



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Dipartimento di Medicina-DIMED**

**Direttore: Prof. Fabrizio FABRIS**

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Cliniche e Sperimentali

CURRICOLO: Scienze Ematologiche e Geriatriche

CICLO XXXI°

TITOLO TESI

**IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE:  
DAL GENOTIPO AL FENOTIPO  
ED IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEI NUOVI FARMACI  
BIOLOGICI IPOCOLESTEROLEMIZZANTI**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Paolo ANGELI

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Alberto ZAMBON

**Co-Supervisore:** Dr.ssa Sabina ZAMBON

**Dottoranda:** Dr.ssa Paola BIGOLIN

Anno Accademico 2017-2018



# INDICE

RIASSUNTO .....	1
ABSTRACT .....	4
I - INTRODUZIONE .....	6
1. DISLIPIDEMIE FAMILIARI .....	6
2. IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE .....	8
2.1 Epidemiologia .....	8
2.2 Fisiopatologia e genetica .....	11
2.2.1 Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH) .....	15
2.2.2 Le classi di fenotipi difettivi .....	17
2.2.3 Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva (ARH) .....	20
2.2.4 Mutazioni Italiane del recettore delle LDL .....	21
2.3 LDL ossidate .....	27
2.4 Genesi della placca aterosclerotica .....	28
2.5 Diagnosi .....	31
2.6 Rischio cardiovascolare .....	34
2.7 Valutazione del danno preclinico .....	36
2.8 Xantomi del tendine di Achille .....	37
2.9 Screening a cascata .....	39
2.10 Trattamento .....	43
2.10.2 Statine .....	45
2.10.2 Ezetimibe .....	50
2.10.3 Resine sequestranti acidi biliari .....	50
2.10.4 LDL-afèresi .....	51
2.10.5 I nuovi farmaci ipolipemizzanti .....	52
II - SCOPI DELLA TESI .....	67
III - MATERIALI E METODI .....	68
1. Soggetti .....	68
2. Metodi .....	68

3. Misure antropometriche .....	68
4. Prelievo Buffy Coat per l'estrazione del DNA .....	69
4.1 Diagnosi molecolare .....	69
5. Parametri bioumorali .....	71
5.1 Determinazione LDL ossidate .....	71
6. Valutazione ecografica .....	72
6.1 Ecografia tendini di Achille .....	73
6.2 Ecografia carotidea .....	73
7. Terapia con inibitori anti PCSK9 .....	74
7.1 Modalità di somministrazione degli inibitori di PCSK9 .....	75
7.2 Efficacia e sicurezza .....	76
8. Analisi statistica .....	76
IV - RISULTATI .....	78
V - DISCUSSIONE .....	118
VI - CONCLUSIONI .....	128
VII - BIBLIOGRAFIA .....	130

## RIASSUNTO

**INTRODUZIONE e SCOPI dello STUDIO:** L'Ipercolesterolemia Familiare (FH) è un disordine del metabolismo lipidico su base genetica, rara in omozigosi (1/250000) ma coinvolgente 1 soggetto ogni 250 abitanti nella forma eterozigote. Il fenotipo lipidico è caratterizzato da livelli molto elevati di colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL) dalla nascita e da un rischio elevato di aterosclerosi che predispone ad eventi clinici cardiovascolari (CHD) precoci.

La FH è causata da mutazioni nei geni che codificano per proteine chiave coinvolte nelle vie metaboliche che riguardano il recettore delle LDL (LDL-R) e il suo ciclo metabolico, con conseguente diminuzione dell'uptake cellulare delle LDL e conseguente aumento delle concentrazioni plasmatiche del colesterolo LDL (LDL-C). Tra i geni coinvolti sono note mutazioni con perdita di funzione nel gene LDLR, mutazioni nel gene dell'apolipoproteina B (ApoB) che alterano il dominio di legame dell'ApoB con LDL-R, mutazioni con guadagno di funzione nel gene per la proteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9).

Tra le mutazioni del LDL-R si riconoscono cinque classi funzionali, una delle quali è chiamata allele nullo e normalmente determina un difetto nella sintesi del recettore con conseguente funzione recettoriale quasi completamente abolita (<5% rispetto alla norma). Le restanti sono legate un'alterata sintesi della proteina dovuta ad alterazioni della sequenza amminoacidica che comporta difetti nel trasporto del recettore, nel legame tra ligando e recettore, nella localizzazione dello stesso a livello della superficie cellulare e infine nel riciclaggio.

Allo scopo di stabilire una diagnosi clinica, sono raccomandati i criteri del Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) che permettono di fare diagnosi di FH considerando cinque aspetti anamnestici, clinici e biochimici.

La formazione precoce di gerontoxon, xantelasma e xantomi sono markers clinici suggestivi per indirizzare verso la diagnosi di FH. L'utilizzo dell'ecografia consente di valutare con maggiore accuratezza lo spessore tendineo, aumentato nel caso in cui siano presenti accumuli lipidici. Dal momento che il tendine di Achille si è rivelato essere la più comune localizzazione per lo sviluppo di xantomi, la valutazione ecografica di questo distretto consente di aumentare notevolmente la sensibilità (fino al 75%) nella diagnosi di FH, a discapito di una relativa perdita di specificità nei confronti di altre forme di ipercolesterolemia.

Con l'avvento degli inibitori di PCSK9 come terapia aggiuntiva a una terapia ipolipemizzante massimale, si è osservata una riduzione significativa dei livelli di colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL-C) e degli eventi cardiovascolari, mantenendo un buon profilo di sicurezza e tolleranza.

In tale contesto si inserisce il nostro studio con la valutazione della mappatura genetica dell'Ipercolesterolemia Familiare in relazione al fenotipo clinico, l'approfondimento dell'utilità dell'impiego dell'ecografia dei tendini achillei come strumento di approfondimento diagnostico, l'analisi di dati di efficacia e sicurezza della terapia addizionale con inibitori di PCSK9.

**SOGGETTI e METODI:** 194 soggetti con diagnosi possibile, probabile o certa di FH, in accordo con i criteri del DLCN, sono stati sottoposti a screening genetico e valutazione delle caratteristiche cliniche e bioumorali; di 168 pazienti (pz) ad ora è disponibile il risultato dello screening genetico; 101 pz sono stati sottoposti ad ecografia bilaterale dei tendini achillei; gli xantomi ecografici sono stati definiti come presenza di uno spessore tendineo  $>6,15$  mm in almeno un tendine e/o presenza di formazioni ipoecogene; 20 pazienti con FH eterozigote in trattamento con nuovi farmaci biologici ipocolesterolemizzanti (inibitori PCSK9).

**RISULTATI:** Dei 168 pz con risultato dello screening genetico in particolare 105 pz presentavano mutazione del gene per il recettore delle LDL in forma eterozigote, di cui 43 portatori di allele nullo (NA) e 62 di allele difettivo (DEF); in 33 pz non sono state individuate mutazioni per FH (NM). La prevalenza di xantomi obiettivi e gerontoxon, insieme ai livelli di colesterolo totale e LDL basali sono risultati significativamente maggiori nei soggetti NA rispetto agli altri sottogruppi (xantomi obiettivi: NA vs DEF vs NM 71,4 vs 48,5 vs 30,7 %:  $p<0,001$  Anova; LDL: NA vs DEF vs NM  $326,5\pm 97,7$  vs  $316,9\pm 93,9$  vs  $211,1\pm 76,3$  mg/dl:  $p<0,001$  Anova).

Dei 101 pazienti di cui si disponeva del risultato degli esami bioumorali e dell'ecografia tendinea la prevalenza di xantomi obiettivi e gerontoxon, insieme ai livelli di colesterolo totale e LDL basali sono risultati significativamente maggiori nei soggetti NA rispetto agli altri sottogruppi (xantomi obiettivi: NA vs DEF vs NM 26,1 vs 13,8 vs 0,0 %:  $p=0,054$  Anova; LDL: NA vs DEF vs NM  $316\pm 117$  vs  $321\pm 109$  vs  $199\pm 44$  mg/dl:  $p<0,001$  Anova). Lo spessore dei tendini achillei è risultato significativamente diverso tra i tre gruppi (NA vs DEF vs NM  $7,64\pm 2,06$  vs  $7,65\pm 4,02$  vs  $5,67\pm 0,75$  mm:  $p<0,005$  Anova) e la prevalenza di xantomi ecografici era del 78,2%, 72,4% e 31,6% nei soggetti portatori di NA, DEF e NM rispettivamente ( $p=0,002$ ). Il solo esame obiettivo rilevava la presenza di xantomi tendinei achillei nel 10,2% dei soggetti, mentre l'ecografia tendinea rivelava una prevalenza di lesioni tendinee pari al 51%.

Nell'ambito dei 74 pz sottoposti ad ecografia dei tendini achillei di cui si dispone attualmente del risultato dello screening genetico, sono stati considerati i 52 pz con mutazioni responsabili di FH; tra questi 36 pz avevano una diagnosi clinica certa di FH secondo i criteri DLCN (punteggio  $>8$ ), mentre vi erano 16 pz con diagnosi possibile (punteggio tra 3 e 5) o probabile (punteggio tra 6 e 8). Di questi 16 pz 1 mostrava xantomi evidenziabili clinicamente mentre 10 presentavano lo xantoma ecografico.

Nel sottogruppo dei 20 pz trattati con PCSK9, in seguito all'aggiunta di trattamento con inibitori di PCSK9 si è ottenuta, rispetto al trattamento ipolipemizzante tradizionale massimale, una riduzione media dei livelli di LDL-C da  $169 \pm 30$  mg/dl a  $46 \pm 16$ , ossia in termini percentuali una riduzione del 72,4% (valore minimo 41,5% e massimo 87,5%). Rispetto ai livelli basali di LDL-C, ciò corrisponde a una riduzione media pari all'86,9%. Non sono emerse differenze statisticamente significative tra il trattamento con evolocumab e quello con alirocumab in termini di riduzione dei livelli di LDL-C. In corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale si otteneva l'obiettivo di colesterolo delle LDL previsto in base al personale livello di rischio cardiovascolare nello 0% dei casi, mentre con l'aggiunta della terapia con inibitori di PCSK9 il 100% dei soggetti raggiungeva l'obiettivo terapeutico. Non si sono dimostrate differenze statisticamente significative in seguito all'introduzione del trattamento con inibitori di PCSK9 per quanto

riguarda i livelli di CPK e di transaminasi. Nel corso degli anni abbiamo osservato che i livelli di LDL-C si mantenevano sostanzialmente stabili.

### **CONCLUSIONI:**

La caratterizzazione genotipica funzionale si conferma essere associata a fenotipi clinici diversi, anche in termini di spessori tendinei e prevalenza di xantomi ecografici, confermando come il paziente con allele nullo presenti una maggiore aggressività clinica della patologia.

L'ecografia del tendine di Achille risulta più sensibile rispetto all'esame obiettivo classico, rilevando una prevalenza di xantomi tendinei notevolmente maggiore rispetto a quella rilevata mediante il solo esame obiettivo. Tale esame consente di guardare in modo integrato alle complicanze tendinee e vascolari nel singolo paziente, suggerendo, ove siano presenti xantomi, un trattamento ipolipemizzante più intensivo.

I risultati preliminari di questo studio suggeriscono inoltre come l'ecografia dei tendini di Achille possa essere uno strumento da considerare nell'aiutare a riclassificare quei pazienti per in cui il DLCN score è compatibile con diagnosi possibile o probabile di FH. Tale strumento potrebbe inoltre rivelarsi un valido alleato per il clinico, aiutandolo nel raggiungimento di una diagnosi sempre più precoce, ed una garanzia per il paziente di ricevere quanto prima il trattamento farmacologico più adeguato alla sua fascia di rischio.

L'utilizzo degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9, evolocumab ed alirocumab, rappresenta un approccio terapeutico innovativo, caratterizzato da elevato profilo di sicurezza ed altamente efficace in associazione alla terapia massimale attualmente disponibile nei pazienti eterozigoti per FH. Ulteriori studi sono necessari per confermare principalmente la persistenza di efficacia e sicurezza a lungo termine della terapia con inibitori di PCSK9 e per valutare su larga scala se vi siano differenze tra evolocumab e alirocumab in termini di efficacia nella riduzione dei livelli di LDL-C e del rischio cardiovascolare.

## ABSTRACT

**AIMS:** Familial Hypercholesterolemia (FH) is a frequent genetic cause of early coronary artery disease, and is still under-diagnosed and under-treated. With the advent of PCSK9 inhibitors as adjunctive therapy to maximal lipid-lowering therapy, a significant reduction in cholesterol levels of low-density lipoprotein (LDL-C) and cardiovascular events was observed, while maintaining a good safety and tolerance profile. Ultrasonography (US) detects Achilles tendon (AT) xanthomas in patients (pts) with FH. Given the recent introduction of new therapies, there are no studies in the literature that evaluate the efficacy and safety of this therapy over a period of more than 3 years.

We analysed the potential associations between FH genotype, clinical phenotype and ultrasonographic AT findings, evaluating the contribution of AT US to identify individuals with an FH-causing mutation. We also analysed the long-term efficacy and safety of additional therapy with PCSK9 inhibitors, comparing treatment with evolocumab and that with alirocumab.

**SUBJECTS AND METHODS:** Genetic screening, clinical and biochemical parameters in 194 pts with possible, probable or definite clinical diagnosis of FH according to the Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS); 71 pts underwent bilateral AT US.

**RESULTS:** 43 pts carriers of null allele (NA) and 62 of defective (DEF) allele for LDL receptor while 33 pts with no known mutations (NM) for FH. Presence of xanthomas and gerontoxon, total and LDL-cholesterol (NA vs DEF vs NM:  $326.5 \pm 97.7$  mg/dl,  $316.9 \pm 93.9$  mg/dl,  $211.1 \pm 76.3$  mg/dl,  $p < 0.000$ ) at diagnosis were significantly higher in NA pts than other subgroups. AT thickness was significantly different among the three groups ( $p < 0,005$ ) and 78.2%, 72.4% and 31.6% had USX in NA, DEF and NM carriers respectively ( $p = 0.002$ ).

Among the 52 pts positive for FH-causing mutations, 16 pts had a clinical diagnosis either possible or probable and in nine pts the presence of USX was clinically undetected and thereby not considered for DLCNS calculation. Tendon ultrasound was able to show a prevalence of 51% of tendon xanthomas in comparison to the prevalence of alterations detected only by physical examination, which was 10,2%.

Following the addition of treatment with PCSK9 inhibitors, a mean reduction in LDL-C levels from  $169 \pm 30$  mg / dl to  $46 \pm 16$  was obtained, compared to the traditional maximal lipid-lowering treatment, ie in percentage terms a reduction of 72.4%. Compared to baseline LDL-C levels, this corresponds to an average reduction of 86.9%. There were no statistically significant differences between treatment with evolocumab and that with alirocumab in terms of reduction of LDL-C levels. In the course of traditional maximal lipid-lowering therapy, the goal of LDL cholesterol was obtained based on the personal level of cardiovascular risk in 0% of cases, while with the addition of PCSK9 inhibitors, 100% of subjects achieved therapeutic goal. No statistically significant differences were found following the introduction of PCSK9 inhibitor treatment with regard to CPK and transaminase levels. Over the years we have observed that LDL-C levels remained substantially stable.



**CONCLUSIONS:** Genotypic functional characterization is associated with different phenotypic clinical features, AT thickness and presence of US xanthomas. AT ultrasonography may help reclassifying as definite FH, patients with DLCN score of possible/probable FH. Achilles tendon ultrasound has a greater sensibility than standard physical exam. It discloses a noticeable higher prevalence of tendon xanthomas (51%) in comparison to clinical evaluation (10,2%). This exam allows to look in a more integrated way at the cardiovascular and tendon complications in everyeach patient. It also suggests, when xanthomas are found, the necessity to adopt a stronger lipid-lowering therapy.

