni nelle cellule tumorali. La principale e meglio descritta è l'aumento della sintesi *de novo* degli acidi grassi (FA), necessari per la formazione delle membrane di cellule e organelli e come fonte di molecole segnale. Infatti, numerosi enzimi di questa via biosintetica sono maggiormente espressi in molti tipi di tumore e rappresentano possibili nuovi bersagli terapeutici (10). Le cellule tumorali possono anche captare gli acidi grassi dall'ambiente extracellulare attraverso diversi trasportatori di membrana. L'espressione degli enzimi coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi e dei loro trasportatori è principalmente regolata dal fattore di trascrizione *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1) (10). Anche il colesterolo è fondamentale per la proliferazione delle cellule tumorali, sia come componente strutturale delle membrane, sia per il suo ruolo in diverse funzioni cellulari (11). Ad esempio, la presenza del colesterolo nelle *lipid rafts* regola l'attivazione dei recettori transmembrana ivi presenti, inclusi quelli per i fattori di crescita, e le vie di segnale intracellulari a valle. Inoltre, il colesterolo può essere convertito in molecole biologicamente attive quali ossisteroli, isoprenoidi e ormoni. Il colesterolo può essere direttamente sintetizzato dalla cellula tumorale o può essere captato dalle lipoproteine presenti nel microam-

biente tumorale (TME). Anche se in molti tipi di tumori è stato descritto un aumento della sua sintesi, le fonti endogene di colesterolo nel TME sono preferibili, poiché la via biosintetica del mevalonato è un processo più lungo e dispendioso dal punto di vista energetico. L'espressione di enzimi, trasportatori e recettori coinvolti nella sintesi e nella captazione di colesterolo sono regolati principalmente da SREBP-2, che è attivato da vie di segnale oncogeniche, quali PI3K/Akt/mTORC1 o MYC, e dall'ipossia tipica del TME (12). Lungo la via del mevalonato, anche la produzione di isoprenoidi (farnesil-pirofosfato e geranylgeranyl-pirofosfato) è aumentata nelle cellule tumorali. Al contrario, l'espressione dei geni regolati dai *liver X receptor* (LXR), inclusi i trasportatori della famiglia ABC responsabili dell'efflusso di colesterolo, è ridotta, con l'effetto netto di un accumulo intracellulare di colesterolo (12). Le cellule possono convertire il colesterolo in ossisteroli per ossidazione spontanee o enzimatica. La conversione enzimatica è mediata dai citocromi della famiglia P450; in modo interessante, le cellule tumorali possono presentare una alterazione dell'espressione di alcuni citocromi rispetto alle cellule non trasformate da cui si sono originate. Di conseguenza, alcuni ossisteroli possono essere prodotti in quantità maggiori nelle cellule tumorali, mentre altri sono generati in quantità minori (13).

Il ruolo del microambiente tumorale

La progressione del tumore è profondamente influenzata dalle interazioni tra le cellule cancerogene e microambiente circostante. Il TME si compone di una serie di cellule residenti ed infiltranti il tessuto, proteine della matrice extracellulare e fattori solubili e può influenzare lo sviluppo, la progressione, il potenziale invasivo e metastatico del tumore, nonché la sua risposta

ai farmaci antineoplastici (14). Essendo ipossico e acido, il TME stimola l'angiogenesi al fine di aumentare l'afflusso di ossigeno e nutrienti e di rimuovere i cataboliti. I principali componenti cellulari del TME sono cellule del sistema immunitario, cellule endoteliali, fibroblasti e adipociti, mentre i fattori solubili comprendono citochine, fattori di crescita, lipidi e ormoni. In particolare, il TME è ricco di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie, che giungono dalla circolazione sistemica o possono essere prodotte localmente.

Per quanto riguarda le cellule del sistema immunitario, nel TME sono presenti sia componenti dell'immunità innata (macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e *natural killer*) che adattativa (linfociti T e B); queste cellule interagiscono con le cellule tumorali direttamente oppure indirettamente tramite il rilascio di citochine e chemochine (15). Il ruolo delle cellule immunitarie è complesso, poiché esse possono sia promuovere che inibire la crescita tumorale. Ad esempio, i macrofagi (*tumor associated macrophages*, TAM) possono rappresentare fino al 50% della massa tumorale. Tuttavia, mentre quelli con fenotipo M1 sono pro-infiammatori e hanno azione tumoricida, quelli con fenotipo M2 sono antinfiammatori e favoriscono la tolleranza immunitaria, nonché la resistenza agli antineoplastici. Poiché l'ipossia e diverse citochine nel TME possono favorire il differenziamento dei TAM verso il fenotipo M2, non sorprende che un maggior contenuto di TAM nella massa tumorale sia associato ad una prognosi peggiore nel tumore al seno, al polmone e allo stomaco (14). Similmente, le cellule dendritiche connettono l'immunità innata con quella adattativa grazie alla loro capacità di processare e presentare l'antigene, stimolando così il reclutamento nel sito tumorale e l'attivazione dei linfociti CD8+ ad azione citotossica. Tutta-

via, le citochine secrete nel TME inducono immunotolleranza delle dendritiche verso le cellule tumorali, bloccando quindi la risposta citotossica a valle. Inoltre, il TME promuove la migrazione di progenitori mieloidi immaturi (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) nella massa tumorale, dove sopprimono la risposta immunitaria e possono differenziare a TAM (15). Le cellule endoteliali in risposta all'ambiente ipossico rilasciano fattori promuoventi la neoangiogenesi, favorendo così la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno della massa tumorale. Inoltre, esse rilasciano fattori solubili che riducono il reclutamento nel TME e la funzionalità dei linfociti T, nonché in presenza di TGF- β possono trasformarsi in fibroblasti (*cancer associated fibroblasts*, CAF) (14). Il ruolo dei CAF è fondamentale nella progressione della patologia, poiché rilasciando quantità elevate di fattori di crescita, citochine e componenti della matrice extracellulare supportano la proliferazione e la metastatizzazione del tumore, la neoangiogenesi e la tolleranza immunitaria (14).

Il TME è ricco di lipidi, quali colesterolo, acidi grassi ed un ampio spettro di loro metaboliti. Essi possono essere veicolati alle cellule tumorali dalle lipoproteine oppure da altre cellule presenti nel TME, come gli adipociti. Anche in questo caso, le varie specie lipidiche possono essere associate a progressione o ad inibizione del tumore. Ad esempio, le cellule immunitarie nel TME possono generare eicosanoidi dall'acido arachidonico per azione di lipossigenasi e ciclossigenasi. Alcuni di questi eicosanoidi, come le resolvine, possono agire da soppressori tumorali, inibendo la proliferazione e il potenziale metastatico delle cellule cancerogene, la neoangiogenesi e riattivando la risposta immunitaria in molte forme tumorali. Al contrario, altri eicosanoidi, quali il trombossano A2 e la prostaglandina E2, hanno azione pro-tumori-

genica, come dimostrato nel carcinoma mammario, prostatico e ovarico (11). Anche gli ossisteroli possono esercitare azioni opposte sulla massa tumorale. Essi generalmente inibiscono la proliferazione cellulare grazie alla loro attività antinfiammatoria e immunostimolante. Tuttavia, alcuni ossisteroli, in particolare il 27-idrossicolesterolo, possono supportare la crescita tumorale, come evidenziato nel tumore al seno (13).

Le lipoproteine rappresentano sicuramente una fonte preferenziale di lipidi nel TME. Molti recettori per le lipoproteine sono sovraespressi nelle cellule tumorali rispetto alle cellule di origine. Generalmente, tale sovraespressione riguarda sia i recettori per le lipoproteine contenenti apoB, come il recettore per le LDL, sia il recettore per le HDL, SR-BI. Similmente al processo arteriosclerotico, il TME favorisce l'ossidazione delle LDL; queste ultime, oltre a fornire lipidi, possono attivare cascate pro-infiammatorie, pro-ossidanti e pro-angiogeniche anche grazie all'interazione con il proprio recettore LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), anch'esso molto espresso in numerosi tipi di tumore (16). Al contrario, le HDL possono promuovere l'efflusso di colesterolo dalle cellule tumorali mediante l'interazione con i trasportatori ABC e SR-BI. Tuttavia, poiché SR-BI favorisce la diffusione per gradiente di concentrazione del colesterolo, il suo legame con le HDL può causare influsso e quindi aumento del colesterolo cellulare, come precedentemente discusso.

HDL-colesterolo e tumore: le evidenze epidemiologiche

Numerosi studi hanno analizzato la relazione tra i livelli plasmatici di HDL-colesterolo (HDL-C) ed il rischio di tumore. Tali studi sono stati condotti in modo retrospet-

tivo, prospettico o mediante randomizzazione mendeliana. Gli studi retrospettivi hanno fornito risultati fortemente discordanti, poiché sono state evidenziate associazioni positive, negative o nulle tra i valori plasmatici di lipidi/lipoproteine e l'incidenza di diverse forme di tumore (11, 17). Numerose considerazioni potrebbero spiegare le incongruenze osservate, a partire dal tipo di tumore e dal momento in cui i valori lipidici sono stati misurati. È infatti ben noto che lo stadio della malattia e le terapie antitumorali possono alterare i valori lipidici, in particolare le concentrazioni di HDL-C e apoA-I. Il potenziale predittivo di bassi valori di apoA-I è talmente elevato da essere inclusi nello screening per il tumore ovarico insieme a biomarcatori tradizionali (18). Nel caso di forme tumorali del fegato e dell'intestino, la riduzione di HDL-C può essere spiegata da una ridotta biosintesi delle HDL, essendo questi due organi responsabili della sintesi dell'apoA-I. Più in generale, il tumore innesca una risposta infiammatoria che può inibire la sintesi ed il metabolismo delle HDL come accade in molti altri stati infiammatori; infatti, le citochine pro-infiammatorie inibiscono la sintesi epatica di numerose proteine coinvolte nel metabolismo lipidico (17).

Per quanto riguarda gli studi prospettici, sono disponibili sia studi singoli che metanalisi. Nello studio *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) è stata dimostrata l'esistenza di un'associazione inversa tra HDL-C e rischio di tumore del colon e dell'endometrio (19, 20). Tale associazione è stata confermata nello studio *Alpha-Tocopherol Beta-carotene lung cancer prevention* (ATBC) e nel *Women's Health Study*, condotti in una popolazione di sesso maschile e femminile, rispettivamente (21, 22). Recentemente sono stati pubblicati i risultati di due studi condotti sulle coorti del *Copenhagen Gene-*

ral Population Study e del *Copenhagen City Heart Study* (23). L'associazione tra bassi livelli di HDL-C e apoA-I ed il rischio di tumore è stata confermata in entrambi i sessi; tale associazione è risultata particolarmente evidente per il mieloma multiplo, le forme mieloproliferative, il linfoma non-Hodgkin, i carcinomi mammari, polmonari e del sistema nervoso.

Gli studi di randomizzazione mendeliana sono stati condotti per indagare il possibile legame causativo tra basse HDL e sviluppo di tumore. Ad oggi, i risultati disponibili sono contrastanti. Nella casistica del *Breast Cancer Association Consortium* (BCAC), livelli geneticamente elevati di HDL-C sono associati ad un aumento del rischio di tumore al seno indipendentemente dall'espressione del recettore per gli estrogeni (24). Similmente, livelli elevati di HDL-C sono associati ad un aumentato rischio di tumore dell'endometrio nel *Endometrial Cancer Association Consortium* e nel *Global Lipids Genetic Consortium* (25). Al contrario, nessuna associazione è stata evidenziata tra livelli geneticamente determinati di HDL-C e rischio di carcinoma prostatico e del colon (26).

La relazione tra HDL-C o apoA-I e prognosi è invece ben definita. Una recente metanalisi, che ha incluso studi retrospettivi e prospettici, ha evidenziato una riduzione del rischio di morte del 37% e di recidiva del 35% nei pazienti con valori di HDL-C più elevati (27). Dati suddivisi per sede del tumore sono disponibili per il polmone, il tratto naso-faringeo, il colon ed il seno. Inoltre, basse concentrazioni di apoA-I prima dell'inizio della terapia antitumorale sono stati associati ad un aumentato rischio di metastatizzazione e prognosi più severa (28, 29). Infine, in pazienti con carcinoma mammario triplo negativo, un rapporto HDL-C/colesterolo totale più elevato si associa ad una significativa riduzione della mortalità (30).

Effetti delle HDL su sviluppo e progressione del tumore: evidenze *in vitro* ed *in vivo*

La manipolazione genetica dell'animale da esperimento per espressione dell'apoA-I umana o delezione dell'apoA-I murina consente di studiare il possibile legame causativo tra HDL e tumore. Nel topo transgenico per l'apoA-I umana (hA-ITg), che presenta valori di HDL-C molto elevati, la crescita della massa tumorale dopo iniezione di cellule di melanoma, di tumore del polmone o ovarico si è ridotta in modo significativo rispetto a quanto osservato nell'animale *wild-type* (31, 32). Al contrario, la delezione del gene dell'apoA-I murina (A-IKO), che comporta una riduzione marcata dei livelli di HDL-C, si associa ad una maggiore crescita tumorale rispetto all'animale *wild-type* (31). Nel topo A-IKO è stato testato anche l'effetto della somministrazione di apoA-I esogena, che ha causato una riduzione del volume della massa tumorale sia quando utilizzata prima dell'infusione di cellule di melanoma metastatico B16F10L, sia quando somministrata dopo l'inoculo (31). Tuttavia, ci sono anche evidenze opposte. Nel topo transgenico PyMT, modello animale di carcinoma mammario, la sovraespressione di apoA-I umana non modifica né il tempo di latenza, né la dimensione del tumore (33). Inoltre, la delezione di apoA-I ha causato una riduzione della massa tumorale in topi a cui sono state iniettate cellule tumorali prostatiche (34). Pertanto, la manipolazione genetica dell'animale per modificare i livelli di HDL ha generato risultati contrapposti in base al tipo e alla sede del tumore. Le cause di tali discrepanze non sono ad oggi note, ma potrebbero in parte risiedere nella differente avidità di colesterolo extracellulare delle varie forme tumorali, la cui fonte principale nel topo è rappresentata dalle HDL; in particolare, i tumori

ormone-dipendenti potrebbero avere una maggiore necessità di colesterolo per la sintesi locale di ormoni.

Studi condotti su modelli cellulari e animali hanno fornito alcune evidenze sui meccanismi alla base dell'effetto antiproliferativo delle HDL (Figura 1). Gli studi *in vivo* presentano l'ovvio vantaggio di evidenziare non solo effetti diretti delle lipoproteine sulle cellule tumorali, ma anche effetti sistemici o locali su altri componenti del TME. Le HDL sono in grado di ridurre la vitalità e la proliferazione di cellule tumorali di varia origine, tra cui ovaio, prostata, seno e melanoma (11, 32). Tale effetto è stato correlato ad una modulazione del metabolismo cellulare, ed in particolare del contenuto di colesterolo e ossisteroli (Figura 1). In modo interessante, la riduzione di colesterolo è stata causata non solo dalla promozione dell'efflusso, ma anche da una inibizione della via del mevalonato, come

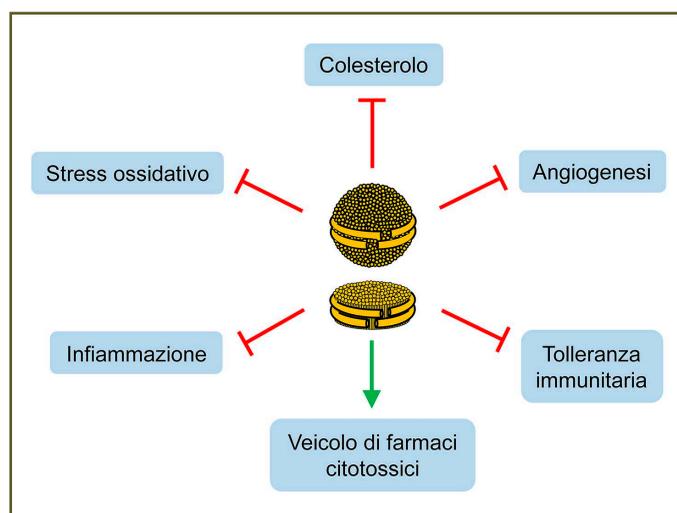


Figura 1 - Ruolo antitumorale delle HDL.

Le HDL possono limitare lo sviluppo e la progressione del tumore agendo direttamente sulle cellule tumorali oppure indirettamente, modificando il microambiente tumorale. Le HDL riducono i livelli di colesterolo e dei suoi metaboliti, di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie, inibiscono l'angiogenesi e la tolleranza immunitaria. Inoltre, le HDL possono essere utilizzate come veicolo di farmaci antineoplastici per aumentarne la captazione nella massa tumorale.

evidenziato nel topo hA-ITg (31), a suggerire un'alterazione globale del metabolismo cellulare. In accordo con tale ipotesi, è stata dimostrata anche una inibizione intratumorale della sintesi *de novo* della serina nel topo hA-ITg rispetto al topo A-IKO (35); poiché la serina è essenziale per la sintesi di glicina, proteine, lipidi e acidi nucleici, la riduzione della sua disponibilità potrebbe giocare un ruolo chiave nel ridurre la proliferazione tumorale. Al contrario, alcuni studi hanno evidenziato un aumento del contenuto di colesterolo in cellule tumorali esposte alle HDL; ad esempio, in cellule di carcinoma mammario e prostatico, le concentrazioni di colesterolo o di ossisteroli sono aumentati in seguito al trattamento con HDL in modo dipendente dall'espressione di SR-BI (11). Anche in cellule di carcinoma renale l'espressione di SR-BI correla con il contenuto di colesterolo e ossisteroli (36). Nel modello animale di tumore al seno PyMT, l'espressione di apoA-I umana si associa ad un aumento delle concentrazioni di 27-idrossicolesterolo sia per influsso dalle HDL, sia per inibizione del Cyp7b1, l'enzima responsabile del suo catabolismo (33). Le discrepanze osservate potrebbero trovare parziale spiegazione nei differenti disegni sperimentali utilizzati nei vari studi. Ad esempio, numerosi studi *in vitro* sono stati condotti in deprivazione di siero o con siero delipidizzato; in queste condizioni, le HDL rappresentano l'unica fonte di lipidi nel mezzo di coltura. In linea con questa ipotesi, quando LDL o HDL sono state iniettate in topi con tumori generati per inoculo di cellule CT26 del colon, le LDL sono state captate dalle cellule tumorali, mentre le HDL preferenzialmente dai TAM (37). In accordo, il silenziamento genico del recettore per le LDL si è dimostrato efficace nel ridurre la vitalità cellulare in modelli animali di tipi di tumore, quali l'adenocarcinoma pancreatico ed il tumore al

seno HER2-positivo o triplo negativo (11). Infine, è ben noto come le HDL possano diventare disfunzionali in numerose condizioni patologiche, come gli stati infiammatori, le malattie metaboliche ed anche il tumore (38). Ad esempio, la proliferazione della linea cellulare di tumore al seno MCF-7 è aumentata in seguito al trattamento con HDL isolate da pazienti diabetici, ma non con le lipoproteine isolate da controlli sani (39).

Anche gli effetti antinfiammatori ed antiossidanti potrebbero contribuire al ruolo antiproliferativo delle HDL (*Figura 1*). Ad esempio, in cellule di carcinoma ovarico il contenuto di acido lisofosfatidico, molecola ad azione pro-infiammatoria, si è ridotto in seguito al trattamento con apoA-I, con conseguente riduzione della proliferazione, migrazione ed invasione cellulare (32). In linee cellulari di carcinoma prostatico, le HDL riducono lo stress ossidativo e la proliferazione cellulare indotta da ROS grazie all'azione sia della componente proteica che lipidica (40). Infine, studi in modelli animali hanno consentito di evidenziare importanti effetti delle HDL sulle cellule immunitarie presenti nel TME (*Figura 1*). Ad esempio, le HDL inibiscono il reclutamento e l'attività delle MDSC nel TME grazie al legame con SR-BI, con conseguente riduzione della tolleranza immunitaria; infatti, il numero di TAM con fenotipo classico M1 e di linfociti CD8+ citotossici presenti nel TME è risultato aumentato (41).

Le HDL come veicolo per farmaci antineoplastici

Le HDL possono essere ricostituite *in vitro* a partire da apoA-I e fosfolipidi (rHDL) (2). Queste particelle di forma discoidale mantengono le proprietà delle HDL circolanti e sono in fase di sviluppo clinico come potenziali nuovi agenti anti-aterosclerotici.

Un vantaggio delle rHDL è rappresentato dal fatto che le loro caratteristiche possono essere ottimizzate variandone la composizione, rendendole quindi potenzialmente utili per una serie di applicazioni differenti. Le modifiche della composizione possono riguardare sia la componente lipidica che la componente proteica, dove l'apoA-I può essere sostituita da piccoli peptidi apoA-I mimetici (42). Tra le applicazioni oggetto di maggiore studio negli ultimi anni, vi è l'uso delle rHDL come veicolo di farmaci idrofobici, che possono essere inclusi nel core della lipoproteina, o anfipatici, che si inseriscono nello strato fosfolipidico (*Figura 1*). I vantaggi delle rHDL includono la loro biocompatibilità, l'elevata capacità, la lunga emivita, la possibilità di controllare il rilascio del farmaco e la loro selettività per la massa tumorale mediata dal legame con SR-BI, che le rendono utili non solo per veicolare farmaci ma anche come marcatori nella diagnostica per immagini (42). In realtà, le LDL sono state le prime candidate come veicolo di farmaci; tuttavia, la loro captazione avviene per endocitosi mediata da recettore con conseguente degradazione lisosomiale anche del farmaco veicolato (42). Al contrario, l'interazione delle HDL con SR-BI comporta la captazione del loro contenuto direttamente nel compartimento citosolico, evitando la degradazione nel lisosoma. Inoltre, le dimensioni ridotte delle HDL rispetto alle LDL le rende capaci di diffondere attraverso i capillari e raggiungere efficacemente il TME. HDL ricostituite sono in fase di sviluppo per diversi tipi di tumori e trasportano non solo farmaci antineoplastici, ma anche siRNA e miRNA (42). Paclitaxel, docetaxel e doxorubicina sono esempi di classici farmaci antineoplastici la cui inclusione in rHDL è in fase di studio. Ad esempio, Wang *et al.* hanno evidenziato come il paclitaxel incluso in rHDL (rHDL/PTX) sia meglio tollerato rispetto al farma-

co libero o complessato con albumina, a causa di una maggiore captazione da parte delle cellule tumorali (43); infatti, l'effetto citotossico massimo su varie linee cellulari tumorali, quali MCF7, DU145, OV1063 e OVCAR-3, si ottiene con concentrazioni mi-

Glossario

Cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC): popolazione eterogenea di cellule immunitarie di origine mieloide caratterizzate da un fenotipo immaturo e dalla capacità di sopprimere l'attività di linfociti T.

Citocromi P450: famiglia di enzimi ossidanti coinvolti nella sintesi e nel metabolismo di molecole di varia natura. Hanno un ruolo fondamentale nel metabolismo degli xenobiotici. Sono espressi in tutti i tessuti, ma in particolare nel fegato.

Effetto Warburg: fenomeno caratterizzato da un aumento della captazione cellulare di glucosio e della produzione di energia per glicolisi anche in presenza di ossigeno.

Endocitosi delle lipoproteine: processo di captazione cellulare delle lipoproteine circolanti mediato principalmente dai recettori della famiglia *LDL-receptor*. Il complesso lipoproteina-recettore viene internalizzato e veicolato al lisosoma per la degradazione nei componenti basilari quali aminoacidi, colesterolo non esterificato e acidi grassi.

Fosforilazione ossidativa: processo metabolico che porta alla sintesi di ATP grazie al gradiente elettrochimico generato nei mitocondri.

Glicolisi: sequenza di reazioni enzimatiche che porta alla conversione del glucosio in piruvato.

Liver X receptors (LXR): famiglia di recettori nucleari attivati dagli ossisteroli. LXR α è espresso soprattutto nel fegato, mentre LXR β è ubiquitario. I recettori LXR esercitano un ruolo chiave nel metabolismo cellulare, regolando l'espressione di geni coinvolti nell'omeostasi del colesterolo, degli acidi grassi e del glucosio.

Sterol regulatory element-binding proteins (SREBP): famiglia di fattori di trascrizione composta da due geni (SREBF1 e SREBF2) codificanti tre diverse proteine: SREBP1a, SREBP1c e SREBP2. Regolano la trascrizione di geni coinvolti nella biosintesi e captazione di lipidi e lipoproteine.

Studi di randomizzazione mendeliana: studi epidemiologici in cui si utilizzano varianti geniche per indagare l'associazione causativa tra un fattore di rischio modificabile ed il rischio o la prognosi di una patologia.

norini di rHDL/PTX rispetto al farmaco libero (44). Recentemente, il paclitaxel è stato co-incapsulato nelle rHDL con il nuovo inibitore della glicoproteina P, HZ208, che ha comportato un ulteriore aumento della tollerabilità e della selettività per le cellule tumorali (45). Anche l'uso della doxorubicina è limitato dalla sua tossicità, in particolare a livello cardiaco, e dall'insorgenza di resistenza. La sua inclusione in rHDL è stata testata nel carcinoma epatocellulare, evidenziando un aumento dell'accumulo intracellulare e dell'effetto citotossico rispetto al farmaco libero. Tra i farmaci innovativi è stato testato il complesso immunostimolante MTP10 (*muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine*) in un modello murino di melanoma; la sua inclusione in rHDL ha comportato una significativa captazione nel midollo osseo, con un accumulo marginale o pressoché nullo nel fegato e in altri organi vitali. Il trattamento ha così inibito la crescita della massa tumorale, aumentando la risposta del sistema immunitario alla terapia con bloccanti di PD-1 (46). Infine, le rHDL potrebbero essere utilizzate nei tumori cerebrali per consentire ai farmaci an-

tineoplastici di passare la barriera emato-encefalica. Ad esempio, il docetaxel e un agonista del recettore Toll-like 9 sono stati inclusi in rHDL ed infusi in modelli animali di glioblastoma multiforme; il trattamento ha causato un aumento della risposta citotossica mediata dai linfociti CD8+, la regressione della massa tumorale e l'aumento della sopravvivenza (47). Ulteriori esempi di farmaci inclusi in rHDL sono la valrubicina, la aclacinomicina ed il glicoside garcina (48).

Conclusioni e prospettive

Lo sviluppo delle HDL come veicolo di farmaci è un campo innovativo che ha un grande potenziale per la terapia antitumorale. Infatti, grazie alla loro lunga emivita, stabilità e sicurezza rappresentano una valida opzione per superare diverse problematiche che ostacolano l'uso di farmaci antineoplastici altamente efficaci. Le HDL presentano un ulteriore vantaggio chiave: il fatto di poter esercitare di per sé un'azione antitumorale. Pertanto, potrebbero non solo veicolare il farmaco in modo selettivo

RIASSUNTO

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono ben note per la loro attività protettiva contro lo sviluppo e la progressione dell'arteriosclerosi. Tale attività è generalmente ascritta al ruolo centrale svolto dalle HDL nel trasporto inverso del colesterolo dai tessuti periferici al fegato per l'eliminazione, alle loro proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie. Attraverso gli stessi meccanismi, le HDL potrebbero anche influenzare la proliferazione delle cellule tumorali e quindi la progressione del tumore stesso. Numerose alterazioni del metabolismo cellulare sono presenti in forme tumorali diverse, incluse le variazioni del metabolismo lipidico. In questo contesto, giocano un ruolo fondamentale non solo gli acidi grassi, ma anche il colesterolo ed i suoi numerosi metaboliti. Studi recenti hanno dimostrato che le HDL possono ridurre il contenuto di colesterolo nelle cellule tumorali, causando una alterazione globale dell'omeostasi del colesterolo stesso. Inoltre, le HDL riducono la presenza di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie nel microambiente tumorale, limitano la tolleranza immunitaria e la neoangiogenesi. Infine, le HDL rappresentano una valida opzione per veicolare con maggiore selettività i farmaci antineoplastici verso la massa tumorale, grazie al loro legame con il recettore *scavenger BI*. Poiché le HDL possono influire di per sé sulla proliferazione delle cellule tumorali, i sistemi di veicolazione del farmaco basati su particelle simili alle HDL potrebbero rendere il tumore più sensibile all'azione del farmaco stesso e limitare o rallentare lo sviluppo di resistenza.

Parole chiave: *Lipoproteine ad alta densità, cancro, microambiente tumorale, veicolazione di farmaci.*

alla massa tumorale, ma renderla anche più sensibile all'azione del farmaco e/o ridurre l'insorgenza di resistenza.

Per quanto riguarda i meccanismi alla base dell'effetto antitumorale delle HDL, la maggioranza degli studi si è focalizzata sulla modulazione dell'omeostasi del colesterolo. Studi ulteriori sono necessari per indagare l'eventuale effetto delle HDL su altre vie metaboliche, come suggerito dall'inibizione della sintesi della serina. Come descritto in precedenza, le alterazioni metaboliche riscontrate nelle cellule tumorali sono numerose e l'impatto delle HDL su tali alterazioni è pressoché ignoto, come ad esempio il metabolismo degli acidi grassi o l'omeostasi mitocondriale. Inoltre, le HDL potrebbero modulare l'attività di altre componenti cellulari del TME oltre alle popolazioni di cellule immunitarie ad oggi studiate.

Bibliografia

- Franceschini G, Maderna P, Sirtori CR. Reverse cholesterol transport: physiology and pharmacology. *Atherosclerosis*. 1991; 88: 99-107.
- Calabresi L, Gomasaschi M, Rossoni G, Franceschini G. Synthetic high density lipoproteins for the treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Ther.* 2006; 111: 836-854.
- Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, et al. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50: S189-S194.
- Xu S, Laccotripe M, Huang X, et al. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *Journal of Lipid Research*. 1997; 38: 1289-1298.
- Calabresi L, Gomasaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 1724-1731.
- Henrich SE, Thaxton CS. An update on synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles for cancer therapy. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 2019; 19: 515-528.
- Menard JA, Cerezo-Magana M, Belting M. Functional role of extracellular vesicles and lipoproteins in the tumour microenvironment. *Philos. Trans.R.Soc.Lond B Biol. Sci.* 2018; 373.
- Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J. Physiol.* 2021; 599: 1745-1757.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2012; 12: 685-698.
- Matsushita Y, Nakagawa H, Koike K. Lipid Metabolism in Oncology: Why It Matters, How to Research, and How to Treat. *Cancers (Basel)*. 2021; 13.
- Gomasaschi M. Role of Lipoproteins in the Microenvironment of Hormone-Dependent Cancers. *Trends Endocrinol. Metab.* 2020; 31: 256-268.
- Snaebjornsson MT, Janaki-Raman S, Schulze A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab.* 2020, 31: 62-76.
- Nelson ER, Chang CY, McDonnell DP. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends Endocrinol.Metab.* 2014; 25: 649-655.
- Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* 2020; 30: R921-R925.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140: 883-899.
- Balzan S, Lubrano V. LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. *Life Sci.* 2018; 198: 79-86.
- Pirro M, Ricciuti B, Rader DJ, et al. High density lipoprotein cholesterol and cancer: Marker or causative? *Prog. Lipid Res.* 2018; 71: 54-69.
- Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100: 12343-12348.
- Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C, et al. Metabolic syndrome, plasma lipid, lipoprotein and glucose levels, and endometrial cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocr. Relat Cancer.* 2007; 14: 755-767.
- van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Calligaro M, et al. Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut.* 2011; 60: 1094-1102.
- Ahn J, Lim U, Weinstein SJ, et al. Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009; 18: 2814-2821.
- Chandler PD, Song Y, Lin J, et al. Lipid biomarkers and long-term risk of cancer in the Women's Health Study. *Am.J.Clin.Nutr.* 2016; 103: 1397-1407.
- Pedersen KM, Çolak Y, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low high-density lipoprotein and in-