In our study, in subjects with FH, it emerged that PCSK9 inhibitor therapy (evolocumab or alirocumab), in addition to maximal lipid-lowering therapy, results in a significant reduction of LDL-C levels, allowing the totality of patients to achieve the therapeutic goal of LDL-C related to its cardiovascular risk. Further studies are needed to confirm mainly the persistence of long-term efficacy and safety of PCSK9 inhibitor therapy and to evaluate on a larger scale whether there are differences between evolocumab and alirocumab in terms of efficacy in reducing LDL-C and cardiovascular risk.

# INTRODUZIONE

## 1\_ LE DISLIPIDEMIE GENETICHE

Le Dislipidemie Genetiche comprendono un gruppo di malattie eredo-familiari causate da mutazioni in geni che codificano proteine che svolgono funzioni diverse nel complesso sistema di sintesi, trasporto e metabolismo delle lipoproteine plasmatiche.

La classificazione classica delle Iperlipoproteinemie in cinque tipi è stata superata dallo sviluppo della biologia e della genetica molecolare, che hanno permesso l'identificazione di molteplici mutazioni responsabili dei vari fenotipi di malattia.

I progressi delle metodologie di biologia molecolare applicate alla diagnostica hanno dimostrato come uno stesso fenotipo clinico - es. l'ipercolesterolemia familiare- sia espressione di difetti molecolari diversi e quindi di entità nosografiche differenti.

Le Dislipidemie Genetiche vengono spesso considerate malattie rare, tuttavia alcune di esse, le ipercolesterolemie familiari e la iperlipidemia familiare combinata, interessano nel nostro Paese un numero di soggetti che in base alle stime di frequenza supera il milione di individui.

Alcune di esse conferiscono un elevato rischio di eventi cardiovascolari, mentre altre sono associate a presentazioni cliniche di interesse pediatrico, internistico, neurologico e gastroenterologico.

La frequenza e la rilevanza clinica di queste patologie sono tali da giustificare un importante sforzo teso ad identificare i soggetti affetti ed i loro familiari nell'ambito della comunità. Sfortunatamente il non sempre agevole riconoscimento di questa patologia e la non ottimale consapevolezza del problema comportano una sottostima della reale prevalenza di queste forme.

Nella *Tabella I* sono elencate le stime di prevalenza delle varie forme di Dislipidemia Genetica; in corsivo quelle per le quali non è ad oggi noto il gene responsabile. Il numero totale di soggetti portatori di una delle varie patologie è stimabile essere compreso tra 1 e 2 milioni di individui. Dalla *Tabella I* risulta chiaro come per molte di queste forme non esistono dati solidi sulla prevalenza

nel nostro paese.

L'identificazione di queste patologie, largamente inferiore all'atteso, ha particolare rilevanza in quanto l'elevato rischio cardiovascolare interessa soggetti giovani o relativamente giovani, che risulterebbero a basso rischio se valutati solo in base alle carte o agli algoritmi di rischio italiani.

Poiché i pazienti che iniziano una terapia ipolipemizzante prima di sviluppare una malattia coronarica possono godere di un'aspettativa di vita normale se la patologia è ben gestita, la correttezza della diagnosi e l'appropriatezza del trattamento farmacologico diventano momenti fondamentali della cura di queste forme.

**Tabella I – Le cifre delle forme eredo-familiari in Italia.**

Le Ipercolesterolemie familiari	230.000
La Iperlipidemia familiare combinata	600.000-1.200000
La Iperlipoproteinemia Tipo III	10.000 (?)
Le Ipertrigliceridemie severe	200 (?)
Le Ipertrigliceridemie familiari	?
La Ipobetalipoproteinemia familiare	20.000
La Ipolipidemia combinata	?
La Abetalipoproteinemia & Chylomicron Retention Disease	50-100
Le Ipoalfalipoproteinemie familiari	?
La Iperalfalipoproteinemie familiari	?

## **2\_ IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE**

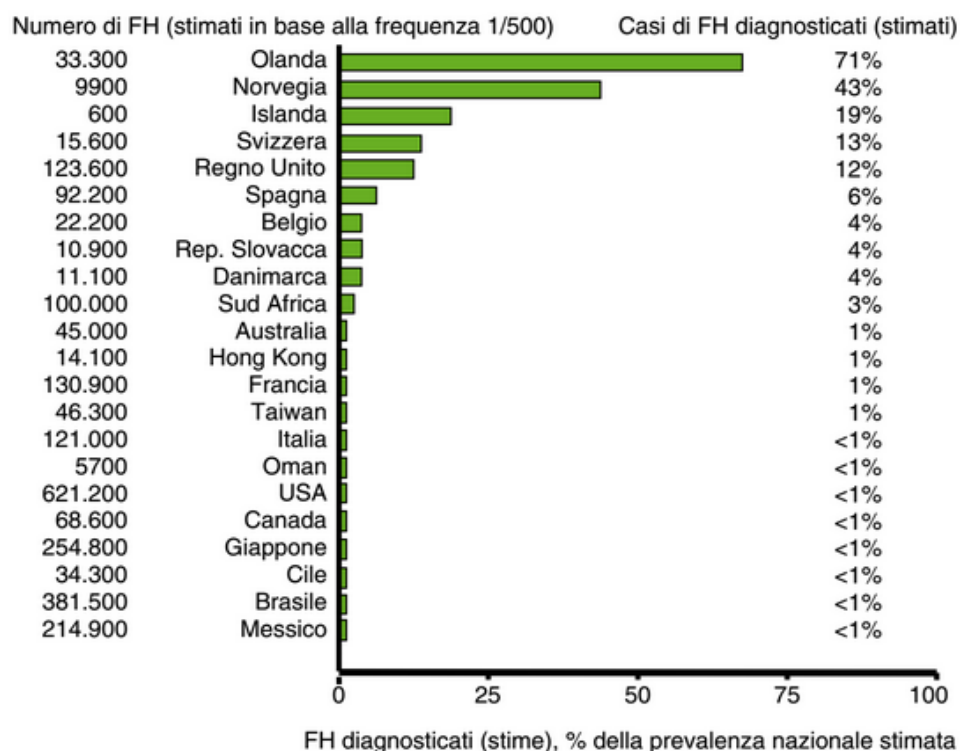
L'ipercolesterolemia Familiare (Familial Hypercolesterolaemia, FH) è una malattia genetica mendeliana che in omozigosi è molto rara, mentre in eterozigosi interessa, solo nel nostro Paese, un numero di individui che secondo le più recenti stime potrebbe raggiungere le 350000 unità.

La FH è una frequente causa genetica di malattia coronarica precoce (coronary heart disease, CHD), cioè infarto del miocardio e angina pectoris, a causa dell'esposizione per tutta la durata della vita a elevati livelli di colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (low-density lipoprotein, LDL) [1, 2]. Se non trattati, gli uomini e le donne con FH eterozigote con livelli di colesterolo di 8-15 mmol/L (310-580 mg/dL) sviluppano CHD rispettivamente prima dei 55 e dei 60 anni, mentre gli omozigoti con livelli di colesterolo di 12-30 mmol/L (460-1160 mg/dL) sviluppano CHD in età giovanile, e, se non vengono sottoposti a terapia, muoiono prima dei 20 anni. Tuttavia, una volta diagnosticati, gli eterozigoti possono essere efficacemente trattati con farmaci ipocolesterolemizzanti per attenuare lo sviluppo di aterosclerosi e prevenire la CHD. Infatti, se gli individui con FH eterozigote (HeFH) sono diagnosticati precocemente nella vita e sono efficacemente trattati con statine, il loro rischio di infarto miocardico si avvicina a quello della popolazione generale [3].

### **2.1 Epidemiologia**

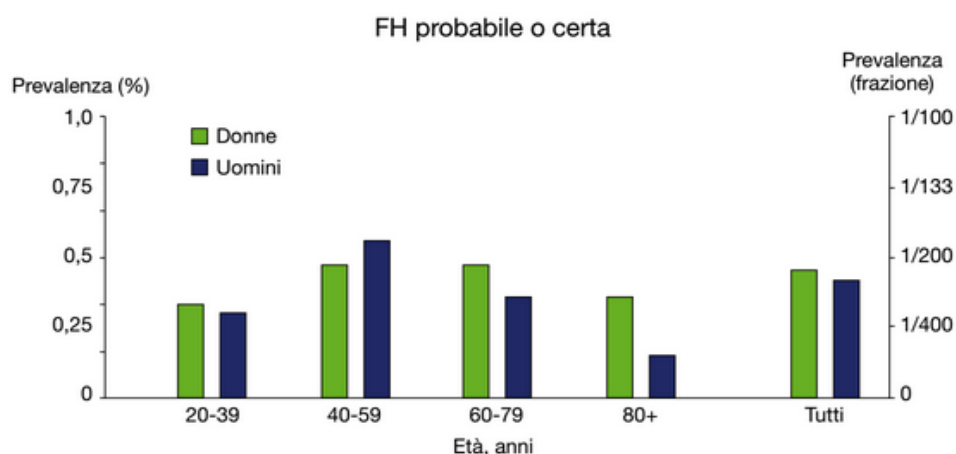
Il grado di sottostima e sottotrattamento di individui con FH nella popolazione generale è in gran parte sconosciuto. Si ritiene generalmente che tra i soggetti di razza bianca vi sia una prevalenza di FH eterozigote pari a 1/500 e di FH omozigote pari a 1/1.000.000 [1, 2]; studi recenti condotti in popolazioni nord-europee suggeriscono una reale prevalenza della FH eterozigote di 1/200- 1/250 individui [4]. In popolazioni particolari come i franco-canadesi di alcune aree del Quebec canadese, gli ebrei Ashkenaziti, i Libanesi, ed alcune popolazioni del Sud Africa, la prevalenza può raggiungere 1/100 individui. Nonostante i dati aggiornati sulla prevalenza dei pazienti con HeFH (1/200-250 individui) caratterizzino la FH come la malattia a trasmissione monogenica più frequente ad oggi conosciuta, tuttavia, questi individui nella maggior parte dei Paesi non vengono diagnosticati [5]. Inoltre, questa prevalenza stimata teoricamente

rappresenta probabilmente una sottostima, in quanto si basa sui tassi di prevalenza in campioni di pazienti ricoverati in ospedale e su registri di patologia, ed è influenzata dalla morte precoce nei pazienti con FH. Molti individui e famiglie con FH non sono identificati perché se affetti da CHD vengono considerati parte dell'enorme numero di persone con CHD, e di conseguenza sono sottodiagnosticati e quindi sottotrattati [6]. Tra circa 200 Paesi/aree geografiche in tutto il mondo, siamo in grado di ottenere una stima del numero di persone con diagnosi di FH solo nei 23 Paesi/aree geografiche indicati nella Figura 1. Le poche eccezioni positive sono il 71% diagnosticato nei Paesi Bassi, il 43% in Norvegia, il 19% in Islanda, il 13% in Svizzera, il 12% nel Regno Unito e il 6% in Spagna.



**Figura 1.** Percentuale di individui con diagnosi di FH in diversi Paesi/aree geografiche espressi come frazione dei soggetti teoricamente previsti essere affetti da FH sulla base di una frequenza di 1/500 nella popolazione generale. Poiché la maggior parte dei Paesi non ha registri validi a livello nazionale per la FH, le diverse cifre di questa figura rappresentano la miglior ipotesi da parte di medici/scienziati particolarmente interessati alla FH nei rispettivi Paesi. Dei circa 180 Paesi/aree geografiche restanti, non sono disponibili informazioni affidabili sul numero di individui con diagnosi di FH. I numeri in questa figura sono forniti da Michael Livingston, Steve E. Humphries (UK), Olivier S. Decamps (Belgio). Per il Belgio, 10.000 soggetti sono stati rimborsati per il trattamento della FH, ma solo circa 800 sono stati diagnosticati come FH tramite test genetici (quest'ultimo indicato in figura). Tratta da Averna et al [99].

Ad oggi la prevalenza di FH non è stata valutata direttamente in un campione non selezionato della popolazione generale. Utilizzando il Copenhagen General Population Study [4], un campione non selezionato della popolazione generale europea che comprende 69.016 partecipanti, la condizione di FH è stata diagnosticata sulla base dei criteri del Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) (Figura 2). La prevalenza di individui classificati con FH certa o FH probabile (criteri DLCNS con punteggio >5 punti) era pari a 0,73% (1/200) (Figura 4), con FH possibile (criteri DLCNS con punteggio 3-5 punti) 6,3% (1/16) e con FH improbabile (Criteri DLCNS <3 punti) 93% [4]. È interessante notare che la prevalenza di FH certa o probabile era simile per le donne e gli uomini di età inferiore ai 60 anni; al contrario, al di sopra dei 60 anni, più donne che uomini erano in questa categoria. Questi risultati suggeriscono che molti uomini con FH erano morti in età più giovane.



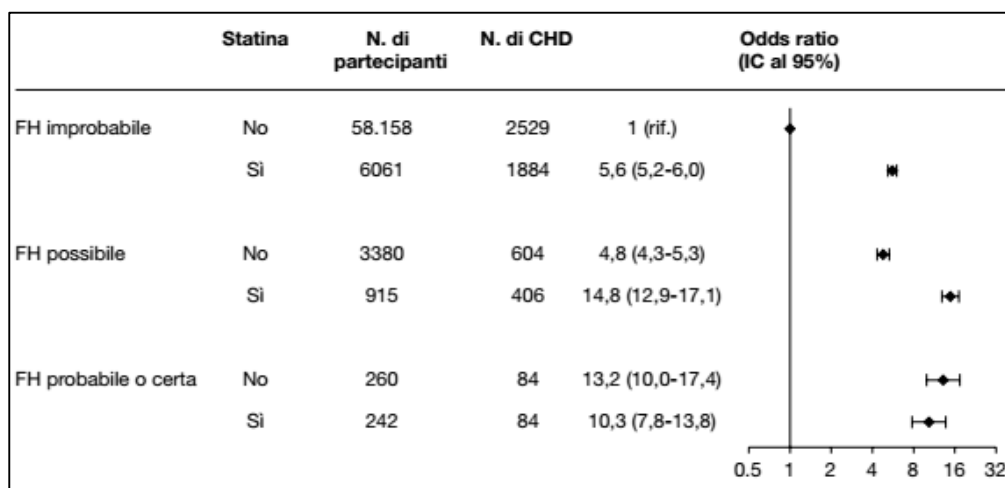
**Figura 2.** Prevalenza di FH certa o probabile secondo i criteri del Dutch Lipid Clinic Network nel Copenhagen General Population Study per classi di età di 20 anni e per sesso. Basato su 69.016 individui. Tratta da Averna et al [99].

Sulla base di estrapolazioni di queste prevalenze stimate fra 1/500-1/200, nel mondo tra 14 e 34 milioni di persone sarebbero affetti da FH; nella sola Europa si stima che questa condizione interessi tra 1,8 e 4,5 milioni di persone.

Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che la FH sia di gran lunga sotto-diagnosticata nella maggior parte dei Paesi.

Usando sempre il Copenhagen General Population Study [4], la prevalenza di CHD tra i partecipanti con FH certa/probabile era del 33% e solo il 48% dei

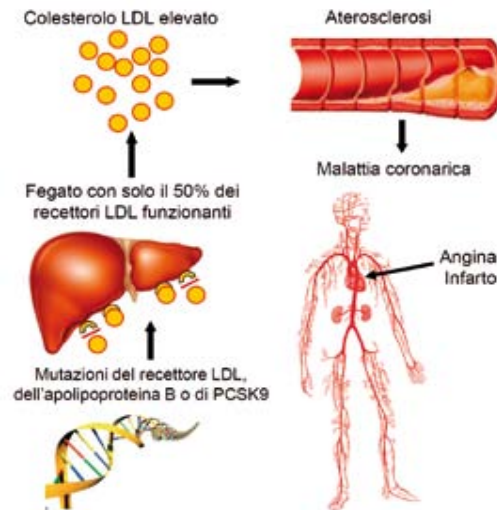
soggetti con FH riceveva statine. Dato preoccupante, il rischio di malattia coronarica era aumentato di 12 volte (IC 95% 9-16-volte) in individui con FH certa/probabile che non erano in trattamento con statine (Figura 3). Il corrispondente aumento del rischio relativo di malattia coronarica nei soggetti con FH trattati con statine era aumentato di 9 volte (IC 95% 7-13 volte). Queste osservazioni suggeriscono che le dosi di statine erano insufficienti nel ridurre la colesterolemia in modo efficace, e che la terapia con statine era stata instaurata troppo tardi nella vita, in un momento in cui si era già sviluppata una grave aterosclerosi.



**Figura 3.** Rischio di malattia coronarica in funzione dei criteri del Dutch Lipid Clinic Network per la diagnosi di FH in soggetti in o senza trattamento con statine nella popolazione generale. Basato su 69.016 individui dal Copenhagen General Population Study. Gli odds ratio sono stati aggiustati per età, sesso, indice di massa corporea, ipertensione, sindrome metabolica, diabete e fumo. IC = intervallo di confidenza; FH = ipercolesterolemia familiare; CHD = arteriopatia coronarica = malattia ischemica coronarica. (Adattato da Benn et al. [4], tratto da Averna et al. [99]).

## 2.2 Fisiopatologie e Genetica

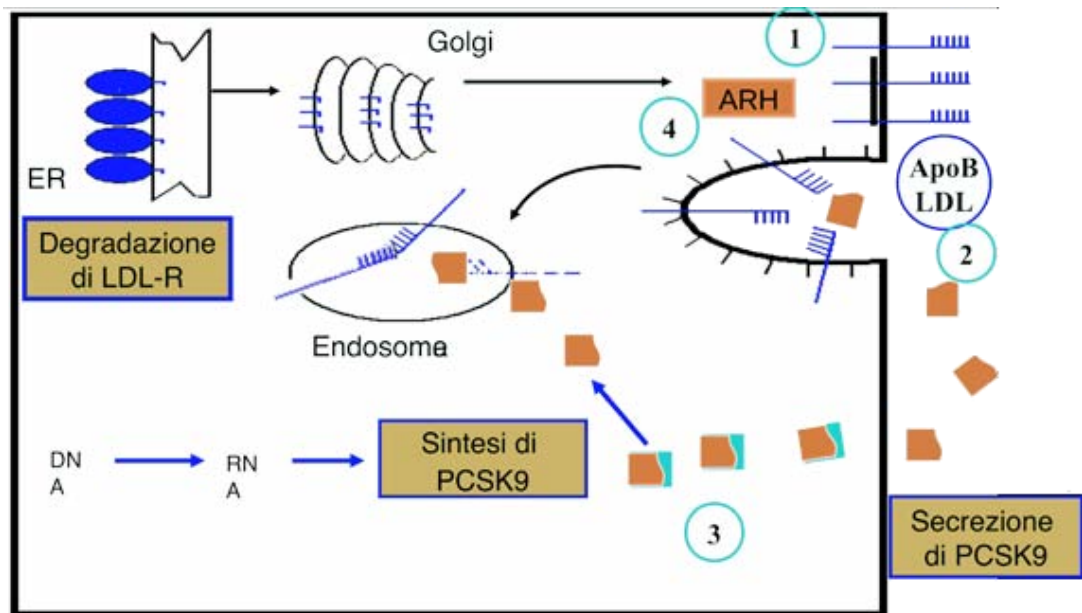
La FH è causata da mutazioni nei geni che codificano per proteine chiave coinvolte nelle vie metaboliche che riguardano il recettore delle LDL e il suo ciclo metabolico (LDL-R re-cycling), con conseguente diminuzione dell'uptake cellulare delle LDL e conseguente aumento delle concentrazioni plasmatiche del colesterolo LDL [1] (Figura 4).



**Figura 4.** Fisiopatologia della FH eterozigote. LDL=low density lipoprotein; PCSK9= proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; FH= familial hypercolesterolaemia. Tratto da Aversa et al. [99].

All'interno degli epatociti, il colesterolo viene riciclato ovvero sintetizzato ex novo, attraverso una via sintetica in cui la reazione limitante è catalizzata dall'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi (HMG CoA reduttasi), enzima che viene inibito dai principali farmaci ipocolesterolemizzanti come le statine. Il colesterolo è incorporato in lipoproteine a densità molto bassa (Very Low Density Lipoproteins, VLDL) contenenti apolipoproteina B, cioè i precursori intravascolari delle LDL, che a loro volta trasportano la maggior parte del colesterolo dal fegato ai tessuti periferici. L'endocitosi delle LDL via apolipoproteina B da parte delle cellule periferiche e degli epatociti avviene attraverso il recettore delle LDL (LDLR) e una proteina adattatrice (LDLRAP). L'assenza di LDLRAP caratterizza un'altra forma di Ipercolesterolemia Familiare, cioè l'Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva (Autosomal Recessive Hypercholesterolemia, ARH) [7-9]. La maggior parte dei recettori delle LDL viene riutilizzata, cioè ritorna sulla superficie cellulare, e la proproteina convertasi subtilisin/kexin tipo 9 (PCSK9), complessata al recettore delle LDL, ne impedisce il riciclo intracellulare favorendone la degradazione e riducendo così il numero di recettori presenti sulla membrana cellulare (Figura 5).





**Figura 5.** Il sistema LDL-R e i meccanismi responsabili di ADH e ARH. 1: Mutazioni del gene LDLR. 2: Mutazioni del gene APOB. 3: Mutazioni del gene PCSK9. 4: Mutazioni del gene ARH. Tratto da Averna et al. [99].

Gli effetti potenzialmente fatali delle forme eterozigote e omozigote di FH sono legati al conseguente aumento del colesterolo delle LDL plasmatico, che causa la ritenzione di colesterolo da parte della parete arteriosa e la formazione di cellule schiumose all'interno dell'intima delle arterie, condizione che tipicamente progredisce ad aterosclerosi occlusiva con angina pectoris e/o rottura della placca con conseguente CHD (come ad esempio infarto del miocardio).

La FH eterozigote è causata da mutazioni (in eterozigosi) con perdita di funzione nel gene LDLR, da mutazioni (in eterozigosi) nel gene dell'apolipoproteina B (APOB) che alterano il dominio di legame dell'APOB con il recettore LDL, o da mutazioni, (in eterozigosi) con guadagno di funzione della proteina PCSK9 [10] (Figura 5). Attualmente in tutto il mondo, sono state documentate oltre 1200 mutazioni dell'LDLR [11]; queste modificano tutti i domini funzionali della proteina recettore e comprendono singole mutazioni nucleotidiche, variazioni del numero di copie e mutazioni di splicing in tutto il gene LDLR. Una singola mutazione, Arg3500Gln, è responsabile della maggior parte delle alterazioni causali in APOB, mentre sono state rilevate >20 mutazioni in PCSK9. Le mutazioni eterozigoti in LDLR, APOB e PCSK9 si trovano rispettivamente nel >90%, ~5% e ~1% rispettivamente dei soggetti FH eterozigote portatori di

mutazioni causative [2]. Mentre la prevalenza di mutazioni in APOB e PCSK9 varia geograficamente, quelle in LDLR sono la causa più comune di FH in tutti i Paesi studiati finora.

La FH omozigote deriva da mutazioni in omozigosi o più spesso da mutazioni in eterozigosi composta nei geni LDLR o ARH. Alcuni rari soggetti sono “doppi eterozigoti”, cioè hanno mutazioni in eterozigosi in due dei quattro geni di cui sopra, determinando di solito un fenotipo che è intermedio tra quello degli FH eterozigoti e degli FH omozigoti.

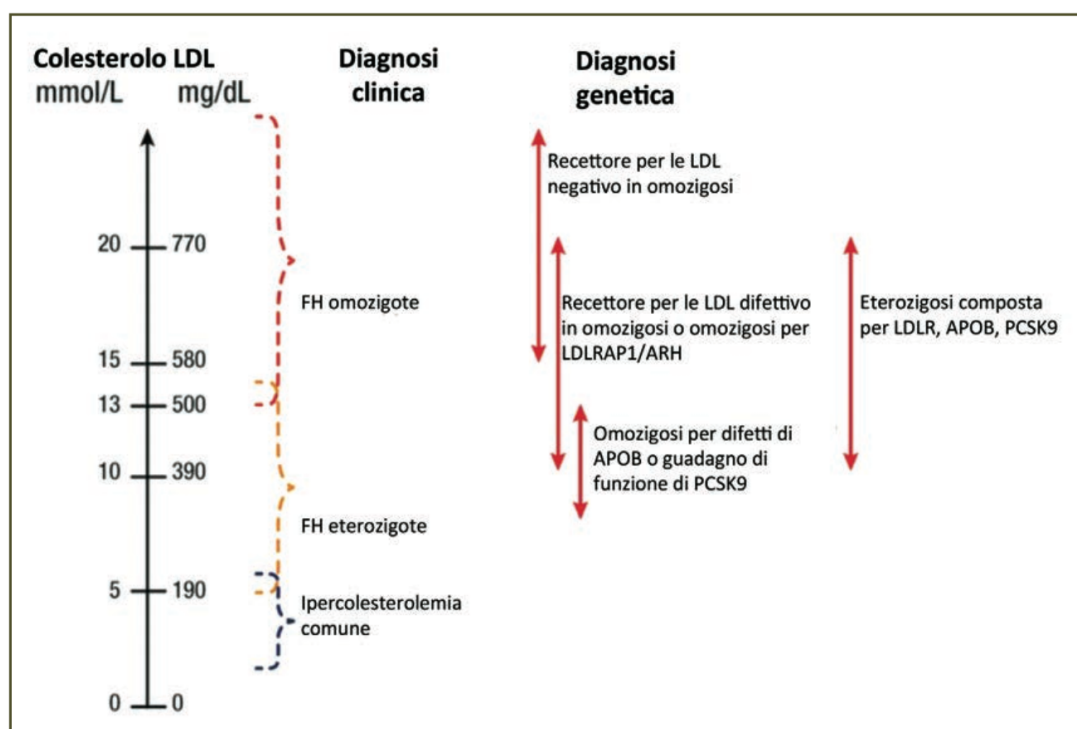
Oggi è ampiamente riconosciuto che mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composta nei geni APOB, PCSK9 o LDLRAP1 danno luogo ad un fenotipo clinico di gravità simile a quello che caratterizza i portatori omozigoti della mutazione di LDLR. Pertanto l’FH omozigote viene definita come autosomica dominante (ADH) quando casata da mutazioni dei geni LDLR, APOB e PCSK9 e recessiva (ARH) se dovuta a mutazioni nel gene LDLRAP1.

Indipendentemente dal difetto genetico, la gravità del fenotipo omozigote dipende dall’attività residua del recettore LDL. Sulla base di prove *in vitro* nelle colture di fibroblasti, i pazienti con FH omozigote clinicamente definita sono convenzionalmente classificati come *receptor-negative* (attività residua <2%) o *receptor-defective* (attività residua 2-25%) [1]. I pazienti con FH omozigote che sono *receptor-negative* hanno livelli di c-LDL più elevati e peggiore prognosi clinica rispetto ai pazienti *receptor-defective* [12-14].

L’attività residua del recettore LDL non è stata valutata in maniera sistematica nei pazienti portatori di mutazioni nei geni *APOB* e *PCSK9*. In pazienti portatori di mutazioni *LDLRAP1*, l’attività del recettore LDL in coltura di fibroblasti è normale, sebbene il meccanismo non sia ancora chiaro. Tuttavia, dati recenti suggeriscono che i portatori di mutazioni in questi geni possono presentare un fenotipo più lieve rispetto a quello dei soggetti *receptor-negative* [15]. Complessivamente, i livelli medi di c-LDL per genotipo generalmente aumentano in questo modo: HeFH < doppio eterozigote (per esempio mutazione LDLR + mutazione *PCSK9* con guadagno di funzione o mutazione *APOB*) < mutazione omozigote *APOB* o mutazione *PCSK9* con guadagno di funzione < mutazioni omozigoti *LDLRAP1* o *LDLR-defective* < mutazioni eterozigoti composte

LDLR-defective + mutazione LDLR-negative < mutazioni omozigoti LDLR-negative (Figura 6).

Altre fonti di variabilità nel fenotipo della FH omozigote possono derivare da varianti genetiche con piccolo effetto (polimorfismi a singolo nucleotide comuni), interazioni gene-gene e gene-ambiente e influenze non mendeliane ed epigenetiche [15-17]. Un accesso maggiore e una più ampia applicazione clinica delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione sono fondamentali per definire tale variabilità, nonché individuare geni causativi supplementari, con importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche.



**Figura 6:** Variabilità fenotipica nell'ipercolesterolemia familiare omozigote. Tratto da Averna et al. [99].

### 2.2.1 Ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH)

L'ADH è geneticamente eterogenea e secondo le conoscenze attuali può essere causata da mutazioni del:

- 1) gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL-R), che causano un ridotto legame e catabolismo delle LDL plasmatiche (ADH-1);

- 2) gene dell'apolipoproteina B-100 (apoB) con conseguente produzione di una apoB-100 difettiva che ha una ridotta affinità di legame per il LDL-R (ADH-2);
- 3) gene di PCSK9 con alterazione della normale funzione dell'enzima proteolitico PCSK9 (ADH-3).

In Italia, come in altri paesi occidentali, la frequenza stimata di ADH-1 nella forma eterozigote è di circa 1:250 individui e quella nella forma omozigote, secondo recenti stime, potrebbe essere di 1:250.000. La frequenza stimata di ADH-2 nella forma eterozigote è di circa 1:500-1:700 individui nella popolazione caucasica del Nord America ed in Europa anche se in Italia tale frequenza potrebbe essere più bassa visto che sono state identificate solo 4 famiglie con FDB. La forma ADH-3 è relativamente rara e la frequenza stimata è di circa il 2% dei soggetti con ADH. I livelli sierici di Colesterolo Totale (CT) nei soggetti con ADH eterozigote sono in genere compresi tra 300 mg/dl a 550 mg/ dl, e negli omozigoti i livelli sono sensibilmente più elevati (da 600 mg/dl a 1.200 mg/dl) [1].

ADH-1 è la più conosciuta di queste forme monogeniche; sono state identificate più di 900 mutazioni dell'LDL-R responsabili di ADH-1 e più di 100 sono quelle identificate in Italia. Alcune di queste mutazioni sono state riscontrate in più famiglie apparentemente non relate ma provenienti da ben precise aree geografiche.

LDL-R è una glicoproteina espressa sulla superficie cellulare, in grado di legare due ligandi: apoB-100 e apo E. I recettori delle LDL sono sintetizzati nel reticolo endoplasmatico da dove poi raggiungono la superficie cellulare, dove si raggruppano nelle coated pits, regioni specializzate della membrana plasmatica rivestite da clatrina. Quando le LDL legano i loro recettori, la clatrina polimerizza e forma un'invaginazione che successivamente forma un endosoma all'interno della cellula [1]. Una volta internalizzato, l'ambiente acido endosomiale determina la dissociazione delle LDL dal recettore. LDL-R ritorna quindi sulla membrana cellulare o nel lisosoma, dove viene infine degradato da varie proteasi e lipasi.