- creased risk of several cancers: 2 population-based cohort studies including 116,728 individuals. *J. Hematol. Oncol.* 2020; 13: 129.
24. Johnson KE, Siewert KM, Klarin D, et al. The relationship between circulating lipids and breast cancer risk: A Mendelian randomization study. *Plos. Med.* 2020; 17: e1003302.
 25. Kho PF, Amant F, Annibali D, et al. Mendelian randomization analyses suggest a role for cholesterol in the development of endometrial cancer. *Int. J. Cancer.* 2021; 148: 307-319.
 26. Bull CJ, Bonilla C, Holly JM, et al. Blood lipids and prostate cancer: a Mendelian randomization analysis. *Cancer Med.* 2016; 5: 1125-1136.
 27. Zhou P, Li B, Liu B, et al. Prognostic role of serum total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in cancer survivors: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Chim. Acta.* 2018; 477: 94-104.
 28. Shi H, Huang H, Pu J, et al. Decreased pretherapy serum apolipoprotein A-I is associated with extent of metastasis and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Onco.Targets.Ther.* 2018; 11: 6995-7003.
 29. Jiang R, Yang ZH, Luo DH, et al. Elevated apolipoprotein A-I levels are associated with favorable prognosis in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Med. Oncol.* 2014; 31: 80.
 30. Lofterod T, Mortensen ES, Nalwoga H et al. Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. *BMC. Cancer.* 2018; 18: 654.
 31. Zamanian-Daryoush M, Lindner D, Tallant TC, et al. The Cardioprotective Protein Apolipoprotein A1 Promotes Potent Anti-tumorigenic Effects. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 21237-21252.
 32. Su F, Kozak KR, Imaizumi S, et al. Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107: 19997-20002.
 33. Cedo L, García-León A, Baila-Rueda L, et al. ApoA-I mimetic administration, but not increased apoA-I-containing HDL, inhibits tumour growth in a mouse model of inherited breast cancer. *Sci. Rep.* 2016; 6: 36387.
 34. Traugher CA, Opoku E, Brubaker G, et al. Uptake of high-density lipoprotein by scavenger receptor class B type 1 is associated with prostate cancer proliferation and tumor progression in mice. *J. Biol. Chem.* 2020; 295: 8252-8261.
 35. Zamanian-Daryoush M, Lindner DJ, Buffa J, et al. Apolipoprotein A-I anti-tumor activity targets cancer cell metabolism. *Oncotarget.* 2020; 11: 1777-1796.
 36. Kim J, Thompson B, Han S, et al. Uptake of HDL-cholesterol contributes to lipid accumulation in clear cell renal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2019; 1864: 158525.
 37. Hadi T, Ramseyer C, Gautier T, et al., Lipoproteins LDL versus HDL as nanocarriers to target either cancer cells or macrophages. *JCI. Insight.* 2020; 5.
 38. Ossoli A, Pavanello C, Giorgio E, et al. Dysfunctional HDL as a Therapeutic Target for Atherosclerosis Prevention. *Curr. Med. Chem.* 2019; 26: 1610-1630.
 39. Pan B, Ren H, Ma Y et al. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus elevates the capability of promoting migration and invasion of breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* 2012; 131: 70-82.
 40. Ruscica M, Botta M, Ferri N, et al. High Density Lipoproteins Inhibit Oxidative Stress-Induced Prostate Cancer Cell Proliferation. *Sci. Rep.* 2018; 8: 2236.
 41. Plebanek MP, Bhaumik D, Bryce PJ, Thaxton CS. Scavenger Receptor Type B1 and Lipoprotein Nanoparticle Inhibit Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Mol. Cancer Ther.* 2018; 17: 686-697.
 42. Raut S, Mooberry L, Sabnis N, et al. Reconstituted HDL: Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer Therapy. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1154.
 43. Wang J, Jia J, Liu J, et al. Tumor targeting effects of a novel modified paclitaxel-loaded discoidal mimic high density lipoproteins. *Drug Deliv.* 2013; 20: 356-363.
 44. McConathy WJ, Nair MP, Paranjape S, et al. Evaluation of synthetic/reconstituted high-density lipoproteins as delivery vehicles for paclitaxel. *Anticancer Drugs.* 2008; 19: 183-188.
 45. Zhang F, Wang X, Xu X, et al. Reconstituted high density lipoprotein mediated targeted co-delivery of HZ08 and paclitaxel enhances the efficacy of paclitaxel in multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Eur. J. Pharm.Sci.* 2016; 92: 11-21.
 46. Priem B, van Leent MMT, Teunissen AJP et al. Trained Immunity-Promoting Nanobiologic Therapy Suppresses Tumor Growth and Potentiates Checkpoint Inhibition. *Cell.* 2020; 183: 786-801.
 47. Kadiyala P, Li D, Nuñez FM, et al. High-Density Lipoprotein-Mimicking Nanodiscs for Chemo-immunotherapy against Glioblastoma Multiforme. *ACS Nano.* 2019; 13: 1365-1384.
 48. Gupta A, Sharma R, Kuche K, Jain S. Exploring the therapeutic potential of the bioinspired reconstituted high density lipoprotein nanostructures. *Int. J. Pharm.* 2021; 596: 120272.

MEDICINA SPERIMENTALE

RIGENERAZIONE CARDIACA: UN TRAGUARDO POSSIBILE

Cardiac regeneration: a possible goal

MAURO GIACCA^{1,2}

¹King's College London, British Heart Foundation Centre of Research Excellence, School of Cardiovascular Medicine & Sciences, London UK;

²Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e della Salute, Università degli Studi di Trieste e International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste

SUMMARY

Cardiac regeneration has long been considered an arduous to achieve goal in experimental cardiology and a holy grail in the clinic. Failure of clinical trials using adult stem cells and lack of evidence of the actual existence of such cells have fueled the conclusion that the heart is an irreversibly post-mitotic organ. A possible manner to overcome this problem is the implantation of exogenously grown cardiomyocytes obtained from the differentiation of embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells in the laboratory. These cells can be implanted either as suspensions or after the formation of contractile myocardial tissue. An alternative approach is to reawaken the endogenous capacity of cardiomyocytes to proliferate, based on the observation that, in contrast to mammals, other species continue to regenerate their hearts throughout life, and that the mammalian heart itself has regenerative capacity until birth. In these cases, regeneration occurs through the proliferation of already formed cardiomyocytes, which partially revert their terminal differentiation and re-enter the cell cycle. The recent success of both approaches in large animals now fuels the excitement that cardiac regeneration is indeed possible. A few technical hurdles, however, need to be solved before clinical application is eventually successful.

Key words: Cardiac regeneration, experimental cardiology, embryonic stem cell, cardiomyocyte, cardiac failure.

Introduzione

Esiste un bisogno impellente di trovare nuove terapie per lo scompenso cardiaco che in molti pazienti è causato da un infarto al miocardio o da altre patologie che causa-

no la perdita di cardiomiociti. Nonostante l'affinamento dell'approccio farmacologico allo scompenso e il successo delle terapie meccaniche di supporto (1), la prognosi di questa condizione rimane infausta, con un tasso di mortalità che continua a essere stimato intorno al 40% dei pazienti soltanto a 4 anni dopo la diagnosi (2), peggiore quindi che nella maggior parte dei tumori. Lo scompenso cardiaco è anche particolarmente costoso, se si considera che assorbe il 2-3% della spesa dei servizi sanitari nazionali nei paesi industrializzati, con una proie-

Indirizzo per la corrispondenza

Mauro Giacca, MD, PhD
King's College London
School of Cardiovascular Medicine & Sciences
The James Black Centre
125 Coldharbour Lane, London SE5 9NU
E-mail: mauro.giacca@kcl.ac.uk

zione a più che raddoppiare nei prossimi 20 anni (3, 4).

Se si considerano i farmaci attualmente disponibili per lo scompenso cardiaco, questi sono progrediti in maniera soltanto marginale da metà degli anni '90, quando sono stati introdotti i sartani, antagonisti dei recettori per l'angiotensina II (5). La terapia è ancora basata sull'utilizzo cardine di ACE inibitori e beta-bloccanti, il cui sviluppo data alla metà degli anni '70. Mentre viene ora risposta molta speranza nell'effetto cardiovascolare inatteso, e alquanto sorprendente, degli inibitori di SGLT2 (glifozine) (6), non esiste ancora alcuna spiegazione molecolare in grado di giustificare questo effetto. Per quanto riguarda la relativamente recente combinazione tra inibitori del recettore dell'angiotensina e della neprilisina (ARNI) (7), questa si basa su due farmaci anch'essi individualmente sviluppati negli anni '90. Per lo scompenso cardiaco, non soltanto un numero considerevole di piccole molecole chimiche è fallito in trial clinici di fase III (8), ma non esiste a tutt'oggi nessuna terapia biologica, comprendendo in questa categoria anticorpi monoclonali, proteine ricombinanti, terapia genica e terapia cellulare (9). Più in generale, nell'intero campo delle malattie cardiache, non si è di fatto assistito alla rivoluzione che le terapie biologiche hanno consentito in altri settori della medicina, in particolare nel campo delle malattie oncologiche e reumatologiche.

Il problema della perdita dei cardiomiociti

Sta diventando progressivamente sempre più chiaro che uno dei problemi principali che sottendono allo sviluppo dello scompenso cardiaco è legato al progressivo invecchiamento della popolazione e alla mancanza di capacità rigenerativa del cuo-

re. L'infarto acuto del miocardio può portare a morte fino al 25% dei cardiomiociti del ventricolo sinistro, corrispondente a circa 1 miliardo di cellule (10). La riperfusione mediante cateterismo coronario percutaneo ripristina il flusso ma può essa stessa causare morte dei cardiomiociti tramite l'induzione di stress ossidativo improvviso (11). Oltre a queste condizioni di morte acuta dei cardiomiociti, virtualmente tutte le altre malattie cardiache portano anche a morte le cellule cardiache in maniera progressiva. Questo è il caso delle condizioni da sovraccarico del ventricolo sinistro, come la cardiomiopatia ipertensiva (12) o la stenosi aortica (Hein et al., 2003), o la morte avviene in corso di miocardite (13), sindrome di Takotsubo (14) e cardiomiopatia peri-partum (15). La morte dei cardiomiociti è una costante che accompagna virtualmente anche tutte le forme di cardiomiopatie su base ereditaria, inclusa la distrofia muscolare di Duchenne (16), la cardiomiopatia di Danon (17), o la cardiomiopatia dovuta a difetti della desmina (18). Esistono ampie evidenze di perdita di cardiomiociti sia nei pazienti con cardiomiopatia dilatativa che in quelli con cardiomiopatia ipertrofica o con cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVD/C) (19). Infine, muore un considerevole numero di cardiomiociti durante gli interventi di cardiocirurgia, in particolare dopo la riperfusione, e nei pazienti trattati con terapie antineoplastiche, in particolare utilizzando antracicline (20). Più in generale, la perdita di cardiomiociti è un inevitabile correlato dell'invecchiamento a livello cardiaco (21).

La perdita di cardiomiociti, acuta o cronica, non è accompagnata nei mammiferi, e quindi nell'uomo, da una significativa generazione di nuove cellule. Questa conclusione deriva da almeno tre livelli di evidenza scientifica. Primo, la datazione con carbonio 14 del DNA umano indica che il tasso di rin-

novamento dei cardiomiociti in individui di oltre 70 anni è di meno del 50%, il che di fatto indica che la maggior parte di queste cellule in un individuo adulto è la stessa generata al momento della nascita (22). Secondo, misurazioni ottenute tramite *imaging* con spettrometria di massa (una tecnologia, peraltro, non di comune utilizzo) hanno indicato che il tasso di riproduzione dei cardiomiociti è di circa 1% per anno, con aumento a circa il 3% dopo un infarto del miocardio; questi valori sono in linea con quelli ottenuti con la datazione usando l'isotopo del carbonio. Terzo, la medesima informazione è stata anche ottenuta in diversi studi che hanno analizzato il tasso di sintesi del DNA, quale indicatore della duplicazione delle cellule, direttamente nel cuore del topo (23).

La mancanza di rinnovamento del cuore riflette l'incapacità di replicarsi dei cardiomiociti. Queste cellule si duplicano attivamente durante la vita embrionale, fetale e quella immediatamente seguente alla nascita, ma cessano di farlo repentinamente nei primi giorni o settimane dopo la nascita (24). Di conseguenza, il cuore è capace di rigenerarsi se danneggiato prima e immediatamente dopo la nascita, ma cessa di farlo successivamente. Ad una settimana dopo la nascita nel topo, un danno al miocardio è invariabilmente riparato con la formazione di una cicatrice. Osservazioni simili sono anche riportate nei maiali (25). Un caso aneddotico in un neonato che era andato incontro a un infarto cardiaco per una condizione familiare che predisponeva alla trombosi indica che una simile caratteristica rigenerativa è propria anche dell'uomo nell'immediato periodo postnatale (26).

L'incapacità del cuore dei mammiferi di rigenerarsi nella vita adulta è in palese contrasto con quanto accade in alcuni pesci e negli anfibi, nei quali la capacità rigenerativa persiste durante tutta la vita (27, 28). A questo proposito, è interessante osservare

come la rigenerazione in questi animali è sostenuta dalla de-differenziazione limitata e parziale dei cardiomiociti preesistenti e non dalla presenza o dal reclutamento di cellule staminali (29, 30). Nel topo adulto, esiste ancora un limitato stimolo rigenerativo nella regione che circonda un infarto (23, 31), ma questo è abortivo e il numero di nuovi cardiomiociti che si vengono a formare è largamente al di sotto di quanto sarebbe necessario per ottenere la formazione di una quantità sufficiente di tessuto miocardico in grado di avere un impatto dal punto di vista clinico.

Negli ultimi 10 anni la ricerca dei motivi per cui i cardiomiociti sono in grado di replicarsi prima e immediatamente dopo la nascita mentre perdono questa capacità successivamente è stata intensa. È opinione prevalente in questo momento che la perdita di capacità proliferativa è legata a una serie di eventi molecolari e biochimici che avvengono in maniera subitanea al momento della nascita stessa. L'aumento nel post-carico pressorio a livello delle camere cardiache (32), la mancanza di fattori o cellule prodotte dalla madre (come le cellule T-regolatorie (33)), l'aumento improvviso della tensione di ossigeno (il cuore del feto nel ventre della madre è un organo venoso) (34), il cambiamento repentino nella situazione ormonale (35) o l'improvviso cambiamento dell'assetto metabolico dal consumo di zuccheri (glicolisi) a quello di acidi grassi (beta ossidazione dei lipidi) (36) sono tutti eventi potenzialmente correlati con la perdita di capacità proliferativa dei cardiomiociti. Con ogni probabilità, i motivi sono molteplici e combinatori di questi fattori. Di fatto, dopo la nascita, la stimolazione dei cardiomiociti risulta in un aumento delle loro dimensioni e nell'assemblaggio della struttura sarcomerica (ipertrofia) anziché nella duplicazione cellulare.

Fattori e vie metaboliche che regolano la proliferazione dei cardiomiociti

Non diversamente da tutti gli altri tipi di cellule, la regolazione della proliferazione dei cardiomiociti nella vita fetale e neonatale dipende dall'azione combinata di molteplici fattori che, dall'esterno della cellula, segnalano attraverso la membrana plasmatica e inducono delle vie di trasduzione del segnale che alla fine arrivano al nucleo e stimolano l'entrata delle cellule nel ciclo cellulare. Le principali di queste vie di segnalazione sono riassunte in questa sezione e riassunte nella *Figura 1*.

Fattori di crescita e loro recettori

Sono diversi i fattori di crescita in grado di stimolare la proliferazione dei cardiomiociti embrionali e neonatali, condizioni nelle quali la duplicazione di queste cellule può avvenire spontaneamente. Queste in-

cludono l'interleuchina 6 (IL-6) (37, 38), platelet-derived growth factor (PDGF) (39), alcuni membri della famiglia del fibroblast growth factor (FGF) (40, 41), follistatin-like 1 (Fstl1) (42) e neuregulin-1 (NRG1) (43-45). La capacità di controllare in maniera paracrina la proliferazione dei cardiomiociti è stata anche riportata per fattori secreti dalle cellule T regolatorie (33) e dai monociti residenti nel parenchima cardiaco (46). Infine, la duplicazione dei cardiomiociti è anche stimolata da cambiamenti nella composizione della matrice extracellulare, in particolare mediati dalla proteina agrin (47). Questo fattore, che è un componente della matrice extracellulare neonatale, stimola la proliferazione dei cardiomiociti attraverso un meccanismo che coinvolge il disassemblaggio del complesso cui è ancorata da un lato la laminina e dall'altro la distrofina (il dystrophin-glycoprotein complex, DGC (47)).

Vie di trasduzione del segnale

È noto che almeno tre principali vie di trasduzione del segnale possono prendere parte nella regolazione della proliferazione dei cardiomiociti durante la vita embrionale, fetale e immediatamente dopo la nascita. Durante lo sviluppo embrionale, la proliferazione dei cardiomiociti è regolata dal *pathway di Wnt* e della β -catenina. In assenza di Wnt, i livelli della β -catenina nel citoplasma sono bassi, dal momento che questa proteina viene distrutta da un complesso proteico che comprende la proteina GSK-3 β (48). Nei cardiomiociti, l'inibizione di GSK-3 β utilizzando tecniche genetiche (49) o grazie all'effetto dell'inibitore biochimico BIO (50) determina la stabilizzazione dei livelli di β -catenina e la conseguente traslocazione di questa proteina nel nucleo, dove agisce da co-attivatore trascrizionale dei membri della famiglia del *T cell factor (TCF)/Lymphoid enhancer factor (LEF)*,

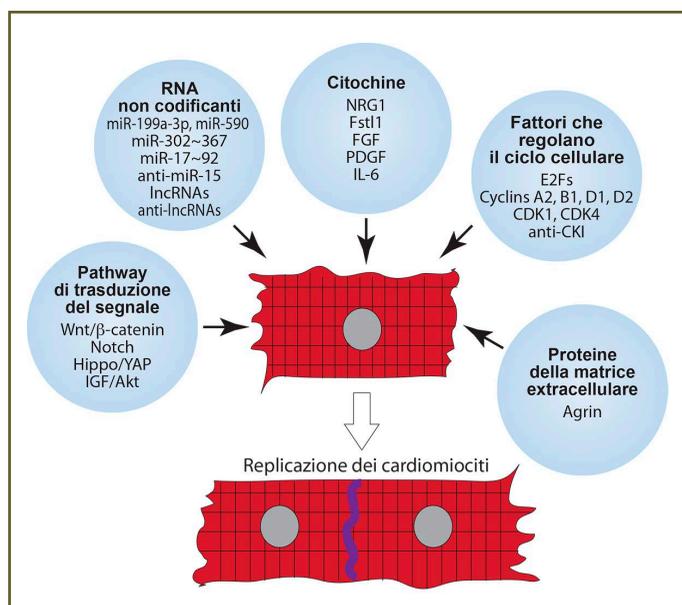


Figura 1 - Proteine intracellulari ed extracellulari, geni e RNA non-codificanti che regolano la proliferazione dei cardiomiociti e la rigenerazione cardiaca.

cui consegue l'attivazione della proliferazione cellulare.

Un secondo meccanismo importante che regola la proliferazione dei cardiomiociti è quello che deriva dall'attivazione della via di trasduzione del segnale regolata da Notch. Questa via richiede il contatto cellula-cellula, dal momento che dipende dal legame del recettore Notch, espresso dai cardiomiociti, con uno dei suoi interattori, in particolare la proteina Jagged1 nel cuore. A questa interazione fa seguito la traslocazione del dominio intracellulare del recettore Notch (Notch intracellular domain, ICD) nel nucleo, dove questa proteina agisce da co-attivatore trascrizionale (51). Questa via di trasduzione del segnale regola la proliferazione dei cardiomiociti durante la vita fetale e neonatale (52-54).

Una terza via biochimica essenziale nella regolazione dei cardiomiociti converge nell'attivazione di un altro co-attivatore trascrizionale, la proteina YAP, e il suo fattore strutturalmente simile TAZ. Queste proteine rappresentano gli effettori del *pathway* di Hippo, noto per controllare la proliferazione di molteplici tipi cellulari nell'organismo, incluse diverse cellule tumorali. Nei cardiomiociti usciti dal ciclo cellulare, la proteina YAP è mantenuta inattiva da parte di una serie di protein-chinasi che prevengono la sua traslocazione all'interno del nucleo e stimolano altresì la sua degradazione. Queste chinasi includono le proteine LATS1/2 e il loro co-fattori MOB1 e MST1/2 (quest'ultimo chiamato Hippo nella *Drosophila*, da cui il nome della via metabolica), insieme all'ulteriore co-fattore SAV1. Altre proteina-chinasi con attività inibitoria comprendono le proteine TAOK1 e STKL38. La regolazione tramite la via di Hippo rappresenta la principale modalità con cui le cellule rispondono agli stimoli meccanici, in grado di trasdurre la sensazione di stiramento e tensione dalla matrice extracellulare fino all'interno del

nucleo della cellula. La delezione per via genetica di MST1, SAV1 e LATS determina un aumento del numero delle cellule (iperplasia cellulare) (55), mentre, al contrario, l'iperpressione di MST1 (56) o LATS2 (57) causa cardiomiopatia dilatativa dopo la nascita. Allo stesso modo, animali transgenici che esprimono una forma sempre attiva di YAP (YAPS112A) sviluppano proliferazione anormale dei cardiomiociti (58, 59).

Regolatori del ciclo cellulare

In maniera non dissimile da tutti gli altri tipi cellulari, la regolazione della proliferazione dei cardiomiociti è anche controllata da una serie di attivatori e inibitori del ciclo cellulare che convergono, nella loro azione, sul controllo delle chinasi regolate da ciclina (Cyclin/CDK). Numerose pubblicazioni negli ultimi anni hanno dimostrato come l'iperpressione dei fattori di trascrizione della famiglia di E2F (60-62), o della ciclina D1 o D2 (63-65) possono determinare iperproliferazione dei cardiomiociti. Risultati analoghi sono determinati dalla soppressione dell'espressione degli inibitori delle chinasi dipendenti da ciclina $p21^{WAF1/CIP1}$, $p27^{KIP1}$ e $p57^{KIP2}$ (66), o da quella di Meis1, un fattore di trascrizione omeotico che attiva l'espressione di $p16^{INK4a}$ e $p21^{WAF1/CIP1}$ (67). Topi transgenici che esprimono alti livelli di ciclina A2 (68, 69), $cdk2$ (70), ciclina D1 (63) e ciclina D2 (71, 72) sviluppano iperproliferazione dei cardiomiociti.

Cellule staminali e geni che stimolano la rigenerazione cardiaca

A partire dagli anni 2000, la comunità cardiologica ha iniziato a sviluppare un grande interesse verso lo sviluppo di strategie atte a stimolare la rigenerazione cardiaca. Sedotte dall'idea, largamente erronea, che tutti gli organi potessero contenere cellule staminali e che queste addirittura circo-

lassero nel sangue, diverse sperimentazioni cliniche si sono basate sulla somministrazione di presunte cellule staminali prelevate dal midollo osseo (cellule totali, purificate per esprimere l'antigene c-kit o marcatori di cellule mesenchimali stromali (73, 74)) subito dopo l'infarto del miocardio o in corso di scompenso cardiaco conclamato. Altre sperimentazioni si sono anche basate sulla presunta e altrettanto erronea idea che il cuore stesso potesse contenere cellule staminali con potenziale rigenerativo (75, 76).

Nonostante un'evidenza del tutto marginale di un possibile beneficio, legato sostanzialmente a un transitorio effetto paracrino (77, 78), l'esito di queste sperimentazioni si è rivelato largamente fallimentare. Esiste oggi un consenso esteso sulla conclusione che non esistono cellule staminali in grado di rigenerare il cuore se non nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, e certamente non nel midollo, nel cuore o in altri organi adulti (79). Una commissione d'inchiesta che ha analizzato alcune delle sperimentazioni originali ha rivelato l'esistenza di incongruenze tali da richiedere la ritrazione di un numero considerevole di studi scientifici originariamente pubblicati anche in riviste di primo piano (<http://circ.ahajournals.org/content/129/16/e466.full.pdf+html>) e messo in dubbio la correttezza di altri ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60608-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60608-5)).

La formazione di nuovi cardiomiociti, peraltro, può essere ottenuta da cellule staminali embrionali (ES) o cellule funzionalmente analoghe a queste ottenute con la tecnologia delle cellule iPS. Questi nuovi cardiomiociti possono essere iniettati nel cuore infartuato per ottenerne una parziale rigenerazione. Questo approccio è stato utilizzato in alcuni interessanti esperimenti preliminari nelle scimmie a Seattle (80, 81) ed è attualmente perseguito a livello di sperimentazione clinica. Le principali problematiche di

questa strategia sono due. Primo, che i cardiomiociti che si ottengono in laboratorio dalle cellule ES o iPS hanno caratteristiche largamente embrionali, e quindi si integrano con difficoltà con il tessuto miocardico preesistente; secondo, che l'inoculo di un numero così grande di cellule, tale da rigenerare un cuore adulto (dell'ordine di un miliardo di cellule), causa importanti fenomeni aritmici nelle prime due settimane dall'inoculo.

Una strategia più complessa, ancora basata sull'utilizzo di cellule ES o iPS, consiste nella formazione di foglietti tri-dimensionali di tessuto cardiaco in grado di integrare cardiomiociti, fibroblasti e, potenzialmente, anche altri tipi cellulari (82, 83). Questo approccio è molto promettente per ottenere strati di miocardio contrattile, che possono essere suturati dall'esterno al tessuto infartuato o cicatriziale, ottenendo anche una minima (almeno per ora) integrazione elettrica e funzionale con il preesistente miocardio. Le prime sperimentazioni cliniche con questo tipo di tessuto ingegnerizzato sono attualmente in corso a Goettingen, in Germania.

L'idea di ovviare alla perdita di tessuto miocardico per un danno acuto (infarto) o cronico mediante la somministrazione di nuovi cardiomiociti è intuitiva, ma non necessariamente riflette quanto accade in natura nelle condizioni in cui avviene la rigenerazione cardiaca. Come discusso in precedenza, sia i mammiferi alla nascita sia pesci e anfibi rigenerano un danno al miocardio mediante la proliferazione delle cellule cardiache esistenti. Per decenni, tuttavia, si è ritenuto impossibile che questo possa avvenire anche nel cuore adulto di un mammifero. Tuttavia, recenti risultati sperimentali hanno infranto questo paradigma. Topi transgenici in grado di riattivare YAP o inibire la proteina Salvador, in cofattore di MST1 (cfr. in precedenza) sono in grado di rigenerare il proprio miocardio

anche quando il danno è già stato riparato con una cicatrice (59, 84, 85). Inoltre, la rigenerazione miocardica è stata anche osservata somministrando un cocktail di fattori in grado di stimolare l'ingresso dei cardiomiociti nel ciclo cellulare (86). Nel loro insieme, questi studi indicano che probabilmente la strada più percorribile per ottenere la rigenerazione cardiaca è quella di risvegliare il potenziale proliferativo dei cardiomiociti adulti sopravvissuti a un danno, proprietà che pesci e anfibi mantengono per tutta la vita.

Riattivare la proliferazione dei cardiomiociti per rigenerare il cuore è possibile in alcuni modelli murini. Ad esempio, questo avviene in topi geneticamente modificati in cui l'espressione di YAP viene attivata a distanza di molti giorni dall'infarto, o in topi in cui viene deletato il gene per la chinasi inibitoria Mst-1 o quello che codifica per il cofattore di Mst-1 Salvador (59, 84, 85). Inoltre, rigenerazione miocardica è stata osservata dopo il trasferimento di alcuni geni che codificano per proteine che regolano il ciclo cellulare e quindi stimolano i cardiomiociti a proliferare (86). Questi approcci, tuttavia, sono complicati da trasferire alla clinica nell'uomo, visto che richiedono un'alta efficienza di trasferimento genico, non possono essere controllati nel tempo e pongono problemi di sicurezza se i vettori che vengono utilizzati per il trasferimento genico dovessero anche trasdurre altri tipi cellulari o cellule di tumori già esistenti e latenti.

Stimolazione del potenziale rigenerativo endogeno del cuore utilizzando microRNA

Una strategia potenzialmente molto interessante per ottenere la rigenerazione cardiaca è quella di stimolare il potenziale proliferativo dei cardiomiociti modulando il network dei microRNA. Questi sono corti

segmenti di RNA a doppio filamento che controllano virtualmente tutti gli aspetti della biologia delle cellule, dallo sviluppo alla trasformazione neoplastica, inclusa ovviamente la proliferazione. Il genoma umano codifica per oltre 2600 microRNA diversi, ciascuno dei quali ha la proprietà di legarsi a decine o anche centinaia di RNA messaggeri diversi, e di conseguenza diminuirne i livelli. I microRNA, quindi, rappresentano una sorta di reostati che indirizzano il fenotipo, anche complesso, di una cellula verso una specifica funzione. Dal momento che queste molecole possono essere facilmente ottenute per sintesi chimica vista la loro ridotta lunghezza (tipicamente, da 21 a 23 nucleotidi per ciascuno dei due filamenti, con un appaiamento imperfetto e la presenza di estremità sporgenti), sono disponibili collezioni di microRNA che possono essere usate per eseguire screening in vitro al fine di identificare una specifica funzione desiderata. Tramite questo approccio, il mio laboratorio ha identificato una serie di microRNA che sono in grado di stimolare la proliferazione dei cardiomiociti e quindi possono essere utilizzati per la rigenerazione cardiaca (87).

I microRNA che stimolano la proliferazione dei cardiomiociti possono essere classificati in tre diverse categorie (88). La prima comprende molecole che sono normalmente espresse nelle cellule staminali embrionali e rivestono un ruolo importante nel mantenimento della pluripotenza di queste cellule. Questi comprendono membri delle famiglie dei microRNA miR-302~367 e miR-miR-290, che possiedono la medesima sequenza di riconoscimento per gli mRNA bersaglio (la sequenza cosiddetta "seed", posizionata dal nucleotide 2 al nucleotide 8) (89, 90). L'attivazione del cluster miR-302-367 dopo l'infarto nel topo induce rigenerazione cardiaca, al pari della somministrazione di alcuni di questi microRNA

ottenuti per via sintetica (91). Un secondo gruppo di microRNA in grado di indurre rigenerazione cardiaca comprende alcuni microRNA coinvolti nella trasformazione tumorale. Questi comprendono il cluster miR-17~92 (anche chiamato OncomiR1) (92, 93), e i cluster paraloghi a questo miR-106b~25 e miR-106a~363 (94, 95). Anche in questo caso, l'espressione per via genetica del cluster miR-17~92 (96) o la somministrazione dei membri di questo cluster miR-19a/19b (97) determina rigenerazione cardiaca. Un terzo gruppo di microRNA è stato identificato tramite due screening che sistematicamente hanno analizzato tutti i microRNA umani (87, 98). Il più studiato dei microRNA identificati da questi studi è miR-199a-3p, che i nostri studi hanno dimostrato essere efficace nello stimolare la rigenerazione cardiaca dopo infarto sia nei topi che nei maiali quando espresso tramite un vettore virale AAV (87, 99) e, per ora soltanto nei topi, anche mediante una singola iniezione di microRNA sintetico veicolato mediante l'utilizzo di lipidi (100).

L'identificazione di microRNA con il potenziale di stimolare la proliferazione dei cardiomiociti e ottenere la rigenerazione cardiaca è particolarmente interessante dal punto di vista traslazionale, dal momento che queste molecole possono essere sviluppate come dei veri e propri farmaci, in grado di funzionare virtualmente in tutti i pazienti anche senza personalizzazione e estensiva manipolazione in laboratorio (al contrario delle terapie cellulari). I microRNA con funzione rigenerativa possono essere somministrati come molecole sintetiche. Evidenze già disponibili indicano che una singola iniezione nel miocardio infartuato, nel topo, di miR-199a-3p o miR-590-3p usando una formulazione lipidica è in grado di stimolare una risposta rigenerativa (100). Analoghi risultati sono stati ottenuti mediante una singola iniezione intramiocardi-

ca di miR-19a/19b (97) o miR-302b/c (101) o mediante la somministrazione endovenosa giornaliera di miR302b/c (91), miR-19a/19b (97) o miR-708 (102).