### 2.2.3 Le classi di fenotipi difettivi

I soggetti affetti da FH in condizioni di omozigosi, rappresentano un modello sperimentale prezioso per lo studio della funzionalità del gene, in quanto permettono di analizzare le alterazioni a carico del recettore LDLR, causate dall'allele mutante, in assenza completa degli effetti di fondo prodotti dall'allele normale. Questi studi sono effettuati mediante un modello in vitro nel quale si valuta l'interazione tra fibroblasti in coltura (ottenuti da biopsie cutanee di soggetti omozigoti per mutazioni perfettamente caratterizzate dal punto di vista molecolare) e LDL marcate. Si è così stabilito che esistono 5 diverse classi di fenotipi difettivi, secondo la fase del meccanismo di funzionamento del recettore LDLR che è compromessa [18-20] (Figura 7). Precisamente:

1. Classe 1: fenotipo “allele nullo”
2. Classe 2: fenotipo “trasporto difettivo”
3. Classe 3: fenotipo “legame difettivo”
4. Classe 4: fenotipo “internalizzazione difettiva”
5. Classe 5: fenotipo “riciclo difettivo”

La classe con fenotipo “allele nullo”, che include il maggior numero di mutazione note, è provocata da mutazioni che causano l'assenza o la presenza in tracce della proteina LDLR, che non è dosabile per immuno-precipitazione. Questa classe può essere divisa ulteriormente in due sottoclassi in base al seguente criterio: (1A) mancanza della proteina immuno-precipitabile, unitamente a quella del suo mRNA; (1B) mancanza della proteina immuno-precipitabile, in presenza però del suo mRNA.

La seconda classe comprende mutazioni che provocano la sintesi di una proteina parzialmente (sottocasse 2A), o totalmente (sottoclasse 2B) incapace di essere trasferita dal reticolo endoplasmatico rugoso al complesso del Golgi. Di conseguenza il recettore, pur essendo sintetizzato correttamente, subisce una incompleta N- e O-linked glicosilazione da cui consegue il blocco del trasferimento del recettore alla membrana plasmatica [18, 19].

La terza classe comprende le mutazioni che provocano un'anomala interazione recettore-ligando.

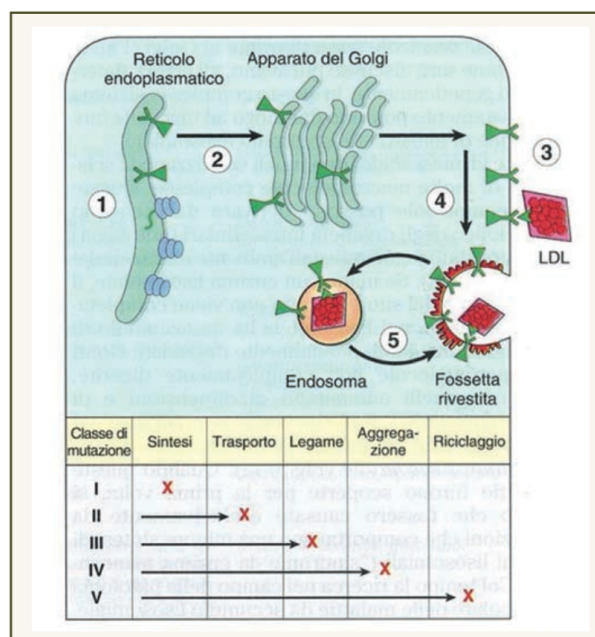
Anche questa classe può presentare una varietà di sfumature. La definizione di legame difettivo per il fenotipo di questa classe è sempre valida quando il ligando è la singola molecola di ApoB100, presente in una particella LDL. Considerano invece come ligandi le IDL, che interagiscono con il recettore attraverso le 4 copie di ApoE in esse contenute, si può osservare una serie di differenti comportamenti che vanno da una totale conservazione del legame ad una drastica riduzione [20].

La quarta classe comprende le mutazioni che producono una proteina in grado di trasferirsi sulla superficie cellulare e di reagire regolarmente con il ligando, ma incapace di aggregarsi nelle fossette rivestite: di conseguenza questo recettore mutante non internalizza regolarmente il ligando. Anche in questo caso esiste una sottoclassificazione in due gruppi: mutazioni che alterano solo il dominio citoplasmatico della proteina e si manifestano come deficit recettoriale (classe 4A) e altre che alterano sia il dominio citoplasmatico che transmembrana e si manifestano come assenza del recettore (classe 4B).

Alla quinta classe appartengono le mutazioni che impediscono il riciclo del recettore. In questo caso la proteina non è rilasciata regolarmente nell'endosoma e compromette così il suo ritorno sulla membrana cellulare. Questo difetto dipende da anomalie a carico del dominio omologo al precursore di EGF, in particolare in alcuni dei *repeats* ad alto contenuto di cisteina.

Nei soggetti ADH-1 eterozigoti, le cellule, ed in particolare gli epatociti, esprimono circa la metà dell'attività recettoriale normale (40-60%) perciò la capacità di allontanare le LDL dal circolo è anch'essa dimezzata e l'emivita delle LDL plasmatiche raddoppiata rispetto al normale (da 2.5-3 giorni a 4.5 giorni).

Nei soggetti omozigoti l'attività recettoriale residua varia dallo 0% al 30%, prevale la via di eliminazione aspecifica, non saturabile e correlata con la concentrazione delle particelle, e l'emivita plasmatica delle LDL aumenta fino a 6 giorni [21, 22].



**Figura 7:** Classi funzionali delle mutazioni dell'LDL-R.

Clinicamente simile all'ipercolesterolemia familiare classica è l'ipercolesterolemia familiare da apo B100 (FDB o ADH-2), a trasmissione autosomica dominante. Questa forma di ipercolesterolemia è provocata da mutazioni del gene che codifica per l'apoproteina B100 (cromosoma 2p24) che determinano alterazioni di conformazione della proteina e riducono l'affinità di legame tra le LDL ed il suo recettore. Ad oggi sono state identificate alcune mutazioni del gene dell'Apo B responsabili di FDB e la mutazione Arg3500Gln, che è la mutazione più frequente. L'alterato catabolismo delle LDL ne prolunga la permanenza in circolo con secondario marcato incremento della colesterolemia, comunque inferiore rispetto a quella dei soggetti con ADH-1, e aterosclerosi prematura. La prevalenza della cardiopatia ischemica prematura è nell'FDB lievemente inferiore a quella osservata nella ADH-1 [23].

Anche la terza forma di ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH-3) non si discosta dal punto di vista fenotipico dalle due forme descritte precedentemente. La scoperta nel 2003 di due mutazioni missenso nel gene del PCSK9 responsabili di ADH-3, ha anche aperto la strada alla comprensione dei meccanismi molecolari che regolano il numero di LDL-R sulla superficie delle membrane cellulari [24]. Il PCSK9 - proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 - è una proteina di 692

aminoacidi. Il gene che codifica per PCSK9 si trova sul cromosoma 1p32. La proteina PCSK9 contiene un peptide segnale, un prodominio, un dominio subtilisin serina proteasi con la canonica triade catalitica acido aspartico-istidina-serina, e un unico dominio C-terminale. La proteina PCSK9 è sintetizzata come uno zimogeno di 72 KDa nel reticolo endoplasmico e va incontro ad un autoclivaggio intramolecolare dando luogo ad un enzima di 63 KDa che si localizza nel Golgi. Questa forma processata può essere secreta nel mezzo di cellule in coltura ed è presente a livelli apprezzabili nel plasma umano. PCSK9 è espresso principalmente nel fegato. Studi in vitro e su animali suggeriscono che mutazioni missenso del PCSK9 trovati in pazienti con ADH-3 conferiscono un guadagno di funzione all'enzima, portando ad una riduzione del numero e quindi dell'attività di LDL-R e a conseguente comparsa di ipercolesterolemia.

#### **2.2.4 Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva (ARH)**

L'Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva (ARH) è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva. I pazienti presentano caratteristiche cliniche simili a quelle degli omozigoti ADH anche se la gravità clinica della forma recessiva è in genere inferiore all'omozigosi per ADH. Come nella forma dominante la trasmissione è verticale all'interno della famiglia ma nel caso della forma recessiva i genitori eterozigoti presentano livelli di colesterolo nella norma o, in alcuni casi, solo lievemente aumentati [7].

Recentemente è stato identificato il gene responsabile di una forma di ipercolesterolemia a trasmissione recessiva (ARH). Il gene è localizzato sul cromosoma 1 (1p35), consiste di 9 esoni e codifica per una proteina di 308 aminoacidi contenente un dominio di 170 aminoacidi denominato "phosphotyrosine binding (PTB) domain". Domini PTB sono presenti in varie proteine "adaptors" che si legano ad una specifica sequenza aminoacidica (NPXY) presente nella coda citoplasmatica di molti recettori cellulari di superficie, incluso il recettore LDL. Il ruolo di ARH sulla funzione del recettore delle LDL non è ancora ben conosciuto [8].

Studi in vitro suggeriscono che la proteina ARH gioca un ruolo tessuto-specifico



ed è necessaria per la funzione dei recettori LDL (LDL-R adaptor protein) nel fegato, ma non nei fibroblasti. La proteina ARH sembra necessaria, nelle cellule polarizzate come gli epatociti, per il trasferimento intracellulare delle LDL legate al recettore e per la stabilizzazione del legame LDL- recettore. L'attività dei recettori LDL nei fibroblasti è quasi normale e ciò suggerisce che i pazienti ARH hanno uno specifico difetto della funzione del recettore LDL a livello epatico [9].

Mutazioni del gene ARH sono state identificate soprattutto in Sardegna ed in altri Paesi del bacino del Mediterraneo.

In Sardegna la frequenza degli omozigoti e degli eterozigoti composti ARH (1:38.000) risulta circa 20 volte superiore a quella degli omozigoti ADH in Italia e nel mondo occidentale (1:1.000.000). La frequenza stimata degli eterozigoti ARH è molto elevata (1:120). L'identificazione di un numero elevato di eterozigoti permetterà in un prossimo futuro una corretta stima del rischio cardiovascolare di questi soggetti.

### **2.2.5 Mutazioni italiane del gene delle lipoproteine a bassa densità**

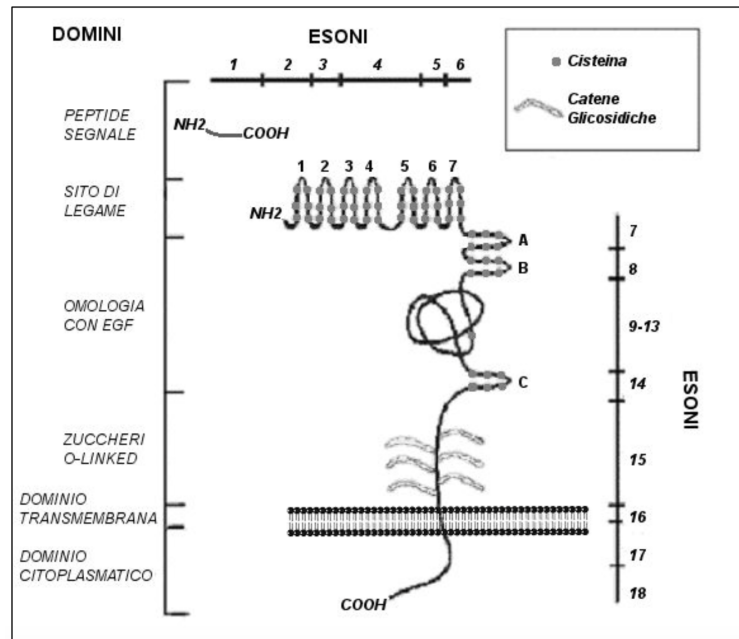
In alcuni paesi come il Sud Africa, la Finlandia e il Quebec sono presenti solo poche mutazioni responsabili di FH in queste popolazioni (effetto capostipite) e ciò permette di fare diagnosi molecolare con maggiore facilità perché permette l'utilizzo di test veloci e poco costosi per l'identificazione della mutazione causale della malattia. In Italia, particolarmente in Sicilia, il quadro è invece molto eterogeneo rispecchiando il dato storico dell'incontro di molteplici etnie. Nel nostro paese sono state descritte più di 89 differenti mutazioni che includono sia grossi riarrangiamenti che mutazioni puntiformi. Anche in Sicilia, comunque, alcune mutazioni sembrano avere una maggiore frequenza rispetto ad altre.

### **Il recettore delle lipoproteine a bassa densità**

Il gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) è localizzato, nel genoma umano, sul braccio corto del cromosoma 19 (locus 19p13.1–13.3), (83). Si estende per circa 45 kbasi ed è strutturato in 18 esoni e 17 introni [25].

Il prodotto genico maturo è una glicoproteina transmembrana di 839 aminoacidi (aa), la proteina tradotta ha però un peptide segnale di 21 aa che, dopo il trasporto

al Golgi, è immediatamente rimosso. La proteina LDLR è un mosaico di sequenze peptidiche, o domini funzionali, ad elevata omologia con sequenze presenti in altre proteine: ben 13 dei 18 esoni del gene LDLR codificano, infatti, sequenze amminoacidiche omologhe a quelle d'altre proteine (Figura 8).



**Figura 8:** Struttura della proteina LDLR, i domini strutturali e la corrispondenza tra la sequenza della proteina e del gene.

L'esone 1 (70 bp) codifica il peptide segnale che è tagliato dalla proteina durante la traslocazione nel reticolo endoplasmatico. Gli esoni 2-6 codificano il primo dominio, comprendente sette sequenze di 40 aa, tra loro poco differenti, contenenti ciascuna sei residui di cisteina. Queste sequenze ripetute (*repeats*) sono necessarie all'interazione con il ligando che è l'apolipoproteina B-100 (ApoB-100) o l'apolipoproteina E (ApoE) [26]. Ciascuna di queste sequenze ripetitive è codificata da un singolo esone eccetto i *repeats* 3, 4 e 5, tutti codificati dall'esone 4. Le sequenze amminoacidiche di ciascun repeat sono omologhe ad una sequenza di 40 aa della regione centrale del componente C9 del complemento, una proteina coinvolta nella cascata del complemento [27]. Gli esoni 7-14 codificano un dominio di 400 aa necessario alla dissociazione delle lipoproteine dal recettore una volta che il complesso recettore-lipoproteina è trasferito all'interno della

cellula come endosoma. Ciò consente il ritorno del recettore sulla membrana plasmatica e quindi il suo riciclo [28]. Questo dominio mostra il 33% di identità con una porzione È stato ipotizzato perciò che, nel corso dell'evoluzione, gli esoni che codificano questo dominio siano stati trasferiti da un qualche gene ancestrale al gene LDLR e al gene del precursore di EGF [29].

Gli esoni 7, 8, e 14 codificano per tre *repeats* di 40 aa (definiti A, B e C), ricchi in cisteina, le cui sequenze presentano omologie con alcune proteine coinvolte nella coagulazione del sangue [30]. Pertanto anche in questo caso è stata ipotizzata una condivisione di sequenze codificanti tra il gene LDLR e membri di altre famiglie geniche.