Prospettive cliniche

Il concetto che la rigenerazione del muscolo cardiaco possa essere ottenuta tramite l'impianto di cardiomiociti ottenuti in laboratorio a partire dalle cellule staminali embrionali o mediante la stimolazione del potenziale proliferativo dei cardiomiociti è decisamente una prospettiva innovativa ed eccitante. Mette in discussione diverse decenni di osservazioni che avevano ritenuto che il danno miocardico non fosse reversibile e offre speranze di trattamento a un vasto numero di pazienti con cardiomiopatia ischemica post-infarto. Nel caso dei cardiomiociti derivati dalle cellule staminali, i principali problemi che devono essere risolti riguardano la difficoltà di ottenere grandi numeri di cellule, la loro immunogenicità e quindi la necessità di immunosopprimere il ricevente al pari di un trapianto d'organo, e il fatto che i cardiomiociti derivati dalle cellule ES o iPS hanno caratteristiche embrionali e quindi immature, per cui la loro integrazione elettrica e meccanica nel tessuto cardiaco dove vengono iniettate è problematica e ha il potenziale di generare gravi aritmie.

Nel caso della rigenerazione cardiaca ottenuta stimolando la capacità endogena dei cardiomiociti di proliferare, il problema principale è quello dell'efficienza del trasferimento genico al miocardio. Fattori con attività stimolante la proliferazione possono essere iniettati tramite cateterismo coronario immediatamente dopo la PCI, o mediante mini toracotomia, o direttamente nel miocardio per via transendocardica utilizzando sistemi come il NOGA e il catetere Myostar (103). Per quanto riguarda l'effi-

cienza di internalizzazione di microRNA all'interno delle cellule cardiache, questo si può avvalere degli enormi progressi fatti in questo campo grazie all'introduzione in terapia delle nanoparticelle lipidiche (lipid nanoparticles, LNP) ottenute con la tecnologia SNALP (Stable Nuclei Acid Lipid Particle) (104). Questa tecnologia consente la generazione di particelle formate da un guscio lipidico che, al suo interno, può contenere acidi nucleici, in particolare mRNA, *short interfering RNA* (siRNA) o microRNA. Questa è la stessa tecnologia che ha consentito, nel 2018, l'approvazione clinica della prima terapia basata su un siRNA (per l'amiloidosi epatica dovuta all'accumulo di transtiretina) (105) e, nel corso del 2020, dei vaccini per COVID-19 di Pfizer/BioNTech e Moderna. Le LNP che si formano grazie alla tecnologia SNALP godono del fatto che uno dei lipidi utilizzati ha carica positiva a pH acido, in modo da complessarsi con gli acidi nucleici (mRNA, microRNA, siRNA) che portano una carica uniformemente negativa grazie ai fosfati dello scheletro degli acidi nucleici. A pH fisiologico, invece, la carica esterna della particella di-

venta neutra, riducendo la tossicità e gli effetti avversi, mentre l'acido nucleico rimane intrappolato all'interno.

Se la rigenerazione cardiaca potrà essere ottenuta sostituendo le cellule perse dall'esterno o piuttosto stimolando la proliferazione di quelle sopravvissute al danno rimane oggi una eccitante sfida. Certo è che, in ambedue i casi, il traguardo sembra oggi come mai in passato raggiungibile.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato reso possibile dall'Advanced Grant 787971 "CuRE" dell'European Research Council (ERC); dal Programme Grant RG/19/11/34633 della British Heart Foundation e dai grant 825670 "CardioReGenix" aned 874764 "REANIMA" del Programma Horizon 2020 della Commissione Europea, insieme al continuo e generoso supporto della Fondazione CRTrieste.

Conflitti di interesse

Mauro Giacca è un membro del Scientific Advisory Boards di Trizell Holding SA, Lausanne and DINAQR AG, Zurich-Lon-

RIASSUNTO

La rigenerazione cardiaca è stata a lungo considerata un traguardo impossibile da raggiungere sperimentalmente e un miraggio nella pratica clinica. Il fallimento delle sperimentazioni cliniche basate sulle cellule staminali cardiache e l'evidenza che queste cellule con ogni probabilità nemmeno esistono in natura hanno rinforzato la conclusione che il cuore è un organo irreversibilmente post-mitotico. Una possibile maniera di superare questo problema è il trapianto di cardiomiociti ottenuti in laboratorio dal differenziamento di cellule embrionali staminali, ottenute dagli embrioni direttamente o grazie alle tecniche di transdifferenziamento. Queste cellule possono essere trapiantate sia sotto forma di sospensioni sia dopo la formazione di tessuto tridimensionale cardiaco contrattile in laboratorio. Un approccio alternativo è quello di riattivare la capacità endogena dei cardiomiociti di replicarsi. Quest'ultima possibilità è basata sull'osservazione che animali di altre specie, ed anche i mammiferi fino alla nascita, sono capaci di rigenerare il cuore tramite il parziale de-differenziamento dei cardiomiociti già formati e la loro duplicazione. Il successo recente di entrambi gli approcci nella rigenerazione del cuore in modelli di animali di grande taglia suggerisce che la rigenerazione cardiaca è possibile. Diversi problemi tecnici, tuttavia, devono ancora essere risolti prima di raggiungere con successo un'estesa applicazione clinica.

Parole chiave: *Rigenerazione cardiaca, cardiologia sperimentale, cellule staminali embrionali, cardiomiociti, insufficienza cardiaca.*

don, due aziende che operano nel settore della terapia genica. È il fondatore e consulente di Purespring Therapeutics, che opera nel campo della terapia genica del rene, e di Forcefield Therapeutics, che sviluppa molecole con attività cardioprotettiva, entrambe con sede a Londra.

Bibliografia

1. Birks EJ. Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure. *Circ Res.* 2013; 113: 777-791.
2. Roger VL. Epidemiology of heart failure. *Circ Res.* 2013; 113: 646-659.
3. Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, et al. American Heart Association Advocacy Coordinating C, Council on Arteriosclerosis T, Vascular B, Council on Cardiovascular R, Intervention, Council on Clinical C, Council on E, Prevention, Stroke C. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail.* 2013; 6: 606-619, 2013.
4. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, et al. Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70: 1-25.
5. Gottlieb SS, Dickstein K, Fleck E, et al. Hemodynamic and neurohormonal effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1993; 88: 1602-1609.
6. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, et al. Committees D-HT, Investigators. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 2019; 381: 1995-2008.
7. Califf RM. LCZ696: too good to be true? *Eur Heart J.* 2015; 36: 410-412.
8. Kaye DM, Krum H. Drug discovery for heart failure: a new era or the end of the pipeline? *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 127-139.
9. Packer M. The Future Treatment of Heart Failure? *Eur Heart J.* 2018; 39: 5-7.
10. Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 1777-1785.
11. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J.* 1999; 138: S69-75.
12. Gonzalez A, Fortuno MA, Querejeta R, et al. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 549-562.
13. Kyto V, Saraste A, Saukko P, et al. Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis. *Am J Cardiol.* 2004; 94: 746-750.
14. Nef HM, Mollmann H, Hilpert P, et al. Activated cell survival cascade protects cardiomyocytes from cell death in Tako-Tsubo cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2009; 11: 758-764.
15. Stapel B, Kohlhaas M, Rieke-Hoch M, et al. Low STAT3 expression sensitizes to toxic effects of beta-adrenergic receptor stimulation in peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2017; 38: 349-361.
16. Townsend D, Yasuda S, McNally E, Metzger JM. Distinct pathophysiological mechanisms of cardiomyopathy in hearts lacking dystrophin or the sarcoglycan complex. *FASEB J.* 2011; 25: 3106-3114
17. Hashem SI, Perry CN, Bauer M, et al. Brief Report: Oxidative Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis in a Human Model of Danon Disease and Heart Failure. *Stem Cells.* 2015; 33: 2343-2350.
18. Maloyan A, Sanbe A, Osinska H, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. *Circulation.* 2005; 112: 3451-3461.
19. Yamaji K, Fujimoto S, Ikeda Y, et al. Apoptotic myocardial cell death in the setting of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Acta Cardiol.* 2005; 60: 465-470.
20. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52: 1213-1225.
21. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26: 1068-1079.
22. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009; 324: 98-102.
23. Soonpaa MH, Field LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol.* 1997; 272: H220-226.
24. Sedmera D, Reckova M, DeAlmeida A, et al. Thompson RP. Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003; 274: 773-777.
25. Ye L, D'Agostino G, Loo SJ, et al. Early Regenerative Capacity in the Porcine Heart. *Circulation.* 2018; 138: 2798-2808.
26. Haubner BJ, Schneider J, Schweigmann U, et al. Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2016; 118: 216-221.

27. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 2002; 298: 2188-2190.
28. Oberpriller JO, Oberpriller JC. Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool*. 1974; 187: 249-253.
29. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*. 2010; 464: 601-605.
30. Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010; 464: 606-609.
31. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013; 493: 433-436.
32. Canseco DC, Kimura W, Garg S, et al. Human ventricular unloading induces cardiomyocyte proliferation. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 65: 892-900.
33. Zacchigna S, Martinelli V, Moimas S, et al. Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction. *Nature communications*. 2018; 9: 2432.
34. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, et al. The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response. *Cell*. 2014; 157: 565-579.
35. Hirose K, Payumo AY, Cutie S, et al. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. *Science*. 2019; 364: 184-188.
36. Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010; 56: 130-140.
37. Zhou B, Honor LB, He H, et al. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest*. 2011; 121: 1894-1904.
38. Przybyt E, Krenning G, Brinker MG, Harmsen MC. Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate in vitro through STAT3 and Erk1/2. *J Transl Med*. 2013; 11: 39.
39. Hinrichsen R, Haunso S, Busk PK. Different regulation of p27 and Akt during cardiomyocyte proliferation and hypertrophy. *Growth Factors*. 2007; 25: 132-140.
40. Kardami E, Banerji S, Doble BW, et al. PKC-dependent phosphorylation may regulate the ability of connexin43 to inhibit DNA synthesis. *Cell Commun Adhes*. 2003; 10: 293-297.
41. Engel FB, Hsieh PC, Lee RT, Keating MT. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 15546-15551.
42. Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature*. 2015; 525: 479-485.
43. Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, et al. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 1998; 273: 10261-10269.
44. Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*. 2009; 138: 257-270.
45. D'Uva G, Aharonov A, Lauriola M, et al. ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat Cell Biol*. 2015; 17: 627-638.
46. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 16029-16034.
47. Bassat E, Mutlak YE, Genzelinakh A, et al. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*. 2017; 547: 179-184.
48. Kim SE, Huang H, Zhao M, et al. Wnt stabilization of beta-catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science*. 2013; 340: 867-870.
49. Singh AP, Umbarkar P, Guo Y, et al. Inhibition of GSK-3 to induce cardiomyocyte proliferation: a recipe for in situ cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*. 2019; 115: 20-30.
50. Tseng AS, Engel FB, Keating MT. The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chem Biol*. 2006; 13: 957-963.
51. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999; 398: 518-522.
52. Collesi C, Zentilin L, Sinagra G, Giacca M. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes. *J Cell Biol*. 2008; 183: 117-128.
53. Croquelois A, Domenighetti AA, Nemir M, et al. Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway. *J Exp Med*. 2008; 205: 3173-3185.
54. Campa VM, Gutierrez-Lanza R, Cerignoli F, et al. Notch activates cell cycle reentry and progression in quiescent cardiomyocytes. *J Cell Biol*. 2008; 183: 129-141.

55. Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011; 332: 458-461.
56. Yamamoto S, Yang G, Zablocki D, et al. Activation of Mst1 causes dilated cardiomyopathy by stimulating apoptosis without compensatory ventricular myocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1463-1474.
57. Matsui YY, Nakano NN, Shao DD, et al. Lats2 is a negative regulator of myocyte size in the heart. *Circ Res*. 2008; 103: 1309-1318.
58. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, et al. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Signal*. 2011; 4: ra70.
59. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 13839-13844.
60. Kirshenbaum LA, Abdellatif M, Chakraborty S, Schneider MD. Human E2F-1 reactivates cell cycle progression in ventricular myocytes and represses cardiac gene transcription. *Dev Biol*. 1996; 179: 402-411.
61. Agah R, Kirshenbaum LA, Abdellatif M, et al. Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2722-2728.
62. van Amerongen MJ, Diehl F, Novoyatleva T, et al. E2F4 is required for cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res*. 2010; 86: 92-102.
63. Soonpaa MH, Koh GY, Pajak L, et al. Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1997; 99: 2644-2654.
64. Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakit P, et al. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res*. 2003; 92: e12-19.
65. Busk PK, Hinrichsen R, Bartkova J, et al. Cyclin D2 induces proliferation of cardiac myocytes and represses hypertrophy. *Exp Cell Res*. 2005; 304: 149-161.
66. Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi MC, et al. Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle. *J Biol Chem*. 2011; 286: 8644-8654.
67. Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 2013; 497: 249-253.
68. Chaudhry HW, Dashoush NH, Tang H, et al. Cyclin A2 mediates cardiomyocyte mitosis in the postmitotic myocardium. *J Biol Chem*. 2004; 279: 35858-35866.
69. Woo YJ, Panlilio CM, Cheng RK, et al. Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure. *Circulation*. 2006; 114: 206-213.
70. Liao HS, Kang PM, Nagashima H, et al. Cardiac-specific overexpression of cyclin-dependent kinase 2 increases smaller mononuclear cardiomyocytes. *Circ Res*. 2001; 88: 443-450.
71. Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, et al. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res*. 2005; 96: 110-118.
72. Hassink RJ, Pasumarthi KB, Nakajima H, et al. Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2008; 78: 18-25.
73. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004; 95: 9-20.
74. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010; 107: 913-922.
75. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114: 763-776.
76. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011; 378: 1847-1857.
77. Zimmet H, Porapakham P, Porapakham P, et al. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *Eur J Heart Fail*. 2012; 14: 91-105.
78. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res*. 2015; 116: 1413-1430.
79. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation*. 2017; 136: 680-686.
80. Chong JJ, Yang X, Don CW, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014; 510: 273-277.
81. Liu YW, Chen B, Yang X, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol*. 2018; 36: 597-605.
82. Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, et al. Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation*. 2017; 135: 1832-1847.
83. Weinberger F, Breckwoldt K, Pecha S, et al. Cardiac repair in guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*. 2016; 8: 363ra148.

84. Heallen T, Morikawa Y, Leach J, et al. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development*. 2013; 140: 4683-4690.
85. Leach JP, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction. *Nature*. 2017; 550: 260-264.
86. Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, et al. Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration. *Cell*. 2018; 173: 104-116 e112.
87. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012; 492: 376-381.
88. Braga L, Ali H, Secco I, Giacca M. Non-coding RNA therapeutics for cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*. 2021; 117: 674-693.
89. Barroso-del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle*. 2009; 8: 394-398.
90. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*. 2008; 40: 1478-1483.
91. Tian Y, Liu Y, Wang T, et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci Transl Med*. 2015; 7: 279ra238.
92. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 2257-2261.
93. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005; 435: 828-833.
94. Gruszka R, Zakrzewska M. The Oncogenic Relevance of miR-17-92 Cluster and Its Paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 Clusters in Brain Tumors. *Int J Mol*. 2018; Sci. 19: 879.
95. Mehlich D, Garbicz F, Wlodarski PK. The emerging roles of the polycistronic miR-106b approximately 25 cluster in cancer - A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2018; 107: 1183-1195.
96. Chen J, Huang ZP, Seok HY, et al. mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res*. 2013; 112: 1557-1566.
97. Gao F, Kataoka M, Liu N, et al. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction. *Nature communications*. 2019; 10: 1802.
98. Diez-Cunado M, Wei K, Bushway PJ, et al. miRNAs that Induce Human Cardiomyocyte Proliferation Converge on the Hippo Pathway. *Cell reports*. 2018; 23: 2168-2174.
99. Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature*. 2019; 569: 418-422.
100. Lesizza P, Prosdocimo G, Martinelli V, et al. Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2017; 120: 1298-1304.
101. Wang LL, Liu Y, Chung JJ, et al. Local and sustained miRNA delivery from an injectable hydrogel promotes cardiomyocyte proliferation and functional regeneration after ischemic injury. *Nat Biomed Eng*. 2017; 1: 983-992.
102. Deng S, Zhao Q, Zhen L, et al. Neonatal Heart-Enriched miR-708 Promotes Proliferation and Stress Resistance of Cardiomyocytes in Rodents. *Theranostics*. 2017; 7: 1953-1965.
103. Cannata A, Ali H, Sinagra G, Giacca M. Gene Therapy for the Heart Lessons Learned and Future Perspectives. *Circ Res*. 2020; 126: 1394-1414.
104. Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther*. 2018; 28: 146-157.
105. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018; 379: 11-21.

LIPIGEN PEDIATRICO

MIGLIORARE LA DIAGNOSI E LA GESTIONE DI BAMBINI E ADOLESCENTI AFFETTI DA IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE: IL GRUPPO LIPIGEN PEDIATRICO

Improving the diagnosis and management of children and adolescents with familial hypercholesterolemia: the LIPIGEN paediatric group

MARTA GAZZOTTI¹, GIORGIA CARLUCCI¹, MANUELA CASULA^{1,2}

¹*Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari – Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

²*IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI), Italia*

SUMMARY

Familial dyslipidemias are a group of diseases characterized by altered levels of cholesterol, triglycerides, or combinations of both, due to genetic defects. Among them, familial hypercholesterolemia (FH) frequently occurs, determining a reduced ability of the liver to remove LDL cholesterol (LDL-c) from the circulation, with consequent accumulation of LDL-c. Early identification and initiation of drug therapy are essentials to achieve a normal life expectancy and to reduce the risk of premature events and cardiovascular mortality. However, FH remains under-diagnosed and under-treated. The identification of FH in childhood is therefore essential, though made more challenging by the lack of validated criteria and by the clinical phenotype usually less severe than in FH adults.

In this scenario, in 2018 several centers involved in the Italian LIPIGEN study decided to establish the LIPIGEN paediatric group. The LIPIGEN paediatric group considered necessary the implementation of the data collection: in fact, the evaluation of additional factors for pediatric subjects will allow not only to better investigate some aspects of the disease but also to evaluate new parameters that could be integrated into the diagnostic algorithms. Furthermore, future expectations include increasing the knowledge of pharmacological approach, management of FH pediatric patients, initiation of therapy, achievement of therapeutic goals, with a reduction in the incidence of cardiovascular events.

Key words: *Paediatric LIPIGEN, familial hypercholesterolemia, paediatric cohort, genetic dyslipidemias.*

Introduzione

Le dislipidemie familiari sono un gruppo di patologie caratterizzate da alterati livelli di colesterolo circolante, trigliceridi o combinazioni di entrambi, a causa di difetti genetici.

Tra i difetti metabolici più frequentemente ereditati ricorre l'ipercolesterolemia familiare (FH), caratterizzata da elevati livelli plasmatici di colesterolo totale (CT) e colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità (c-LDL) fin dalla nascita, condizione predisponente ad un rischio molto elevato di lesioni aterosclerotiche e malattia coronarica prematura (CHD) (1).

In particolare, l'FH è un disordine autosomico dominante che, sia nella forma omozigote (HoFH) che nella forma eterozigote (HeFH), si presenta con una ridotta capacità del fegato di rimuovere c-LDL dalla circolazione con conseguente accumulo di c-LDL in circolo (2-3).

La prevalenza storica di HeFH era di 1:500, ma *report* più recenti hanno evidenziato come sia una patologia molto più diffusa rispetto a quanto ipotizzato inizialmente, arrivando ad interessare 1 soggetto su 100/200. Sulla base di tali dati, è stato stimato che siano presenti oltre 4,5 milioni di pazienti affetti da FH in Europa e 35 milioni di pazienti in tutto il mondo, di cui il 20-25% sono bambini e adolescenti (4). Anche la prevalenza della forma rara omozigote è stata rivalutata nel tempo, passando da 1:1.000.000 a 1:160.000-300.000 (5).

Nella maggior parte dei casi (85-90%), l'FH è causata da mutazioni nel gene che codifica

per il recettore delle LDL (*LDLR*), ma un fenotipo clinico simile può derivare anche da mutazioni a carico del gene codificante per l'apolipoproteina B (*APOB*) tra il 2 e il 5% di casi di FH, oppure da mutazioni *gain-of-function* nel gene della proproteina convertasi subtilisina/Kexin tipo 9 (*PCSK9*) (2-3) e, in casi più rari, da mutazioni sul gene che codifica per l'apolipoproteina E (*APOE*) (6). Ancora più raramente questa patologia, in una forma recessiva, è causata da mutazioni del gene codificante la proteina adattatrice del recettore LDL (*LDLRAP1*) (7).

Un'identificazione precoce e l'inizio di una terapia farmacologica fin dalla giovane età risultano fondamentali per raggiungere una normale aspettativa di vita e per ridurre il rischio di sviluppare eventi prematuri e la mortalità cardiovascolare. Tuttavia, l'FH rimane sotto-diagnosticata e sotto-trattata nella popolazione generale (1).

La diagnosi può essere effettuata sia dal punto di vista clinico sia mediante test genetico. Tuttavia, la valutazione della presenza delle tipiche manifestazioni cliniche di FH risulta particolarmente critica nei pazienti più giovani, poiché la limitata esposizione temporale ad elevati livelli c-LDL determina una bassa prevalenza dei segni caratteristici. Generalmente, la diagnosi fenotipica ricorre alla valutazione di parametri biochimici e clinici, quali livelli elevati di c-LDL e storia familiare positiva per livelli elevati di c-LDL o malattia coronarica prematura (CHD), presenza di xantoma tendineo e/o arco corneale prima dei 45 anni. A ciò si aggiunge la possibilità della conferma del test genetico (1).

Sebbene negli adulti, pur con dei limiti, siano disponibili algoritmi diagnostici (8), l'identificazione di FH nell'infanzia è resa più impegnativa sia dalla mancanza di criteri convalidati sia dal fenotipo clinico solitamente meno grave nelle prime decadi di vita. Xantomati e/o arco corneale, infatti, so-

Indirizzo per la corrispondenza

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

no raramente riscontrabili nei bambini, ad eccezione delle forme più severe di HoFH, e i livelli di c-LDL fluttuano notevolmente, ostacolando l'identificazione di *cut-off* specifici per una diagnosi tempestiva (9). In particolare, il *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN) *score* non è stato validato nei bambini, mentre i criteri di *Simon Broome* presentano un unico *cut-off* specifico fissato a 155 mg/dL per i soggetti al di sotto dei 16 anni, senza però discriminare ulteriormente tra le età dei soggetti pediatrici. Infine, i criteri US MedPed non considerano separatamente la fascia pediatrica, ma utilizzano un unico *cut-off* da applicare a tutti i soggetti al di sotto di 20 anni (4).

L'infanzia risulta essere il periodo ottimale non solo per formulare precocemente la diagnosi, ma anche per discriminare un possibile soggetto FH da uno non FH sulla base delle concentrazioni di c-LDL, proprio per la mancanza o minima influenza di dieta e variazioni ormonali. Dopo l'intervento dietetico, qualsiasi bambino che continua a presentare un valore di c-LDL maggiore o uguale a 190 mg/dL ha un'elevata probabilità di essere affetto da FH. Inoltre, se nella famiglia si è già verificato un evento prematuro nei parenti più prossimi e almeno un genitore presenta elevati livelli di c-LDL, è sufficiente un valore di c-LDL maggiore o uguale a 160 mg/dL a suggerire il sospetto di FH. La ricerca di varianti causative risulta a questo punto cruciale, data la modalità di trasmissione autosomica dominante della patologia, che richiede quindi la presenza della mutazione almeno in uno dei due genitori. Da ciò si evince l'importanza di ricostruire l'albero genealogico al fine di identificare se la mutazione deriva dal ramo materno, paterno o da entrambi, e procedere poi con lo *screening* negli altri familiari (4). In questo complesso scenario di identificazione e diagnosi di FH nella popolazione generale, i registri di patologia si sono rive-

lati uno strumento importante per raccogliere, sia a livello nazionale che internazionale, dati relativi a pazienti FH su larga scala provenienti da tutte le parti del mondo, al fine di migliorare le conoscenze e la consapevolezza di questa patologia, promuovere una diagnosi precoce ed un trattamento più efficace, e garantire un programma assistenziale continuo per i pazienti (10). Grazie ad iniziative a livello globale, come quella promossa dall'*European Atherosclerosis Society* nell'ambito del progetto *FH Studies Collaborations* (EAS-FHSC) (11-12), la raccolta dati è aumentata in tutto il mondo negli ultimi anni e ha mostrato la sua potenzialità nell'approfondimento delle basi genetiche della malattia, nell'indagine della correlazione genotipo-fenotipo, nell'implementazione degli algoritmi diagnostici, così da adattarli ai diversi contesti nazionali e alle diverse fasce di età della popolazione a cui devono essere applicati, nel confronto degli approcci farmacologici e dei *gap* nel trattamento sulla base delle evidenze *real-world*, che spesso discostano dai risultati dei *trial* clinici, nell'identificazione di possibili nuovi fattori in grado di modificare il rischio cardiovascolare, e nella studio di sottopopolazioni specifiche, quale ad esempio quella pediatrica su cui si stanno concentrando particolarmente le ricerche negli ultimi anni (10,13).

Il gruppo LIPIGEN pediatrico

Per quanto riguarda il contesto italiano, nel 2018 i centri specialistici coinvolti nello studio LIPIGEN (14, 15) hanno deciso di costituire il gruppo LIPIGEN pediatrico, includendo sia centri prettamente pediatrici che centri dell'adulto che occasionalmente si trovano a dover gestire pazienti FH con età inferiore ai 18 anni (10). Obiettivo primario del Gruppo è migliorare lo *screening*, la diagnosi e la gestione dei bambini e degli ado-

lescenti affetti da FH. Altri obiettivi includono l'identificazione e la proposta di modifiche e implementazioni nella raccolta, analisi e interpretazione dei dati inseriti nella scheda di raccolta elettronica (eCRF) e il confronto delle modalità di gestione e trattamento dei soggetti pediatrici su tutto il territorio italiano, al fine di proporre delle raccomandazioni che possano supportare la pratica clinica.

A luglio 2021, il gruppo LIPIGEN pediatrico includeva 31 centri LIPIGEN (Figura 1), per un totale di oltre 1600 soggetti con diagnosi clinica e/o genetica di FH.

Data la natura osservazionale dello studio, è prevista la raccolta di dati registrati nella normale pratica clinica che principalmente riguardano l'anamnesi personale, la storia familiare di malattia cardiovascolare e di dislipidemia, i risultati biochimici del profilo lipidico, il trattamento ipolipemizzante, eventuali altre patologie e trattamenti concomitanti, e i risultati del test genetico per la ricerca di mutazioni nei geni causativi.

Implementazione della raccolta dati

Così come nel paziente adulto, anche nei soggetti al di sotto dei 18 anni la raccolta dei dati viene effettuata inserendo le informazioni nella specifica eCRF di ogni paziente. Tuttavia, data la peculiarità nei pazienti FH pediatrici, ad eccezione delle forme più severe, di una bassa prevalenza delle tipiche caratteristiche fenotipiche riscontrabili negli adulti, si è ritenuto necessario implementare la eCRF con una sezione aggiuntiva di raccolta dati "Paediatric data", specifica solo per questa sottopopolazione (Figura 2).

In particolare, i dati aggiuntivi includono una raccolta più dettagliata delle informazioni relative sia alla storia familiare sia al soggetto stesso:

- Presenza di un evento CV prematuro,



Figura 1 - Distribuzione geografica dei centri LIPIGEN che hanno aderito al gruppo LIPIGEN pediatrico.

non limitata ai parenti di primo grado ma estesa anche a quelli di secondo grado. Infatti, alla giovane età dei soggetti pediatrici spesso corrisponde una giovane età degli stessi genitori, che potrebbero non aver ancora manifestato l'evento e/o essere già efficacemente trattati. Da ciò deriva l'importanza di indagare tale parametro anche nei nonni.

- Valore di c-LDL pretrattamento in entrambi i parenti di primo grado. Ciò permette di avere un quadro più completo relativo alla storia familiare del soggetto e di facilitare il processo di *screening* a cascata.
- Ingresso o meno nella pubertà. Questo parametro risulta utile per meglio approfondire l'andamento del quadro lipidico del paziente, che potrebbe registrare

Paediatric Data

***Presence of known premature CHD**

Mother Sibling
 Father Not available
 Grandmother Nobody
 Grandfather

***Pre-treatment LDL-cholesterol:**

Mother mg/dL not available mmol/L
 Father mg/dL not available mmol/L

***Puberty** ▾

***Waist circumference** cm not available

Figura 2 - Nuova sezione “Paediatric data” aggiunta in eCRF.

una momentanea diminuzione delle concentrazioni di c-LDL durante la pubertà e successivamente un nuovo rialzo.

- Misurazione della circonferenza della vita. Questo parametro può aiutare nella discriminazione di un quadro diagnostico diverso dall’ipercolesterolemia familiare, come obesità oppure sindrome metabolica.

Altre esperienze di registri di patologia

Così come il gruppo LIPIGEN pediatrico, altri gruppi di lavoro sono stati creati all’interno di registri di patologia già esistenti oppure sono stati costituiti prevedendo, tra

i criteri di inclusione, solamente i soggetti al di sotto dei 18 anni, così da focalizzarsi esclusivamente sulla fascia pediatrica. Ad esempio, recentemente all’interno del registro CASCADE-FH degli Stati Uniti è stata caratterizzata la popolazione pediatrica (16); altri registri già presenti da anni includono lo “UK National Paediatric Familial Hypercholesterolaemia Register”, istituito nel 2012 con l’obiettivo di raccogliere sia i dati basali che i dati di *follow up* a lungo termine di bambini affetti da FH in forma eterozigote nel Regno Unito (17), oppure il “Czech MedPedregistry”, un *network* per la gestione della popolazione pediatrica dal 1998 (18) o il “Greek Paediatric FH Register”, avviato nel 1993 (19).

Inoltre, in letteratura sono riportate anche collaborazioni internazionali che hanno permesso l'analisi di dati provenienti da *database* stato-specifici.

Ne è esempio l'“*International Paediatric FH register*” (20), che ha riportato le esperienze di diverse coorti europee includendo Norvegia, Regno Unito, Olanda, Belgio, Repubblica Ceca, Austria, Portogallo e Grecia, offrendo la possibilità di confrontare l'impatto di diversi approcci, politiche sanitarie e percorsi di cura sull'identificazione e sul trattamento di bambini e adolescenti affetti da FH in forma eterozigote. L'analisi dei dati provenienti da diverse realtà europee ha permesso, ad esempio, di identificare una certa variabilità tra i singoli Paesi per quanto riguarda l'età alla diagnosi, con un valore mediano di 3 anni in Grecia, dove da anni è presente un programma di *screening* sistematico dei valori di colesterolo in tutti i bambini attorno ai tre anni, che si discosta dai valori mediani tra 7 e 10 anni nelle altre coorti europee analizzate.

Una simile età media alla diagnosi è stata riscontrata anche nei soggetti pediatrici inclusi nel registro CASCADE (16). Altre differenze sono state identificate anche per quanto riguarda l'età di inizio del trattamento, il tipo di terapia ipolipemizzante prescritta, e la proporzione di soggetti al di sopra dei 10 anni non trattati ma con livelli di c-LDL superiori a quelli indicati dalle linee guida.