L'esone 15 codifica il terzo dominio formato da 58 aa. Questo dominio è ricco di residui di serina e treonina che costituiscono i siti di legame per le catene glicosidiche O-legate. Il quarto dominio è codificato dall'esone 16 e da una parte dell'esone 17 (estremità 5' dell'esone), include 22 aa idrofobici che costituiscono il dominio transmembrana. Infine, la parte restante dell'esone 17 (estremità 3' dell'esone) e l'esone 18 codificano il quinto dominio, formato da 50 aa. Questo dominio rappresenta la coda citoplasmatica della proteina che consente la formazione di assemblaggi (*clusters*) recettoriali nelle fossette rivestite (*coated pits*) e l'endocitosi stessa del recettore.

Oltre alla sequenza nucleotidica che codifica la proteina, il gene include anche gli elementi che ne regolano la trascrizione. La regione che regola la trascrizione del gene è localizzata circa 250 bp a monte del codone di inizio ATG, fiancheggia l'estremità 5' e contiene 3 *repeats* da 16 paia di basi e una TATA box. I *repeats* 1, 2 e 3 formano una sequenza denominata SRE (*Sterol Regulatory Element*).

I *repeats* 1 e 3 sono responsabili del livello basale di trascrizione del gene. Il *repeat* 2 contiene invece una sequenza di 8 basi, denominata SRE-1, che media la regolazione a feedback della trascrizione del gene da parte degli steroli, attraverso il legame con le proteine SREBPs (*Sterol Regulatory Elements Binding Proteins*). Le SREBPs sono proteine delle membrane intracellulari, hanno la capacità di interagire con le sequenze di regolazione SRE a monte del gene LDLR e d'altri geni coinvolti nel metabolismo cellulare del colesterolo, come la idrossimetilglutaril-coenzima A reduttasi (HMGCR), l'enzima che catalizza la tappa

metabolica che limita la sintesi del colesterolo. Quando la concentrazione di steroli nella cellula è normale la SREBP è legata alle membrane del reticolo endoplasmatico o alla membrana nucleare e assume una conformazione a forcina che lascia sporgere i domini amino- e carbossi-terminali nel citosol. In condizioni di deficit di steroli, SREBP è traslocata dal reticolo endoplasmatico (RE) all'apparato di Golgi per mezzo della proteina attivatrice SCAP o SREBP Activating Protein; dopo la traslocazione sul Golgi si attivano due enzimi proteolitici (S1P, Site One Protease e S2P-Site Two Protease) che tagliano sequenzialmente il dominio amino-terminale, quello che interagisce con le sequenze di regolazione. Il peptide generato dalla seconda proteolisi penetra all'interno del nucleo e interagisce con le sequenze di regolazione aumentando la trascrizione e, di conseguenza, l'espressione genica [31].

### **Mutazioni del gene LDLR**

I difetti nel gene LDLR possono essere di tipo puntiforme (mutazioni missenso o nonsense), piccole (piccole delezioni o inserzioni, con o senza perdita della trama di lettura) e grossolane (riarrangiamenti che comportano la perdita o la duplicazione di intere sezioni del gene). Queste ultime mutazioni sono causate dalla presenza nel genoma umano di un alto numero di sequenze ripetitive, distribuite in modo non uniforme, note come “short interspersed sequences” (SINEs o sequenze Alu), la cui propagazione ha dato luogo ad una varietà di “subfamiglie Alu”. Di fatto, queste sequenze si comportano come elementi mobili del genoma, causando rotture e ricombinazioni, inserzioni e delezioni, conversione genica e alterazione nell'espressione dei geni [32].

### ***Mutazioni puntiformi***

La correlazione genotipo-fenotipo del gene LDLR è ancora oggetto d'indagine perché ciascuna mutazione presenta un ampio spettro di variabilità fenotipica inter-individuale che rende difficoltoso lo studio di correlazione.

Sebbene le mutazioni puntiformi siano distribuite sull'intero gene, vi è in eccesso di mutazioni sull'esone 4 ( $P = 0.001$ ), che codifica per i tre *repeats* centrali del dominio di legame, e sull'esone 9 ( $P = 0.01$ ) che codifica per l'estremità amino-terminale della regione centrale del dominio di omologia con il precursore EGF.

Sono invece rare le mutazioni nell'esone 13 ( $P=0.001$ ), che codifica per l'estremità carbossi-terminale della regione centrale del dominio di omologia con il precursore EGF, e nell'esone 15 ( $P=0.001$ ) che codifica per il dominio in cui si legano le catene di zuccheri O-linked. L'analisi della distribuzione delle mutazioni, dopo l'allineamento dei 7 *repeats*, mostra che il 74% delle mutazioni nel dominio dei siti di legame cade su aa conservati, principalmente localizzati nella regione C-terminale dei *repeats* [32, 33].

### ***Mutazioni grossolane e sequenze Alu***

I riarrangiamenti nel gene LDLR sono una delle tante cause della FH e mostrano, da un punto di vista molecolare, un'ampia eterogeneità per lunghezza, tipo e localizzazione [31]. Si tratta prevalentemente di delezioni, di preferenza localizzate nella parte del gene che comprende gli esoni 1-8 e 13-18 (91,92). Questa particolare localizzazione in alcune parti del gene si pensa sia dovuta alla presenza delle sequenze ripetitive Alu, tipo molto frequente di sequenze SINEs (*Short Interspersed Elements*).

### ***Polimorfismi del Gene LDLR***

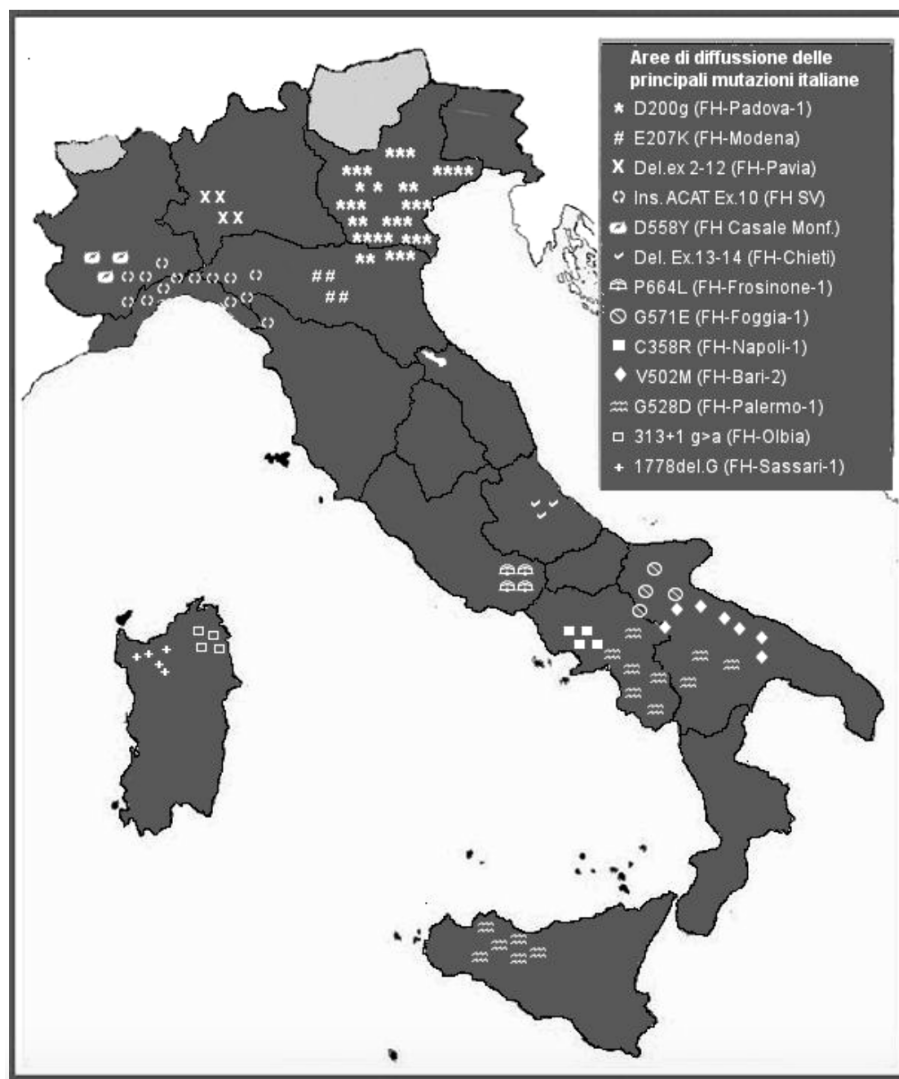
Sono riportati in letteratura numerosi polimorfismi del gene dovuti a cambiamenti di una singola base (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), sia in sezioni codificanti, sia in sezioni non codificanti del gene, che non manifestano effetti clinicamente rilevanti sulla funzionalità del recettore [33].

### **Distribuzione geografica delle mutazioni in Italia**

La *Figura 10* mostra la distribuzione geografica delle mutazioni che superavano, singolarmente, la soglia dell'1% della casistica. La mutazione FH Padova-1 (D200G) è la mutazione maggiormente riscontrata, con una prevalenza del 6%, seguita dalla FH Savona (1418-1419 ins 4nt) e dalla FH Palermo-1 (G528D), rispettivamente con il 4,276 % e il 4 %; le mutazioni FH Bari-2 (V502M), FH Casale Monferrato (D558Y), FH Frosinone-1 (P664L) e FH-Sassari-1 (nt 1778 del G) superavano di poco la soglia dell'1%.

Lo studio di correlazione genotipo-fenotipo evidenziava l'ampio spettro di variabilità fenotipica inter-individuale di ciascuna mutazione. Si poteva comunque osservare che le mutazioni che danno luogo ad un difetto limitato ad una piccola zona della proteina del recettore erano caratterizzate da un fenotipo più lieve (FH Padova; FH Bari-2; FH Frosinone) rispetto a mutazioni dovute a forme tronche o grossolane alterazioni della proteina codificata (FH Savona; FH Palermo). Per i due gruppi viene confrontata l'incidenza di Xantomi Tendinei (TX), di eventi coronarici (CAD), entrambi più frequenti nei soggetti con mutazioni che causano difetti gravi sulla proteina e dei livelli di LDL-C, più alti sempre in questi soggetti.

L'interesse sollevato da queste mutazioni deriva dal fatto che la loro frequenza risultava decisamente alta, non solo in relazione alle altre mutazioni individuate nelle famiglie del campione, ma anche, e in misura consistente, nell'ambito della zona geografica ove erano più diffuse. Dopo il completamento del primo screening sulla popolazione di etnia italiano [34], è proseguita l'individuazione di altre mutazioni causa di FH nel nostro paese. Il numero delle mutazioni ad oggi identificate è di 133. Nonostante questo numero appaia molto alto, è destinato ad aumentare nel tempo perché nelle casistiche studiate la percentuale di identificazione delle mutazioni non supera, nel migliore dei casi il 75%.



**Figura 10:** Aree di diffusione delle principali mutazioni del gene LDLR presenti in Italia.

### 2.3 LDL ossidate

Le LDL in circolo subiscono delle modificazioni post-traduzionali che ne aumentano il potere aterogeno. Queste sono essenzialmente due:

- glicazione: in caso di iperglicemia persistente, alle LDL in circolo vengono addizionati alcuni residui glucidici che ne aumentano l'adesività; ciò mantiene la loro ritenzione quando entrano all'interno della tonaca intima vascolare;
- ossidazione: questo processo modifica sia la porzione lipidica che proteina delle lipoproteine e avviene all'interno della parete arteriosa.

Il processo ossidativo delle LDL si esplica in tre fasi: nella prima vengono consumati gli antiossidanti endogeni della particella come ad esempio la vitamina E. Nella successiva fase poi gli acidi grassi polinsaturi (il doppio legame tra i carboni presenta una instabilità maggiore rispetto al legame singolo) a frammenti di acidi grassi, fosfolipidi ossidati e radicali liberi dell'ossigeno. Nell'ultima fase infine i frammenti di acidi grassi vengono convertiti ad aldeidi; questi possono interagire con i residui di lisina delle Apo B100 permettendo la formazione di nuovi epitopi. [35]

Tenere in considerazione la possibile modifica posttraduzione delle LDL è importante perché per una corretta valutazione del rischio cardiovascolare è importante considerare non solo la quantità delle LDL ma anche la loro qualità: più sono modificate più stimolano i macrofagi e la risposta infiammatoria all'interno della placca.

L'importanza clinica delle LDL ossidate risiede nel fatto che, in uno studio trasversale, è stata dimostrata la loro relazione con l'aterosclerosi subclinica mediate studi ecografici sullo spessore medio-intimale delle carotidi e sulle arterie femorali. Lo stesso studio associa, non in maniera casuale visto che si tratta di uno studio di prevalenza, i livelli di LDL ossidati con i livelli circolanti di proteina C reattiva e TNF alfa, markers di infiammazione. [35]

#### **2.4 La genesi della placca aterosclerotica**

Il processo aterosclerotico inizia quando le LDL circolanti penetrano lo strato endoteliale tramite una sua soluzione di continuo (dovuta ad un microtrauma oppure a un danno chimico). Qui si trovano in un ambiente chiuso poco infiammato che però presenta poca capacità antiossidante. Le cellule circostanti iniziano la produzione di mediatori infiammatori così come anche l'endotelio che risulta già infiammato dal traumatismo meccanico o chimico di base che ha portato all'accumulo iniziale di LDL. Tutto ciò richiama le cellule dell'infiammazione (soprattutto macrofagi) che producono ulteriori sostanze ossidanti, soprattutto le specie reattive dell'ossigeno, che contribuiscono a modificare ulteriormente la componente lipidica e proteica delle lipoproteine.



Queste peraltro sono escluse dal circolo ematico dove invece sono presenti sostanze antiossidanti.

All'inizio di questo processo le LDL vengono chiamate *mo* LDL (LDL minimally oxidized); queste sono riconosciute ancora come lipoproteine normali e interagiscono con LDL-R dei macrofagi (questo sistema è saturabile e perciò inibibile: a questo ne consegue che i macrofagi non possono infarcirsi di LDL né di *mo* LDL). Le *mo* LDL però agiscono come DAMPs (damage-associated molecular patterns) segnalando un danno e, interagendo con i TLR dei macrofagi, attivano una florida risposta infiammatoria.

I macrofagi iniziano così a esprimere iNOS e a produrre in grande quantità di citochine proinfiammatorie che richiamano altri macrofagi e agiscono come sostanze ossidanti all'interno dell'ambiente intinale (soprattutto per azione dell'ossido nitrico e della mieloperossidasi).

L'ambiente così fortemente infiammato ossida ulteriormente le proteine e soprattutto i lipidi presenti nelle LDL: diventano così ox LDL (LDL ossidate). Questo rappresenta un passaggio chiave della cascata patogenetica della malattia aterosclerotica: le ox LDL, avendo una struttura fortemente anomala, non sono più riconosciute dal LDL-R ma da un'altra classe di recettori presenti sui macrofagi che si chiamano scavenger receptors (SR). Questi recettori possono essere specifici o aspecifici e legano le sostanze tossiche o di scarto presenti nell'ambiente extracellulare.

In particolari esistono due principali SR che rendono conto della maggior parte di uptake di oxLDL da parte dei macrofagi in vitro: SR-A lega i residui di lisina ossidati sulle Apo B100 mentre CD36 lega i fosfolipidi ossidati.

Nella pratica bioclinica sono stati sviluppati tre anticorpi che permettono il riconoscimento di epitopi e quindi permettono la quantificazione delle LDL ossidate tramite test ELISA: di questi quello che verrà usato in questo studio è il mAB-4E6. Si tratta del primo anticorpo sviluppato e di quelli più utilizzati. Riconosce l'epitopo che si genera dalla modificazione dei residui di lisina delle

Apo B100 da parte dell'aldeide. Questo anticorpo riconosce però solo LDL ossidate con più di 60 residui lisinici modificati [35].