Prospettive future

I dati basali già inseriti nella eCRF stanno permettendo di caratterizzare in modo approfondito i soggetti FH LIPIGEN sia da un punto di vista clinico che molecolare, e il gran numero di soggetti sottoposti a indagini genetiche (95,7% della coorte LIPIGEN pediatrica) potrà permettere di meglio in-

dagare le correlazioni genotipo-fenotipo. Inoltre, la valutazione dei parametri aggiuntivi per i soggetti pediatrici permetterà non solo di meglio approfondire alcuni aspetti della patologia ma anche di valutare nuovi parametri che potrebbero essere integrati all'interno degli algoritmi diagnostici, così da identificare degli *score* specifici per i soggetti pediatrici con una *performance* migliore rispetto a quanto ad oggi disponibile.

Infine, numerosi aspetti potranno essere approfonditi in futuro a seguito della raccolta dei dati relativi al *follow up*. Tra questi, sicuramente l'approccio farmacologico potrà essere indagato per poter valutare la gestione dei pazienti pediatrici FH, l'inizio della terapia e gli eventuali ostacoli riscontrati nell'accettazione di un trattamento farmacologico già in giovane età, sia da parte dello stesso soggetto FH sia da parte della famiglia, così come il raggiungimento dei *goal* terapeutici e l'incidenza di eventi cardiovascolari.

Appendice 1

Coordinatrici gruppo LIPIGEN pediatrico:
Pederiva C, Capra ME

Centri coinvolti: AN-01 Sarzani R, BA-02 Sabbà C, BO-01 Borghi C, CA-01 Muntoni S, CH-01 Cipollone F, CT-01 Purrello F, CZ-01 Pujia A, FE-01 Passaro A, GE-01 Pisciotta L, ME-01 Mandraffino G, MI-01 Pellegatta F, MI-02 Mombelli G, MI-05 Pederiva C, MI-06 Werba JP, MI-07 Parati G, MO-01 Carubbi F, MO-02 Iughetti L, NA-01 Iannuzzi A, NA-02 Iannuzzo G, NA-03 Calabrò P, PA-01 Averna M, PC-01 Biasucci G, PD-01 Zambon S, PG-01 Roscini AR, RM-01 Arca M, RM-05 Del Ben M, RM-06 Bartuli A, TN-01 Citroni N, TO-01 Guardamagna O, VA-01 Maroni L, VR-01 Zenti MG

Comitato scientifico: Arca M, Averna M, Bertolini S, Calandra S, Catapano AL, Tarugi P

RIASSUNTO

Le dislipidemie familiari sono un gruppo di malattie caratterizzate da livelli alterati di colesterolo, trigliceridi o combinazioni di entrambi, a causa di difetti genetici. Tra queste, l'ipercolesterolemia familiare (FH) è caratterizzata da una ridotta capacità del fegato di rimuovere il colesterolo LDL (LDL-c) dal circolo, con un suo conseguente accumulo a livello dei vasi e accelerazione del processo aterosclerotico.

L'identificazione precoce e l'inizio della terapia farmacologica sono essenziali per raggiungere una normale aspettativa di vita e ridurre il rischio di eventi prematuri e mortalità cardiovascolare. Tuttavia, l'FH resta una condizione sotto-diagnosticata e sotto-trattata. La diagnosi fin dalla giovane età dei soggetti affetti è quindi essenziale, anche se è resa più difficile dalla mancanza di criteri convalidati e dal fenotipo clinico, tipicamente meno grave rispetto a quello dell'adulto.

In questo scenario, nel 2018 alcuni centri coinvolti nello studio italiano LIPIGEN hanno deciso di istituire il gruppo LIPIGEN pediatrico, con l'obiettivo di migliorare lo *screening*, la diagnosi e la gestione dei bambini e degli adolescenti affetti da FH. Il gruppo ha ritenuto necessario implementare la raccolta dei dati: infatti, la valutazione di fattori aggiuntivi specifici per i soggetti pediatrici permetterà non solo di indagare meglio alcuni aspetti della patologia, ma anche di valutare nuovi parametri che potrebbero essere integrati negli algoritmi diagnostici. Inoltre, le aspettative future includono l'aumento della conoscenza rispetto all'approccio farmacologico, l'età di inizio della terapia e il raggiungimento degli obiettivi terapeutici, al fine di ridurre l'incidenza di eventi cardiovascolari in questa popolazione.

Parole Chiave: *LIPIGEN pediatrico, ipercolesterolemia familiare, coorte pediatrica, dislipidemie genetiche.*

Bibliografia

1. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, et al. Familial hypercholesterolemia 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(45): 3478-90a.
2. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007; 4(4): 214-225.
3. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(2): 109-121.
4. Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, Chapman MJ, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J.* 2015; 36(36): 2425-2437.
5. Hegele RA, Borén J, Ginsberg HN, Arca M, et al. Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: a European Atherosclerosis Society task force consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020; 8(1): 50-67.
6. Awan Z, Choi HY, Stitzel N, Ruel I, Bamimore MA, Husa R, Gagnon MH, Wang RH, Peloso GM, Hegele RA, Seidah NG, Kathiresan S, Genest J. APOE p.Leu167del mutation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2013; 231(2): 218-222.
7. Fellin R, Arca M, Zuliani G, Calandra S, Bertolini S. The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene.* 2015 15; 555(1): 23-32.
8. Casula M, Olmastroni E, Pirillo A, Catapano AL. Evaluation of the performance of Dutch Lipid Clinic Network score in an Italian FH population: The LIPIGEN study. *Atherosclerosis.* 2018; 277: 413-418.
9. Tada H, Takamura M, Kawashiri MA. Familial Hypercholesterolemia: A Narrative Review on Diagnosis and Management Strategies for Children and Adolescents. *Vasc Health Risk Manag.* 2021; 17: 59-67.
10. Gazzotti M, Casula M, Olmastroni E, Averna M, et al. How registers could enhance knowledge and characterization of genetic dyslipidaemias: The experience of the LIPIGEN in Italy and of other networks for familial hypercholesterolemia. *Atheroscler Suppl.* 2020; 42: e35-e40.
11. Vallejo-Vaz AJ, Kondapally Seshasai SR, Cole D, Hovingh GK, et al. Familial hypercholesterolaemia: A global call to arms. *Atherosclerosis.* 2015; 243(1): 257-259.
12. EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration, Vallejo-Vaz AJ, De Marco M, Stevens CAT, Akram A, et al. Overview of the current status of familial hypercholesterolaemia care in over 60 countries - The EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). *Atherosclerosis.* 2018; 277: 234-255.

13. EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). Global perspective of familial hypercholesterolaemia: a cross-sectional study from the EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). *Lancet*. 2021; S0140-6736(21)01122-3.
14. Averna M, Cefalù AB, Casula M, Noto D, et al. LIPIGEN Group. Familial hypercholesterolemia: The Italian Atherosclerosis Society Network (LIPIGEN). *Atheroscler Suppl*. 2017; 29: 11-16.
15. Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, Averna M, et al. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atheroscler Suppl*. 2017; 29: 17-24.
16. de Ferranti SD, Shrader P, Linton MF, Knowles JW, et al. Children with Heterozygous Familial Hypercholesterolemia in the United States: Data from the Cascade Screening for Awareness and Detection-FH Registry. *J Pediatr*. 2021; 229: 70-77.
17. Ramaswami U, Cooper J, Humphries SE; FH Paediatric Register Steering Group. The UK Paediatric Familial Hypercholesterolaemia Register: preliminary data. *Arch Dis Child*. 2017; 102(3): 255-260.
18. Vrablík M, Vaclová M, Tichý L, Soška V, et al. Familial hypercholesterolemia in the Czech Republic: more than 17 years of systematic screening within the MedPed project. *Physiol Res*. 2017; 66(Suppl 1): S1-S9.
19. Mollaki V, Progiaris P, Drogari E. Familial Hypercholesterolemia in Greek children and their families: genotype-to-phenotype correlations and a reconsideration of LDLR mutation spectrum. *Atherosclerosis*. 2014; 237(2): 798-804.
20. Ramaswami U, Futema M, Bogsrud MP, Holven KB, et al. Comparison of the characteristics at diagnosis and treatment of children with heterozygous familial hypercholesterolaemia (FH) from eight European countries. *Atherosclerosis*. 2020; 292: 178-187.

MEDICINA SCIENZA E SOCIETÀ

CAMBIAMENTI CLIMATICI E SALUTE

Climate change and health

FILIPPO GIORGI*Centro Internazionale di Fisica Teorica, Trieste*

Il riscaldamento globale è una delle grandi sfide scientifiche, tecnologiche, socioeconomiche e culturali del ventunesimo secolo. L'evidenza è ormai conclusiva che il sistema climatico terrestre si sta riscaldando ad un ritmo senza precedenti almeno negli ultimi 10.000 anni, circa 1,2 °C a livello globale dall'inizio del ventesimo secolo, e che questo riscaldamento è per la maggior parte dovuto alle emissioni di gas serra derivanti da attività umane, come l'anidride carbonica prodotta dall'uso di combustibili fossili e il metano prodotto da allevamenti intensivi. Il riscaldamento globale sta modificando in maniera importante alcune caratteristiche del sistema climatico terrestre: aumento di eventi meteorologici cosiddetti "catastrofici", come alluvioni, siccità e ondate di calore; fusione dei ghiacciai continentali, i nostri maggiori serbatoi di acqua potabile, come per esempio sta accadendo a tutti i ghiacciai alpini; innalzamento del livello del mare, circa 20 cm negli ul-

timi 120 anni, e conseguente danno alle aree costiere; presenza di aree particolarmente sensibili al riscaldamento globale, come il Mediterraneo che si sta riscaldando ad una velocità quasi doppia della media globale; modifica delle circolazioni atmosferiche globali, che rendono alcune zone più aride ed altre eccessivamente piovose; perdita di biodiversità. Tutte queste modifiche del sistema climatico, e molte altre, che presumibilmente continueranno nelle prossime decadi in maniera sempre più accentuata se non si ridurranno drasticamente le emissioni di gas serra, hanno effetti importanti su molti settori socioeconomici della società.

Uno di questi settori, sicuramente fra i più importanti e più colpiti dal riscaldamento del pianeta, è quello della salute umana. Gli effetti sulla salute dei cambiamenti climatici indotti dal riscaldamento globale sono molteplici e dipendono da numerosi fattori, come l'area geografica di interesse, le condizioni socioeconomiche della popolazione, la struttura dei diversi sistemi sanitari, la distribuzione demografica, il livello di educazione e così via. D'altronde, l'ormai famosa estate del 2003 ha messo in luce la vulnerabilità ai fattori climatici anche di si-

Indirizzo per la corrispondenza

Filippo Giorgi
Centro Internazionale di Fisica Teorica, Trieste
E-mail: giorgi@ictp.it

stemi sanitari avanzati, come quello francese o quello dell'Italia settentrionale. Durante le ondate di calore eccezionali avvenute soprattutto nell'agosto del 2003 in tutta Europa, con anomalie termiche anche superiori ai 10 gradi, si sono registrati almeno 70.000 decessi oltre la media legati allo stress termico (e.g. Robine et al. 2008), soprattutto nelle fasce della popolazione più vulnerabile, come gli anziani o le persone con patologie respiratorie e cardiocircolatorie pregresse. E le proiezioni climatiche ci dicono che, nello scenario cosiddetto "business as usual", cioè nel caso in cui non si implementassero politiche di riduzione di emissioni di gas serra, le condizioni dell'estate 2003 potrebbero diventare la normalità in Europa e nell'area mediterranea, infatti con estati ancora più calde (e.g. Giorgi and Lionello 2008).

Riguardo lo stress termico, esistono condizioni ambientali al limite della "vivibilità", per esempio temperature al di sopra di 35 °C con umidità al di sopra del 95%. In queste condizioni il corpo umano non riesce a raffreddarsi efficientemente, e quindi non riesce ad operare per periodi prolungati. Oggi queste condizioni si riscontrano solo in alcune aree limitate, per esempio del Medio Oriente, ma le proiezioni climatiche per gli scenari più estremi ci dicono che potrebbero espandersi enormemente e soprattutto in zone tropicali altamente urbanizzate, quindi con alta densità di popolazione in ambienti spesso poveri e degradati (e.g. Im et al. 2017). Si può quindi facilmente intuire l'effetto devastante che solamente questo effetto del riscaldamento globale potrebbe avere sui sistemi sanitari di queste aree.

Più in generale, l'aumento di ondate di calore ed eventi estremi di carattere siccitoso potrebbe portare ad una riduzione della produttività agricola, soprattutto nei paesi in cui l'agricoltura dipende principalmen-

te dal regime delle piogge, come ad esempio i paesi del continente africano. Questo porterebbe ad un aumento di patologie legate alla denutrizione, già oggi molto diffuse nei paesi più poveri del mondo, effetto che potrebbe anche innescare fenomeni migratori di massa di cosiddetti "migranti climatici". Un analogo di questo fenomeno occorso nel recente passato è la carestia che ha sconvolto larghe regioni dell'Africa orientale negli anni '70 e '80 a causa di un prolungato periodo di riduzione delle precipitazioni, con milioni di morti e di rifugiati (Glantz 1987). Nell'altro estremo dello spettro idrologico, l'aumento di eventi estremi di carattere alluvionale porterebbe ad un aumento di decessi e patologie, sia di carattere fisico che psicologico, legate ai disastri naturali e la distruzione di infrastrutture che ne consegue.

Molta attenzione è stata rivolta dalla comunità scientifica agli effetti dei cambiamenti climatici sulla diffusione di malattie trasportate da vettori, spesso diversi tipi di zanzare, come ad esempio la malaria, dengue, febbre gialla, Zika o la febbre del Nilo occidentale (e.g. Ogden 2017). Per esempio, modifiche nei regimi di temperatura e precipitazioni potrebbero influenzare la dinamica di evoluzione dei vettori, e in particolare estendere le loro aree di influenza, che peraltro si stanno già espandendo a causa della crescente globalizzazione socioeconomica. Proiezioni sulla possibile espansione di queste malattie sono ancora caratterizzate da una grande incertezza, anche a causa della complessità dei diversi processi coinvolti, ma c'è sicuramente il potenziale che il riscaldamento globale possa contribuire a far riemergere queste malattie anche in aree che oggi ne sono prive.

Un discorso simile vale per le patologie da polline, per esempio l'asma, che possono essere influenzate da variazioni negli habitat naturali delle piante che producono

i pollini. Qualche anno fa con un *team* europeo di ricerca abbiamo completato uno studio sul potenziale impatto che i cambiamenti climatici possono avere sulla diffusione in Europa della *Ambrosia Artemisiifolia*, una pianta che produce un polline altamente allergenico (Lake et al. 2017). Questo studio ha mostrato che a causa delle maggiori temperature, l'*Ambrosia*, oggi prevalente soprattutto nell'Europa sud-orientale, si espanderebbe anche in zone del centro e nord Europa. Abbiamo stimato che la popolazione europea esposta a questo polline potrebbe più che raddoppiare nei prossimi 30-50 anni, da circa 33 milioni attualmente a circa 77 milioni. Inoltre, le maggiori concentrazioni di pollini e una più lunga stagione di pollinazione aggraverebbero i sintomi delle patologie legate a questo polline. Tutto questo comporterebbe un forte carico sui sistemi sanitari di diversi paesi, non solo fra quelli che già oggi soffrono di questo problema (per esempio Ungheria e i paesi balcanici), ma anche fra quelli dove oggi questa pianta non è diffusa, come per esempio Germania, Francia e Finlandia.

Un altro problema di fondamentale importanza dal punto di vista sanitario è quello dell'inquinamento atmosferico. L'inquinamento, soprattutto legato al particolato fine (il cosiddetto PM2.5) e all'ozono, è uno dei grandi *killer* dei nostri tempi. Diversi studi hanno analizzato in concomitanza dati epidemiologici e simulazioni di qualità dell'aria, mostrando che ogni anno l'inquinamento atmosferico causa la morte prematura per problemi respiratori e cardiovascolari di 7-10 milioni di persone nel mondo, diminuendo l'aspettativa di vita media globale di 2,3-3,5 anni (e.g. Lelieveld et al. 2020). L'inquinamento dell'aria può essere influenzato dai cambiamenti climatici in diversi modi. Per esempio, le maggiori temperature aumentano la velocità di emissio-

ne di composti biogenici che agiscono da precursori per la formazione dell'ozono. In uno studio recente abbiamo stimato che in Europa il numero di giorni in cui si avrebbe l'allarme ozono nelle maggiori città italiane potrebbe più che raddoppiare nella seconda metà del 21mo secolo solo a causa delle maggiori temperature (Meleux et al. 2007).

Un altro esempio di impatto sull'inquinamento è legato all'effetto del riscaldamento globale sul ciclo idrologico terrestre, ed in particolare all'allungarsi di periodi secchi e condizioni di circolazione stagnante, cosa che ci aspettiamo dovrebbe accadere anche in Europa e sull'area del Mediterraneo soprattutto nella stagione estiva (Giorgi and Lionello 2008). Questo dovrebbe aumentare le concentrazioni non solo di ozono ma anche di particolato atmosferico, il cui principale processo di rimozione è legato alle precipitazioni. Infatti, le regolamentazioni europee legate alle emissioni di particolato atmosferico e precursori dell'ozono devono tener conto del possibile effetto dei cambiamenti climatici.

Già da questi esempi, peraltro non esaustivi, si evince la gravità dei possibili effetti dei cambiamenti climatici sulla salute umana e sui sistemi sanitari nazionali, che come ci ha insegnato la pandemia COVID-19, operano spesso ai limiti della resilienza. Lo studio di questi effetti richiede chiaramente un approccio interdisciplinare che spazi dalle scienze fisiche alle scienze mediche e quelle socioeconomiche, ed è quindi importante che queste diverse comunità scientifiche riescano ad instaurare un efficace dialogo fra di loro. L'ambiente oggi è sotto assedio da molteplici direzioni, come i cambiamenti climatici, inquinamento di aria e acqua, perdita di biodiversità, degrado del suolo, deforestazione e urbanizzazione incontrollata, e questo inevitabilmen-

te continuerà ad avere ripercussioni profonde sulla salute collettiva delle nostre società e sui sistemi sanitari nazionali. È quindi imperativo da un lato che si faccia di tutto per fermare questo assedio all'ambiente tramite efficaci politiche legate alla cosiddetta "green economy", e dall'altro che si pianifichino politiche sanitarie che tengano conto anche dei problemi ambientali in cui viviamo con lo scopo di salvaguardare la salute di tutte le comunità.

Bibliografia

Giorgi F, Lionello P (2008) Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change*, 63, 90-104.
Glantz MH, Ed. *Drought and Hunger in Africa:*

Denying famine a future, Cambridge University Press, Cambridge, New York. 1987; 457.

Im E-S, Pal JS, Eltahir EAB. Deadly heat waves projected in the densely populated agricultural regions of South Asia. *Science Advances*. 2017; 3: e1603322.

Lake I, Coauthors. Climate change and ragweed pollen allergy in Europe. *Environmental Health Perspective*. 2017; 125: 385-391.

Lelieveld J, Coauthors. Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective. *Cardiovascular Research*. 2020; 116: 1910-1917.

Meleux F, Solmon F, Giorgi F. Increase in summer European ozone amounts due to climate change. *Atmospheric Environment*. 2007; 41: 7577-7587.

Ogden NH. Climate change and vector-borne diseases of public health significance. *FEMS Microbiology Letters*. 2017; 364: fnx186.

Robine JM, Co-authors. Death toll exceeded 70,000 in Europe during the summer of 2003. *Comptes Rendus Biologie*. 2008; 331: 171-178.

NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI**EAS 2021****MANUELA CASULA**

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

Nel mese di giugno 2021, in modalità virtuale, si è tenuto il meeting annuale dell'European Atherosclerosis Society (EAS). Tra gli argomenti discussi durante il congresso ricordiamo quelli che sono stati, a nostro avviso, i più rilevanti.

Linee guida EAS: avviare i pazienti ad alto rischio con la terapia ipolipemizzante di combinazione

I pazienti con dislipidemia e ad altissimo rischio cardiovascolare che difficilmente raggiungeranno l'obiettivo con una statina dovrebbero ricevere subito una terapia combinata statina-ezetimibe.

L'indicazione della società, descritta in un documento di orientamento pratico presentato in occasione del congresso, sottolinea che, anche con la terapia con statine ad alta intensità, i pazienti ottengono una riduzione dei livelli di colesterolo LDL (C-LDL) di circa il 50%, che per molti non è sufficiente a raggiungere i nuovi rigorosi obiettivi delle linee guida.

I medici dovrebbero determinare alla

prima visita se il loro paziente, se non già in terapia con una statina, potrà raggiungere il suo obiettivo con quel farmaco da solo o se è necessario iniziare immediatamente con la combinazione.

Il documento, che mira a offrire spunti pratici per implementare le linee guida 2019 ESC/EAS per la gestione delle dislipidemie, è stata pubblicata il 12 aprile su Atherosclerosis.

Colesterolo remnant fortemente collegato a un aumento di cinque volte del rischio di PAD

Livelli elevati di colesterolo *remnant* sono associati a un rischio sostanzialmente aumentato di sviluppare arteriopatia periferica (PAD).

Sono stati studiati i dati del Copenhagen General Population Study, inclusi 106.937 soggetti in cui sono stati registrati 1586 eventi fino al 2018, confrontando i risultati con quelli del Copenhagen City Heart Study, da cui sono stati inclusi 13.974 individui e 1033 eventi.

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

Rispetto ai livelli di colesterolo *remnant* inferiori a 0,5 mmol/L, l'HR per PAD per livelli da 0,50 a 0,99 mmol/L era 2,0 (95% CI 1,5-2,7), salendo a 3,1 (95% CI 2,1-4,4) per livelli da 1,00 a 1,49 mmol/L e a 5,0 (95% CI 3,2-7,9) per livelli di almeno 1,50 mmol/L (p per il trend, 1×10^{-15}).

L'incremento del rischio di PAD era superiore a quello osservato per infarto miocardico e ictus ischemico: per l'infarto miocardico, i risultati corrispondenti variavano da un HR di 1,8 (95% CI 1,4-2,3) a 4,0 (95% CI 2,7-5,8) (p per il trend 5×10^{-19}), mentre quelli per ictus ischemico variava da 1,3 (95% CI 1,1-1,6) a 2,0 (95% CI 1,4-2,7) (p per il trend 3×10^{-4}).

Dati di *real word* sull'uso degli inibitori di PCSK9 nei pazienti con FH

I pazienti con ipercolesterolemia familiare (FH), in particolare quelli con FH eterozigote, raggiungono gli obiettivi di C-LDL con evolocumab e li mantengono a 2 anni. Tuttavia, i risultati dello studio *real word* HEYMANS in più di 800 pazienti con FH, hanno anche mostrato che circa la metà non era in terapia con statine quando ha iniziato il farmaco, nonostante avesse alti livelli basali di C-LDL. Questo sembra essere strettamente legato alle soglie fissate dai diversi contesti nazionali per l'accesso agli inibitori di PCSK9 in regime di rimborso. Se queste soglie sono troppo restrittive, è possibile che una sostanziale porzione della popolazione ad alto rischio cardiovascolare abbia, grazie alla terapia con statine, livelli di C-LDL ridotti non abbastanza da raggiungere gli obiettivi indicati dalle linee guida, ma sufficienti per non essere eleggibili al trattamento con gli anticorpi monoclonali.

I ricercatori hanno ribadito che la protezione cardiovascolare osservata nei *trial*

può essere raggiunta solo rispettando gli obiettivi lipidici indicati dalle linee guida. Considerando che la popolazione generale è estremamente diversa da quella arruolata negli studi clinici, è fondamentale capire il tasso di raggiungimento di tali obiettivi in *real life*.

Dati di *real word* sull'uso di lomitapide nei pazienti con FH omozigote

Lomitapide, inibitore selettivo della proteina microsomiale di trasporto dei trigliceridi (MTP), è un'opzione terapeutica efficace per i pazienti affetti da FH omozigote. Uno studio *real word* su 75 pazienti trattati con lomitapide in 9 Paesi europei ha mostrato che, a 24 mesi, i livelli mediani di C-LDL erano diminuiti di 110 mg/dl, corrispondenti a una riduzione del 61%; il 65% dei pazienti ha ottenuto una riduzione $\geq 50\%$ del C-LDL. Gli effetti avversi hanno interessato oltre il 50% dei soggetti trattati, determinando l'interruzione del farmaco nel 13% dei pazienti della coorte.

La semplice valutazione del rischio prevede eventi ischemici post-PCI

Il rischio di un paziente per eventi ischemici, ma non sanguinamento, dopo intervento coronarico percutaneo (PCI) può essere previsto semplicemente in base al fatto che abbia uno o più criteri di rischio.

Lo studio, su più di 10.000 pazienti PCI, ha mostrato che avere almeno un fattore di alto rischio, in base all'anamnesi del paziente, alle condizioni di comorbidità e alle caratteristiche della procedura PCI, era associato a un aumentato rischio di fallimento del vaso target del 48% e del 44% per un esito composito di morte per tutte le cause, qualsiasi infarto del miocardio o qualsiasi rivascolarizzazione.

L'aferesi delle lipoproteine mostra un impatto duraturo sugli esiti CV

L'aferesi delle lipoproteine è un trattamento sicuro ed efficace per la dislipidemia ad altissimo rischio, riducendo in modo sostenibile i livelli di colesterolo e delle lipoproteine aterogene e abbassando notevolmente i tassi di eventi cardiovascolari e non cardiovascolari.

Sono stati esaminati più di 2000 pazienti con dislipidemia dal registro tedesco di aferesi delle lipoproteine (GLAR). L'aferesi non solo riduceva i livelli di C-LDL e di lipoproteina (a) di circa il 70%, ma anche i tassi di eventi cardiovascolari del 79% nei 2 anni successivi all'inizio del trattamento.

Anticorpi anti ApoA-I: un link tra steatosi epatica e malattie cardiovascolari?

Gli anticorpi anti-apolipoproteina A-1 (ApoA-1) sono comuni nella steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e potrebbero non solo guidarne lo sviluppo, ma anche essere

alla base del legame tra NAFLD e malattie cardiovascolari.

In un'analisi clinica e una serie di esperimenti, è emerso che quasi la metà dei 137 pazienti con NAFLD erano sieropositivi e che gli anticorpi erano associati a un aumento dell'accumulo di lipidi nel fegato, un alterato metabolismo dei trigliceridi e ad effetti pro-infiammatori sulle cellule epatiche.

Gli anticorpi anti ApoA-1, diretti contro la principale frazione proteica delle HDL, sono predittori indipendenti di eventi cardiovascolari nelle popolazioni ad alto rischio. Sono anche associati in modo indipendente con le malattie cardiovascolari nella popolazione generale, così come con la vulnerabilità della placca aterosclerotica sia nei topi che nell'uomo.

Gli anticorpi anti ApoA-1 hanno un ruolo metabolico *in vivo* e hanno dimostrato *in vitro* di interferire con il metabolismo del colesterolo, promuovendo la formazione di cellule schiumose. Gli studi hanno anche indicato che svolgono un ruolo nella fibrosi epatica, prevedendo lo sviluppo della cirrosi in individui con infezione cronica da epatite C.



The poster features a central image of a cross-section of an artery with red blood cells, overlaid with a digital grid and binary code. The text is arranged in the upper right and lower right areas, with the SISA logo in the lower left.

**35° CONGRESSO
NAZIONALE
SISA**

**VIRTUAL EDITION
LIVE STREAMING
28-30 NOVEMBRE 2021
ON DEMAND
28 NOVEMBRE 2021
28 FEBBRAIO 2022**

**SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ATEROSCLEROSI**

Il 35° Congresso Nazionale della Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA) quest'anno si svolgerà dal 28 al 30 novembre nella modalità Web Conference durante la quale si alterneranno sessioni *live streaming* ed altre *On-Demand*. Come consuetudine, il Congresso affronterà, con il coinvolgimento dei maggiori esperti italiani, gli argomenti di maggiore attualità ed interesse scientifico nell'ambito delle patologie cardiovascolari su base ateromassica. In particolare, il Congresso prevede lo svolgimento di un Simposio dedicato alle strategie da adottare per la valutazione delle principali alterazioni del metabolismo lipidico presenti in età pediatrica ed una Tavola Rotonda, congiunta con la SIBIOC, per fornire le indicazioni per compiere le scelte più appropriate tra i diversi parametri di laboratorio utili alla valutazione

e stratificazione del rischio cardiovascolare. Sempre nell'ambito delle attività inter-societarie della SISA, è previsto lo svolgimento di un Workshop di Lipidologia Clinica, in collaborazione con la società ANMCO, per condividere le più idonee strategie clinico-diagnostiche da adottare in alcuni quadri dislipidemici frequenti nei pazienti ad alto o altissimo rischio cardiovascolare, come ad es. l'ipercolesterolemia familiare o quella nelle donne e nel paziente anziano. Un'altra tematica che quest'anno riceverà ampio spazio sarà quella rappresentata dal ruolo dei meccanismi della trombosi nel condizionare il rischio cardiovascolare. Nel corso della trattazione di questo tema saranno esaminati in dettaglio i meccanismi di adattamento alla terapia anti-piastrinica e quali possono essere le migliori raccomandazioni per personaliz-

zare la scelta della terapia antitrombotica. Un tema che riceverà una specifica attenzione in due sessioni *live streaming* sarà anche quello relativo alla prevenzione cardiovascolare in era COVID e post-COVID, anche attraverso l'esame dettagliato dei possibili meccanismi fisiopatologici attraverso cui le malattie infettive (compresa quella causata dal SARS-Cov-2) possono favorire il danno vascolare. Ampio spazio sarà inoltre dedicato a discutere i risultati più recenti dell'uso degli inibitori della proteina PCSK9 nella prevenzione delle complicanze ischemiche. In particolare, nel corso del Congresso si svolgerà, grazie anche alla partecipazione di ricercatori dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), la presentazione per la prima volta dei dati relativi all'impiego e all'efficacia di questi farmaci in Italia. Sarà un momento importante per fare il punto circa l'uso di questa terapia nella pratica clinica quotidiana. Altre sessioni *live* saranno dedicate all'esame di alcuni temi di grande attualità, come quello rappresentato dall'efficacia degli acidi grassi omega-3 nella prevenzione cardiovascolare o quello relativo alla importanza della misurazione e, eventualmente, del trattamento di livelli elevati di Lp(a). Inoltre, nel corso del Congresso si svolgeranno letture e seminari volti a fare il punto sulla diagnosi e sul trattamento di alcune dislipidemie rare, ma gravate da gravi complicanze, come la ipercolesterolemia familiare omozigote e la sindrome chilomicronemica familiare. A queste malattie la comunità medica

e scientifica della SISA sta dedicando in questi anni una particolare attenzione con progetti scientifici dedicati che hanno raccolto un vasto consenso nella letteratura internazionale. Ampio spazio sarà inoltre dedicato a discutere non solo gli aspetti più innovativi ed avanzati delle terapie farmacologiche anti-aterosclerosi (ad es. acido bempedoico, inclirisan, inibitori ANGPTL3), ma anche tutti quegli aspetti che hanno un grande rilievo nella pratica clinica, come l'importanza della terapia di associazione nella cura dei pazienti affetti da molteplici fattori di rischio (ad es. ipertensione e ipercolesterolemia) oppure quelli relativi alle strategie per migliorare l'aderenza alla terapia. Infine, sempre nel corso di sessioni *live*, saranno affrontati altri temi importanti, come quello rappresentato dal ruolo dell'obesità nel favorire le malattie cardiovascolari, con una attenzione dedicata ai progressi che si stanno compiendo negli approcci farmacologici a questa diffusissima condizione clinica. In questo contesto, il Congresso Nazionale della SISA sarà anche l'occasione per offrire un tempestivo aggiornamento dei partecipanti attraverso la sessione denominata le Ultime Notizie in Aterosclerosi, in cui un gruppo di esperti selezionerà e presenterà le scoperte scientifiche apparse nella letteratura nei giorni immediatamente precedenti allo svolgimento del Congresso.

Buon lavoro!

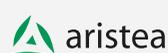
Marcello Arca
Presidente SISA

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