Al contrario dei LDL-R, gli scavenger receptors non sono un sistema saturabile e non vengono inibiti dalla presenza di colesterolo intracellulare quindi continuano ad accumulare LDL ossidate all'interno nei macrofagi i quali diventano foam cells (cellule schiumose).

Queste cellule, replete di vacuoli lipidici, sono metabolicamente molto attive e non fanno altro che rafforzare la cascata di segnalazione rendendo il sito estremamente infiammato. In questo meccanismo esiste ancora una certa reversibilità. Queste cellule infatti possono uscire dalla parete endoteliale e le LDL ossidate possono essere rilasciate all'interno delle HDL nascenti circolanti che poi saranno smaltite dal fegato attraverso la bile. Le HDL inoltre grazie al loro corredo enzimatico svolgono l'azione antiossidante all'interno della placca. Per questo motivo è importante monitorare nel paziente i valori di HDL anche se non rappresentano più un target terapeutico.

Se questo processo non consente una completa reversibilità, le foam cells continuano ad accumulare LDL ossidate (ricordiamo che gli scavenger receptors non sono saturabili) fino a che non vanno incontro a morte. Quando muoiono, queste cellule riversano nell'ambiente subintimale extracellulare i loro contenuti citosolici (LDL ossidate, altri DAMPs ed enzimi proteolitici) che non fanno altro che accelerare il processo infiammatorio accrescendo la placca e creano un core necrotico all'interno di essa. Questo processo potrà così evolvere fino a sfociare in tre destini differenti:

- rottura di parete;
- rottura di placca con conseguente tromboembolismo;
- crescita della placca fino a stenosi critica del vaso.

## 2.5 Diagnosi

La diagnosi clinica di FH si basa su cinque criteri, secondo il Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) [Figura 11]:

- storia familiare (parenti di primo grado con coronaropatia precoce, ossia < 55 anni negli uomini e < 60 anni nelle donne; parenti di primo grado con colesterolo totale  $\geq$  310 mg/dl; parenti di primo grado con xantomi tendinei e/o arco corneale lipidico; bambini < 18 anni con colesterolo totale  $\geq$  230 mg/dl);
- storia clinica (CHD precoce, malattia vascolare cerebrale o periferica precoce);
- esame obiettivo per xantomi e arco corneale lipidico;
- LDL-C molto elevato a misurazioni ripetute;
- presenza di mutazione causativa [36].

		Punti
<b>Storia familiare</b>		
a) Parenti di primo grado con coronaropatia (CHD) prematura (<55 anni negli uomini; <60 anni nelle donne)		1
b) Parenti di primo grado con colesterolo >8 mmol/L ( $\geq$ 310 mg/dL) (o >95° percentile del Paese)		1
c) Parenti di primo grado con xantomi tendinei e/o arco corneale		2
d) Bambini <18 anni con colesterolo >6 mmol/L ( $\geq$ 230 mg/dL) (o >95° percentile del Paese)		2
<b>Storia clinica</b>		
a) Soggetto con CHD prematura (<55 anni negli uomini; <60 anni nelle donne)		2
b) Soggetto con malattia vascolare cerebrale o periferica prematura (<55 anni negli uomini; <60 anni nelle donne)		1
<b>Esame fisico</b>		
a) Xantoma tendineo		6
b) Arco corneale in un soggetto con <45 anni		4
<b>Risultati biochimici (colesterolo LDL)</b>	>8,5 mmol/L (>325 mg/dL)	8
	6,5-8,4 mmol/L (251-325 mg/dL)	5
	5,0-6,4 mmol/L (191-250 mg/dL)	3
	4,0-4,9 mmol/L (155-190 mg/dL)	1
<b>Analisi del DNA</b>		
a) Mutazione causative nota nei geni		8
Diagnosi "certa" con un punteggio >8 punti. Diagnosi "probabile" con un punteggio tra 6 e 8 punti. Diagnosi "possibile" con un punteggio tra 3 e 5 punti. Diagnosi "improbabile" con un punteggio tra 0 e 2 punti.		

**Figura 11.** Ipercolesterolemia familiare eterozigote negli adulti: criteri per la diagnosi del Dutch Lipid Clinic Network Score. Tratto da Aversa et al. [99].

Le cause secondarie di iperlipidemia (ipotiroidismo, sindrome nefrosica, trapianto renale, colestasi, iatrogena, secondaria a paraproteinemie) devono essere escluse

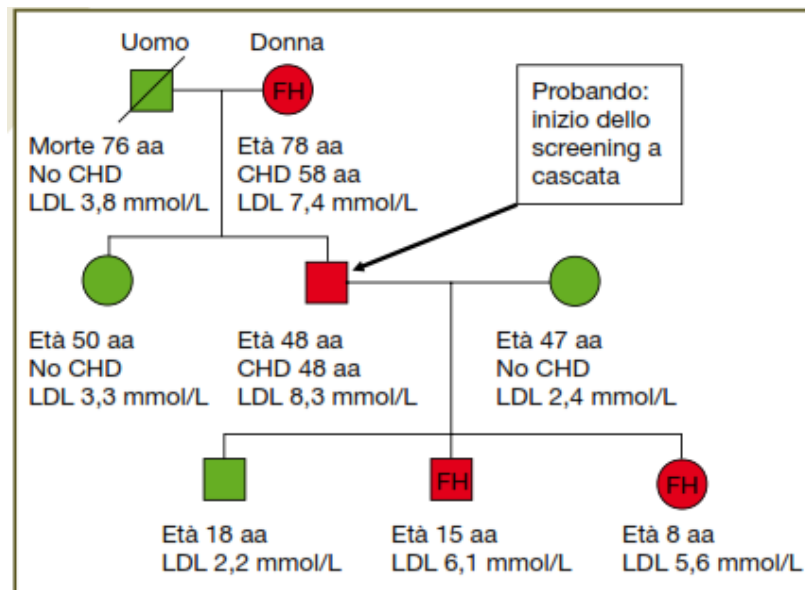
mediante rilevazione di enzimi epatici, funzionalità renale, ormoni tiroidei, glicemia e albuminuria (Figura 12).

Alterazione lipidica	Diagnosi differenziale	
	Forme primitive	Forme secondarie
CT ↑ oppure ↑↑ LDL-C ↑ oppure ↑↑ TG normali	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ipercolesterolemia poligenica</li> <li>✓ Iperlipidemia familiare combinata</li> <li>✓ Ipercolesterolemia monogenica*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ipotiroidismo</li> <li>✓ S. Nefrosica</li> <li>✓ Trapianto renale</li> <li>✓ Colestasi</li> <li>✓ Farmaci</li> </ul>
CT ↑↑↑ LDL-C ↑↑↑ TG normali	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ipercolesterolemia monogenica*</li> <li>✓ Ipercolesterolemia poligenica (raro)</li> <li>✓ Iperlipidemia familiare combinata (raro)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ipotiroidismo</li> <li>✓ S. nefrosica</li> <li>✓ Paraproteinemie</li> </ul>

CT: colesterolo totale; TG: Trigliceridi; LDL-C: LDL-colesterolo; HDL-C: HDL-Colesterolo. Il numero delle frecce è indice della severità del disturbo metabolico. \*Ipercolesterolemia autosomica dominante o recessiva.

**Figura 12.** Diagnosi differenziale delle dislipidemie. Tratto da Averna et al. [99].

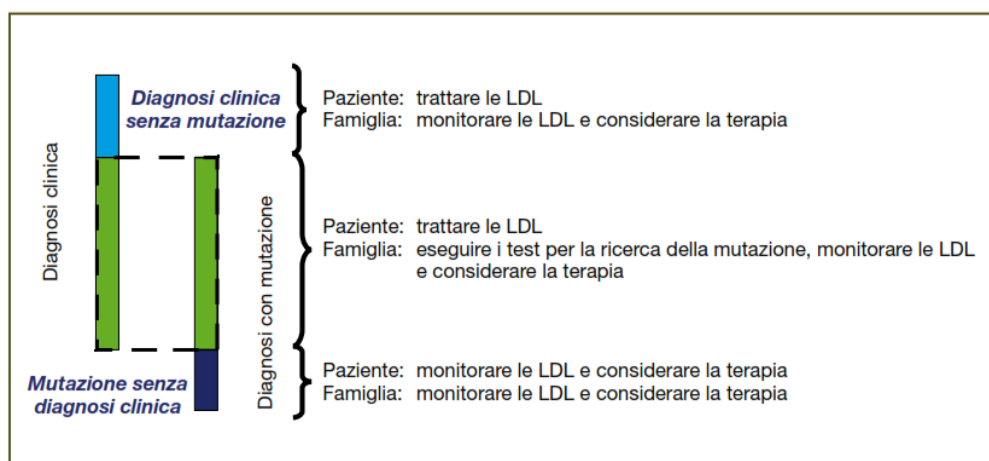
Oltre alla costruzione dell'albero genealogico (Figura 8), devono essere eseguiti un esame clinico sistematico per rilevare la presenza di xantomi tendinei e tuberosi e di arco corneale. La valutazione ecografica del tendine di Achille, quando disponibile, aumenta il tasso di identificazione degli xantomi [37].



**Figura 13.** Pedigree di una famiglia con FH. La costruzione di un pedigree come questo è parte di ogni esame di un soggetto o di una famiglia con sospetta FH. I colori rosso e verde indicano membri della famiglia con o senza FH eterozigote. CHD = malattia coronarica; FH = Ipercolesterolemia Familiare; LDL = lipoproteine a bassa densità. Tratto da Averna et al. [99].

Nei soggetti affetti da FH, nonostante gli elevati livelli di colesterolo totale siano  $\geq 310$  mg/dl ( $\geq 230$  mg/dl nei bambini), i livelli di trigliceridi e lipoproteine ad alta densità (HDL) sono generalmente non alterati. La presenza di ipertrigliceridemia non esclude la diagnosi di FH; tuttavia, devono essere considerate altre cause di ipertrigliceridemia e potrebbe essere necessario un trattamento [38]. Allo scopo di stabilire una diagnosi clinica, viene raccomandato l'uso dei criteri del Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) (Figura 11). Negli individui con diagnosi certa o probabile di FH (DCLNS  $>5$ ) e particolarmente in quelli con xantomi e con colesterolo plasmatico elevato in aggiunta a storia familiare positiva per CHD è fortemente raccomandato il test genetico. Quando viene identificata una mutazione causativa in un paziente, dovrebbero essere sottoposti a test genetico anche i suoi familiari di primo grado (Figura 13).

La comprensione delle cause genetiche di questa malattia, cioè mutazioni del recettore LDL, dell'apolipoproteina B, di PCSK9 e della proteina adattatore del recettore LDL, ha reso disponibile l'individuazione diretta di tali mutazioni in molti Paesi. Tale progresso ha portato alla comprensione che un 10-40%, a seconda dei criteri di riferimento, dei soggetti con una diagnosi clinica non ha una mutazione causale rilevabile; in questi individui è pertanto possibile una diagnosi clinica di FH, ma non una diagnosi molecolare (Figura 14) [39, 40].

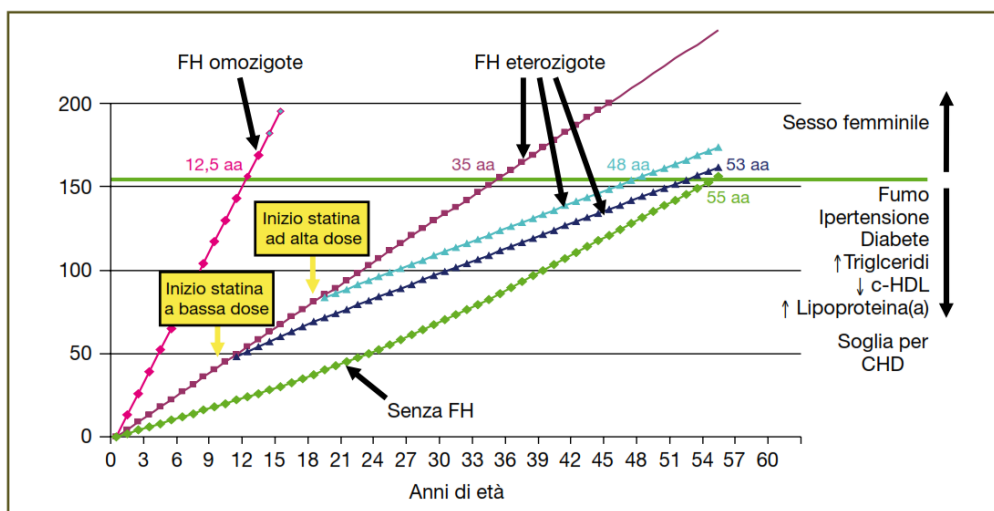


**Figura 14.** Sovrapposizione della diagnosi clinica e della diagnosi molecolare nella FH eterozigote. La frazione di individui FH con diagnosi clinica ma senza una mutazione causativa, la frazione di individui con la mutazione causativa ma senza diagnosi clinica, e la frazione di individui con diagnosi clinica e mutazioni causativa, variano da Paese a Paese, e sono dipendenti dai criteri utilizzati per sottoporre i pazienti al test genetico. Questa figura illustra le frazioni di questi tre differenti scenari in uno studio condotto in Spagna [16], e pertanto non necessariamente estendibile ad altri Paesi. LDL = lipoproteine a bassa densità. FH = Ipercolesterolemia Familiare. Tratto da Averna et al. [99].

Ci possono essere quindi altri geni chiave coinvolti in questa malattia; in alternativa, questi individui possono avere una condizione poligenica alla base dell'aumentato livello di LDL, senza il contributo dei geni classici coinvolti nella patogenesi dell'FH. D'altra parte, lo screening genetico a cascata a partire da soggetti con FH portatori di una mutazione causativa, ha mostrato che, mentre in media, i familiari che portano la mutazione causativa hanno livelli di colesterolo LDL due volte più elevati rispetto ai familiari non-portatori, una significativa proporzione di familiari portatori della mutazione ha livelli di LDL inferiori a quelli considerati "soglia" per la diagnosi di FH. Quindi questi individui hanno una diagnosi molecolare di FH, ma non una diagnosi clinica (Figura 14) [39, 40].

## 2.6 Rischio cardiovascolare

Non tutti gli individui con FH, diagnosticati clinicamente o attraverso una mutazione causativa, sviluppano aterosclerosi e CHD nella stessa misura. Alcuni sviluppano la malattia in giovane età, altri in età più avanzata, altri possono anche non sviluppare CHD prima di morire per altre cause. Altri fattori di rischio oltre all'elevato colesterolo delle LDL concorrono nel determinare l'insorgenza di CHD (Figura 15) così come osservato nei soggetti non FH [41]; pertanto la valutazione di tali fattori può aiutare a stimare il rischio di CHD [42].



**Figura 15.** Carico cumulativo del colesterolo LDL in individui con o senza FH in funzione dell'età, all'inizio della terapia con statine. Per il calcolo del carico cumulativo sono stati utilizzati i seguenti valori medi di colesterolo LDL. Soggetti senza FH: 2,0 mmol/L nel range di età 0-15 anni; 2,5 mmol/L nel range di età 15-24; 3,0 mmol/L nel range di età 25-34 anni; 3,5 mmol/L nel range di età 35-44; 3,5mmol/L nel range di età 45-54 anni. Soggetti con FH

eterozigote: 4,5 mmol/L in soggetti non in trattamento; 3 mmol/L in soggetti trattati nel range di età 10-18 anni; 2,5 mmol/L in soggetti trattati dai 18 anni. Soggetti con FH omozigote: 13 mmol/L. I dati derivano da Starr et al. (22) e da Huijgen et al (23). c-LDL = colesterolo LDL; c-HDL = colesterolo HDL; CHD = malattia aterosclerotica coronarica. Tratto da Averna et al. [99].

Il concetto di cumulative burden (carico cumulativo) del colesterolo delle LDL (Figura 15) può illustrare l'importanza di un trattamento ipocolesterolemizzante precoce. Il carico cumulativo di colesterolo LDL di una persona di 55 anni senza FH è tipicamente 160 mmol, sufficiente a sviluppare CHD (Figura 15) [42,43]. Per un individuo con FH eterozigote, tale carico è raggiunto a 35 anni, se la malattia non è trattata, a 48 anni se la malattia è trattata dai 18 anni ed a 53 anni se la malattia è trattata dai 10 anni di età. Un soggetto con FH omozigote non trattata raggiungerà questo livello all'età di 12,5 anni (Figura 15). Gli uomini sviluppano CHD prima delle donne; inoltre, l'ipertensione, il fumo, il diabete e alti livelli di trigliceridi/bassi livelli di colesterolo HDL [38] sono tutti ulteriori fattori di rischio ben noti di CHD. Inoltre, la lipoproteina(a), o Lp(a), può essere particolarmente elevata in FH eterozigoti o omozigoti clinicamente diagnosticati [44, 45]. Infatti, è ormai ben dimostrato che elevati livelli di Lp(a) costituiscono un fattore di rischio con un ruolo causale nella malattia cardiovascolare, indipendentemente dal livello di colesterolo LDL [46, 47] e studi in soggetti FH dimostrano che aumentate concentrazioni di Lp(a) rappresentano un importante fattore di rischio cardiovascolare in questa condizione [48].

Per migliorare la classificazione del rischio, le Linee Guida 2012 di Prevenzione Cardiovascolare [41] e le Linee Guida 2016 per la Gestione delle Dislipidemie dell'European Society of Cardiology (ESC) [49] raccomandano le tecniche di imaging per rilevare l'aterosclerosi asintomatica nei soggetti a rischio intermedio. In soggetti FH asintomatici o in quelli con una storia familiare poco chiara dovrebbe essere considerata la valutazione dell'aterosclerosi subclinica. Infatti, la presenza di malattia aterosclerotica farebbe ridurre l'obiettivo di colesterolo delle LDL da raggiungere, richiedendo un trattamento farmacologico più intensivo ed inoltre potrebbe motivare i pazienti a migliorare l'aderenza alla terapia.

## 2.7 Valutazione del danno preclinico

Le tecniche per l'identificazione dell'aterosclerosi subclinica sono, in primo luogo, l'ecografia carotidea ed il calcium score coronarico; anche l'indice caviglia-braccio, l'angiografia coronarica mediante tomografia computerizzata e l'elettrocardiogramma da sforzo possono essere impiegati in pazienti asintomatici sulla base delle indicazioni cliniche. Essi sono:

- ecocolordoppler dei tronchi sovraortici: permette di valutare sia la presenza di una placca sia di un semplice ispessimento medio-intimale (IMT) delle carotidi che rappresenta un indice di danno preclinico. Un valore di IMT maggiore di 0.9 mm è considerato patologico;
- aortic pulse wave velocity: è un ottimo indice della stiffness e si basa sul principio che la velocità dell'onda sfigmica (la cui velocità media è di 4-10 m/s) dipende principalmente dall'elasticità della parete arteriosa. L'onda di polso viene misurata con varie metodiche (tonometrica, piezoelettrica, Doppler, impedenziometrica) in due punti differenti, come ad esempio all'arteria carotide comune e all'arteria femorale comune. La velocità viene calcolata come spazio tra i due punti di misurazione diviso il tempo che impiega l'onda ad attraversarli [50];
- ABI (indice caviglia-braccio), detto anche indice di Winsor: rappresenta un rapporto tra la pressione sistolica misurata alla caviglia e quella misurata al braccio. Se questo rapporto è inferiore a 0,8 il test è suggestivo di arteriopatia obliterante degli arti inferiori mentre se è superiore a 1,2 indica invece indurimento delle pareti arteriose.
- TC coronarica diretta a basse dosi con la valutazione del calcium score: score di Agatston

In ogni caso, in tutti i pazienti con forme di ipercolesterolemia familiare vanno effettuate: visita cardiologica con ecocardiogramma, ECG a riposo e sotto sforzo, ecocolordoppler dei TSA e ecocolordoppler degli arti inferiori.



## **2.8 Xantoma ed ispessimento del tendine d'Achille**

L'ipercolesterolemia familiare porta ad accumulo di colesterolo in tendini estensori (xantomi) il più comune dei quali è il tendine d'Achille [51].

Nella forma omozigote della malattia gli accumuli si sviluppano dall'infanzia mentre nella forma eterozigote iniziano a registrarsi dai 20 anni di età e la grandezza dei noduli è direttamente proporzionale al grado di ipercolesterolemia.

Esistono altre condizioni patologiche che predispongono all'insorgenza di xantomi tendinei tra cui il diabete mellito, alcuni farmaci (come la terapia antiretrovirale), gammopatiemonoclonari, forme di ipercolesterolemia recessiva, disbetalipoproteinemia familiare e alcune mutazioni cromosomiche. Gli xantomi in ogni caso possono comparire anche in pazienti normolipidemicici o senza particolari patologie.

Gli xantomi tendinei istologicamente sono composti da lipidi (33%) e da collagene (24%). La parte lipidica è costituita da soprattutto da colesterolo libero (più della metà), esteri del colesterolo e fosfolipidi presenti all'interno delle foamcells. La sua composizione riflette molto bene quella di una placca aterosclerotica [52]. Anche per questo motivo si pensa che i meccanismi patogenetici alla base del loro sviluppo siano gli stessi. Le LDL presenti negli xantomi derivano dal plasma e vengono intrappolate nel collagene e nei glicosamminoglicani dei tendini. A questo livelli vengono ossidate dall'azione dei macrofagi e dalle altre cellule della matrice e vengono poi fagocitati dando vita alle foamcells.

La presenza di questi accumuli lipidici intratendinei provoca un aumento dello spessore del tendine stesso peggiorato dalla presenza dall'edema e dall'infiammazione che si formano dell'area circostante il nodulo. Questo interferisce con la normale funzione meccanica del tendine provocando achillobolia, problemi estetici e raramente rottura del tendine [52].

La valutazione quantitativa del tendine d'Achille è importante perché è stata dimostrata una relazione tra l'ispessimento tendineo e i livelli di LDL nei pazienti con ipercolesterolemia [53]. In una metanalisi effettuata su 22 articoli, è stato messo in luce come i pazienti con FH e xantomi tendinei (intesi sia come noduli che come ispessimenti tendinei) hanno un rischio cardiovascolare aumentato di più di tre volte rispetto ai pazienti con FH ma senza xantomi [54].

La presenza di xantomi al tendine di Achille è patognomonica di malattia anche se il 25 % dei pazienti presenta un tendine normale alla palpazione. Per questo motivo possono essere usate delle metodiche strumentali in caso di sospetto di malattia.

Innanzitutto gli xantomi possono essere apprezzati ad una palpazione manuale del tendine anche se questa metodica risulta poco sensibile e molto soggettiva.

Lo spessore del tendine d'Achille può essere indagato per mezzo di una radiografia. Il piede viene posto a 90 gradi rispetto alla gamba e i raggi X attraversano i due malleoli. La diagnosi di ispessimento tendineo è fatta quando il diametro massimo del tendine è superiore o uguale a 9 mm.

Questa valutazione è possibile anche con l'utilizzo della sonda ecografica anche se la metodica non è stata ancora standardizzata [55]. L'ecografia può mostrare aree focali anecogene, aree ipoecogene confluenti o un tendine disomogeneamente ingrandito.

Un tendine sano si presenta all'ecografia come una successione di bande chiare iperecogene intervallate da bande scure molto nette: questo è dovuto alla struttura molto organizzata delle fibre di collagene.

Gli xantomi tendinei appaiono invece all'ecografia come noduli iperecogeni formati da collagene e foamcells.

La struttura e l'organizzazione del collagene dei tendini ha una correlazione leggermente negativa rispetto all'indice di massa corporea mentre sembra che l'uso delle statine non influisca negativamente sul trofismo tendineo (era stato messo in luce che l'esposizione alle statine riducesse il metabolismo del collagene e aumentasse l'espressione di alcune metalloproteasi). [56]

Il trattamento degli xantomi può essere di tipo medico tenendo sotto controllo il profilo lipidico del paziente oppure di tipo chirurgico con escissione e ricostruzione del tendine. La chirurgia è però gravata da recidive e dal fatto di creare un ambiente infiammato che peggiora il quadro [57].

I farmaci più adatti in questo caso sono i fibrati, le statine, gli estrogeni e infine l'aferesi delle LDL nei casi di ipercolesterolemia familiare omozigote. E' stato dimostrato che nelle forme eterozigoti una terapia con statine ad alte dosi,

ezetimibe ed inibitori di PCSK9 riducono lo spessore tendineo del 5% durante un trattamento di almeno 3 anni.[57]

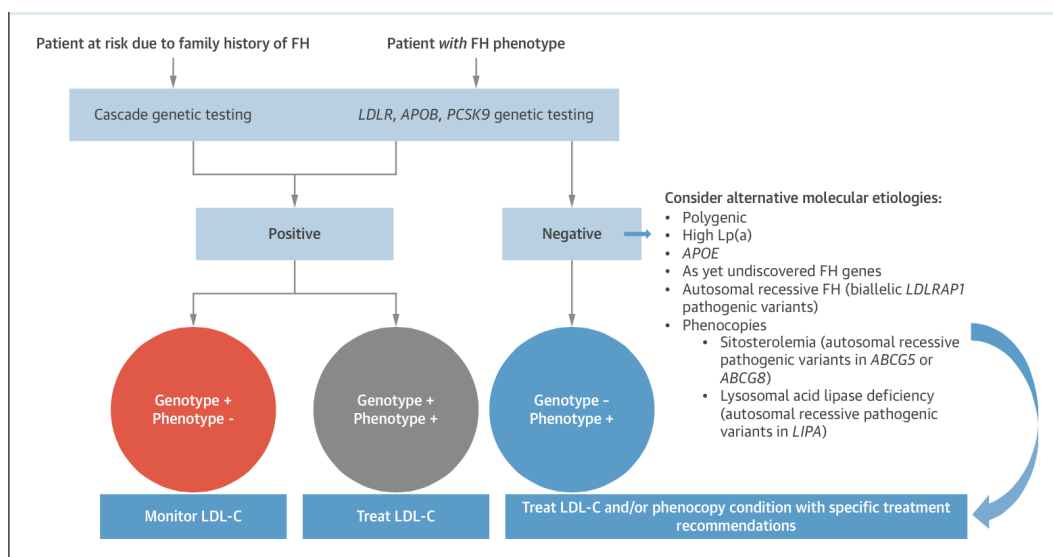
## **2.9 Screening a cascata**

L'approccio più conveniente per l'identificazione di nuovi soggetti FH è lo screening a cascata dei familiari di probandi (casi indice) conosciuti (Figura 13). Lo screening a cascata è risultato fattibile e accettabile in Europa sia per soggetti con FH che per i medici in conformità con le raccomandazioni di tutte le recenti linee guida sulla FH. Perché sia cost-effective, lo screening a cascata dovrebbe essere sistematico e coordinato a livello centrale da un centro specializzato e realizzato utilizzando una combinazione di profili dei lipidi plasmatici e test genetici; tuttavia, se la mutazione non è nota o i test genetici di screening non sono disponibili, può essere eseguito utilizzando i soli profili lipidici plasmatici. L'esecuzione a cascata dei test nelle famiglie con una mutazione causativa nota è stata attuata con grande successo nei Paesi Bassi nel corso degli ultimi 15 anni, utilizzando operatori qualificati in campo genetico, e ha portato all'individuazione di circa il 71% degli individui con FH teoricamente previsti nel Paese (Figura 1).

Sebbene esistano diversi gruppi di criteri diagnostici FH, non esiste un consenso internazionale su quale serie di criteri sia superiore. L'uso di strumenti diagnostici che si basano sulla presenza di caratteristiche fisiche, CAD precoce e storia familiare limita l'efficacia diagnostica e l'obiettivo di identificare tutti i pazienti con FH perché sebbene questi strumenti abbiano una specificità superiore, hanno una sensibilità inferiore. La precisione diagnostica è fondamentale; tuttavia, per identificare meglio e successivamente trattare lo spettro di pazienti con FH (compresi quelli con una variante o varianti patogenetiche identificabili [genotipo positivo], quelli senza [fenotipo positivo, genotipo negativo] e coloro che non sono sottoposti a test genetici), dovrebbero essere utilizzate entrambe le definizioni genotipo-positivo e fenotipo-positivo di FH (Figura 16). L'affermazione scientifica dell'American Heart Association sull'FH presenta una classificazione clinica di FH focalizzata sull'ipercolesterolemia nel probando (o caso indice) e la presenza di una storia familiare positiva di ipercolesterolemia o

CAD precoce (Fenotipico FH), così come la presenza di informazioni sulle mutazioni genetiche (genotipo-positivo FH) [58].

Tutti questi fattori, insieme a una generale mancanza di consapevolezza, contribuiscono al tasso molto basso di diagnosi formale di FH negli Stati Uniti e nel mondo [59]. I test genetici aiutano la diagnosi FH identificando quelli con varianti patogene che non soddisfano i criteri diagnostici basati su livelli lipidici, caratteristiche cliniche e fisiche e / o storia familiare. Pertanto, una spiegazione razionale dei test genetici FH è quella di facilitare la diagnosi di FH in coloro che potrebbero non essere stati altrimenti diagnosticati con FH.



**Figura 16.** Differenti categorie di pazienti che si sottopongono a test genetico. Gli individui a rischio a causa della storia familiare così come gli individui con un fenotipo FH possono sottoporsi a test genetici per la ricerca di FH. I risultati di questo test possono risultare in 3 categorie di individui: 1) genotipo positivo, negativo al fenotipo; 2) genotipo positivo, fenotipo positivo; e 3) genotipo negativo, fenotipo positivo. In alcuni casi, dovrebbero essere esplorate eziologie molecolari alternative. Tratto da Sturm et al. J Am Coll Cardiol. 2018; 72(6): 662-80.

Il test genetico fornisce informazioni prognostiche e la capacità di eseguire raffinate stratificazioni del rischio. All'interno delle popolazioni di coorte caso-controllo dell'infarto del miocardio genetico, il rischio di CAD era più alto nei portatori varianti patogenetici FH rispetto ai non portatori a qualsiasi valore di LDL-C [60].

Rispetto ad un gruppo di riferimento con livelli di LDL-C <130 mg / dl e nessuna variante patogena, gli individui con livelli di LDL-C ≥ 190 mg / dl e nessuna

variante patogenetica FH presentavano un rischio 6 volte maggiore per CAD, mentre quelli con I livelli di LDL-C  $\geq 190$  mg / dl e una variante patogenetica FH hanno mostrato un rischio aumentato di 22 volte per il CAD. La presenza di una variante patogenetica FH aumenta il rischio CAD > 3 volte allo stesso livello di LDL-C, presumibilmente correlato a una maggiore esposizione permanente a livelli elevati di LDL-C. Anche per quelli con livelli di LDL-C <190 mg / dl, e <130 mg / dl, il rischio CAD è più alto in quelli con una variante patogenetica FH rispetto a quelli senza.

Risultati simili dal Giappone confermano che la conoscenza dello stato di variante patogenetica dell'FH consente l'identificazione di individui con il più alto rischio di CAD fornendo ulteriori informazioni sul rischio oltre a quelle previste dai soli dati clinici, compresi i livelli di LDL-C [61].

Il tipo specifico di variante patogena e la sua gravità (vale a dire, LDLR-difettoso vs. recettore-null) è associato al grado di ipercolesterolemia e al rischio di sviluppo di CAD, incluso il rischio precoce di CAD; le varianti nulle LDLR sono le varianti di LDLR più severe [62, 60] mentre le non nulle, nonché le varianti patogene di APOB e PCSK9, generalmente si presentano con un fenotipo più lieve [62]. È stato anche dimostrato che il tipo di variante patogena è un predittore indipendente del raggiungimento degli obiettivi del trattamento con LDL-C [63]. Inoltre, la gravità dell'aterosclerosi coronarica e carotidea è risultata più elevata nei soggetti con FH monogenico rispetto a quelli con un livello di LDL-C elevato a causa di un'eziologia poligenica [64]. Questi risultati rafforzano l'utilità dei test genetici nella fornitura di informazioni sul rischio cardiovascolare oltre a quelle fornite dal solo livello LDL-C.

Inoltre, è stato dimostrato che i test genetici FH hanno un effetto positivo sull'inizio della terapia ipocolesterolemizzante (LLT), sull'aderenza alla terapia e sulla riduzione dell'LDL-C [65,66]. Anche nei pazienti con FH che stavano già ricevendo LLT, sono stati osservati effetti significativi sui livelli plasmatici di LDL-C dopo la conferma mediante test genetici [67]. In Norvegia, la percentuale che riceve LLT è aumentata dal 53% al momento dei test genetici all'89%, con una riduzione del 21% del colesterolo totale nel siero 6 mesi dopo il test [68].

Pertanto, un'ulteriore motivazione per i test genetici FH è che il rilevamento di una variante patogenetica indica un rischio cardiovascolare più elevato e la

necessità di una riduzione più aggressiva di LDL-C e che un risultato positivo del test genetico aumenta l'iniziazione e l'aderenza al LLT.

La Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA) ha proposto nel 2009 di stabilire un protocollo allo scopo di facilitare la diagnosi clinica e genetica delle dislipidemie, chiamato LIPIGEN (Lipid TrasPort Disorders Italian GENetic Network) [69]. La rete consiste in circa quaranta centri clinici italiani con una lunga esperienza nell'identificazione e nella gestione di pazienti con dislipidemie primarie inclusi pazienti pediatrici e in LDL aferesi (Figura 17).



**Figura 17.** Mappa delle sedi dei Centri Clinici Italiani partecipanti al LIPIGEN Network. Tratto da Averna et al [69].

Lo scopo del LIPIGEN Network è quello di identificare e registrare pazienti con FH e altre dislipidemie familiari in Italia. La diagnosi clinica di FH è basata sul Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) che indica la probabilità di FH. I criteri DLCNS permettono di selezionare individui/famiglie con una certa o probabile diagnosi di FH ( $\text{DLCNS} \geq 6$ ) nei quali il test genetico molecolare risulta più fortemente raccomandato. Dal 2012 al 2016 sono stati inclusi in database i dati clinici e biumorali di 3480 soggetti; il 56.1% aveva un DLCNS score  $\geq 6$ , il 23.6% uno score tra 6 e 8 (probabile FH) e il 32.5% uno score  $> 8$  (certa FH). Le analisi genetiche sono state eseguite nel 97.8% dei soggetti, con un tasso di

rilevazione delle mutazioni di 92% nei pazienti con DLCNS score  $\geq 6$ ; più del 98% dei pazienti con diagnosi genetica erano portatori di mutazioni a carico del gene del recettore delle LDL (LDLR), 49 (1.7%) erano veri omozigoti, 46 (1.6%) eterozigoti composti e 28 (1.0%) doppi eterozigoti [69].

## **2.10 Trattamento**

Sia in “2016 EAS/ESC guidelines for the management of dyslipidaemias” [49], sia in “American Heart Association/American College of Cardiology (AHA/ACC) guidelines on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic CV risk in adults” [70], l’importanza di ridurre i livelli di LDL-C per prevenire la CVD (cardiovascular disease, malattia cardiovascolare) è pesantemente sottolineato. Viene data particolare importanza ai risultati di studi sistematici che confermano la relazione tra la riduzione dei livelli di LDL-C dose-dipendente e la riduzione della CVD; maggiore è la riduzione del LDL-C maggiore è la riduzione del rischio cardiovascolare [71, 72]. Gli obiettivi di trattamento si basano sui dati di ampi studi condotti su individui non FH. In questi lavori si è dimostrato che per ogni riduzione della concentrazione di colesterolo delle LDL pari a 1 mmol/L (equivalente a circa 40 mg/dl) è associata a una riduzione del 22% della mortalità cardiovascolare e del 12% della mortalità totale in 5 anni. Le metanalisi hanno dimostrato che un’ulteriore riduzione del colesterolo delle LDL (fino a 1-2 mmol/L, equivalenti a circa 40-80 mg/dl) con una terapia ipocolesterolemizzante più intensiva riduceva l’incidenza di eventi cardiovascolari maggiori (eventi coronarici maggiori, rivascolarizzazione e ictus ischemico); inoltre hanno riscontrato che la relazione tra la riduzione assoluta di colesterolo delle LDL e la riduzione proporzionale del rischio cardiovascolare è coerente confrontando gli studi con terapia intensiva con statine rispetto a quelli con terapia meno intensiva e confrontando quelli con terapia standard con statine rispetto ai controlli; è emerso inoltre come questa ulteriore riduzione nel rischio cardiovascolare possa essere ottenuta in sicurezza anche in soggetti con bassi livelli di colesterolo delle LDL [73]. Non sono stati stabiliti livelli di colesterolo delle LDL sotto i quali cessino i benefici e compaiano effetti avversi [49].

Si raccomandano i seguenti obiettivi di colesterolo LDL nei pazienti FH, in accordo con le recenti linee guida EAS/ASC [49]:

1. bambini < 3,5 mmol/L (<135 mg/dL);
2. adulti < 2,5 mmol/L (<100 mg/dL);
3. adulti con CHD o diabete <1,8 mmol/L (<70 mg/dL).

Per ragioni etiche, non sono stati condotti trial randomizzati finalizzati a documentare i benefici della terapia ipolipemizzante specificamente nei soggetti FH; tuttavia, gli obiettivi di trattamento si basano sui dati di ampi “trials” condotti su individui non FH [73]. Tutti gli individui con FH al di sotto dei 40 anni dovrebbero essere considerati a rischio cardiovascolare molto elevato, essendo stati esposti ad alti livelli di colesterolo LDL sin dalla nascita [74] (Figura 15).

I primi interventi raccomandati per i soggetti con FH e per le loro famiglie comprendono gli interventi sullo stile di vita [75], inclusi interventi sul fumo, sulla dieta e sull'attività fisica. I fumatori devono smettere di fumare; la raccomandazione rivolta a bambini e giovani adulti di non iniziare a fumare è particolarmente importante. Quando è possibile, si deve favorire l'adozione di una dieta sana, anche con l'ausilio di un dietista, con il coinvolgimento di tutta la famiglia; è consigliato tenere una registrazione completa delle abitudini alimentari e i consigli dietetici dovrebbero essere individualizzati. Possono essere presi in considerazione alimenti funzionali noti per abbassare il colesterolo LDL, come steroli, stanoli vegetali e riso rosso fermentato, che tuttavia non consentono una sufficiente riduzione del colesterolo. L'obiettivo principale della consulenza nutrizionale è quello di evitare il sovrappeso e ridurre la quantità di cibo e bevande con elevato contenuto di colesterolo, grassi saturi e grassi trans. Deve essere prescritto un esercizio fisico regolare di tipo aerobico. Negli adulti con FH, la valutazione della funzione cardiovascolare deve essere effettuata prima di iniziare a praticare qualsiasi tipo di esercizio fisico impegnativo.

La terapia con farmaci ipolipemizzanti deve essere iniziata immediatamente al momento della diagnosi negli adulti ed è fortemente raccomandata a 8-10 anni nei bambini, insieme alle modifiche dello stile di vita.

La priorità per la farmacoterapia dovrebbe essere:



- Bambini <14 anni:

1. statine
2. ezetimibe
3. resine sequestranti gli acidi biliari
4. terapia di combinazione.

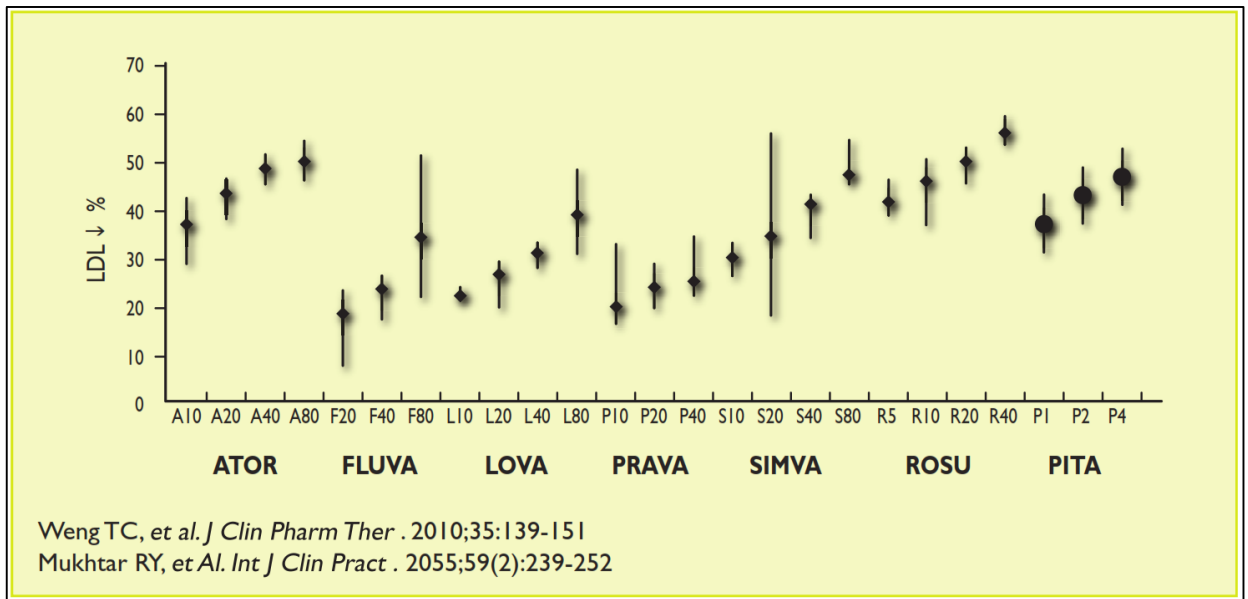
Le statine per i bambini <14 anni dovrebbero essere solo quelle indicate come più sicure sulla base delle evidenze dei trials.

- Adulti e adolescenti con età superiore a 14 anni:

1. statina ad alta efficacia alla massima dose
2. ezetimibe
3. resine sequestranti gli acidi biliari
4. fibrati (se trigliceridi elevati)
5. LDL aferesi negli omozigoti (anche di età <14 anni) e negli eterozigoti con CHD resistenti al trattamento
6. nuove terapie.

### **2.10.1 Statine**

Le statine riducono la sintesi del colesterolo nel fegato inibendo in modo competitivo l'attività di HMG-CoA (idrossimetilglutaril-coenzima A) reduttasi. La riduzione della concentrazione intracellulare di colesterolo induce un aumento dell'espressione dell'LDLR sulla superficie degli epatociti, con un conseguente aumento dell'uptake di colesterolo delle LDL dal sangue e una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo delle LDL e delle altre lipoproteine contenenti apoB, incluse le particelle ricche in trigliceridi. Il grado di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL è dose-dipendente e varia per le differenti statine (Figura 18) [49].



**Figura 18.** Equivalenza terapeutica delle principali statine. ATOR = atorvastatina; FLUVA = fluvastatina; LOVA =lovastatina; PRAVA = pravastatina; SIMVA = simvastatina; ROSU = rosuvastatina; PITA = pitavastatina. Tratto da Catapano et al. [49].

Secondo le linee guida dell’America Heart Association (ACC/AHA) si distingue terapia con statine ad alta, media e bassa efficacia in base alla percentuale stimata di riduzione di colesterolo delle LDL (Figura 19). Si considera terapia ad alta efficacia, ossia in grado di ottenere una riduzione del colesterolo delle LDL di almeno il 50%, quella con atorvastatina 40 o 80 mg o rosuvastatina 20 o 40 mg. Si intende invece terapia a media intensità, cioè in grado di ridurre il colesterolo delle LDL dal 30 al 50%, quella con atorvastatina 10-20 mg, rosuvastatina 5-10 mg, simvastatina 20-40 mg, pravastatina 40-80 mg, lovastatina 40 mg, fluvastatina 80 mg o pitavastatina 2-4 mg. Si ritiene infine terapia a bassa efficacia, ovvero in grado di determinare una riduzione di colesterolo delle LDL inferiore al 30%, quella con simvastatina 10 mg, pravastatina 10-20 mg, lovastatina 20 mg, fluvastatina 20-40 mg, pitavastatina 1 mg. Sebbene la terapia con simvastatina 80 mg/die sia stata valutata in studi randomizzati controllati, la Food and Drug Association non raccomanda l’inizio o la titolazione di tale dosaggio a causa dell’aumento del rischio di miopatia e rhabdomiolisi [76].

<b><u>Terapia con statina</u></b>	<b><u>Dose giornaliera</u></b>		
	<b>Alta efficacia</b>	<b>Media efficacia</b>	<b>Bassa efficacia</b>
<b><i>Atorvastatina</i></b>	40-80 mg	10-20 mg	-
<b><i>Rosuvastatina</i></b>	20-40 mg	5-10 mg	-
<b><i>Simvastatina</i></b>	-	20-40 mg	10 mg
<b><i>Pravastatina</i></b>	-	40-80 mg	10-20 mg
<b><i>Lovastatina</i></b>	-	40 mg	20 mg
<b><i>Fluvastatina</i></b>	--	80 mg	20-40 mg
<b><i>Pitavastatina</i></b>	-	2-4 mg	1 mg

**Figura 19.** Suddivisione della terapia con statine in base ad alta, media e bassa efficacia. Adattato da Stone et al.[76].

C'è inoltre una quota considerevole di variabilità individuale nel grado di riduzione dei livelli di LDL-C con la stessa dose di farmaco [77]. Una scarsa risposta al trattamento con statine negli studi clinici è in alcuni casi dovuta a scarsa compliance terapeutica, ma può essere spiegata anche da un background genetico che generi mutazioni nell'ambito di geni implicati nel metabolismo del colesterolo, nell'assorbimento delle statine e nel metabolismo epatico [78,79].

Molti studi su larga scala hanno dimostrato che le statine riducono la mortalità e la morbilità cardiovascolare sia in prevenzione primaria che secondaria, indipendentemente da età e sesso [71,72, 80]. Oltre alla riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL che il principale effetto delle statine, sono stati suggeriti altri effetti importanti di questi farmaci, i cosiddetti effetti pleiotropici, tra i quali l'effetto antinfiammatorio e antiossidante [81, 82]. Tali effetti sono stati dimostrati in studi in vivo e in vitro ma la loro rilevanza clinica rimane controversa [83].

### ***Effetti collaterali della terapia con statine.***

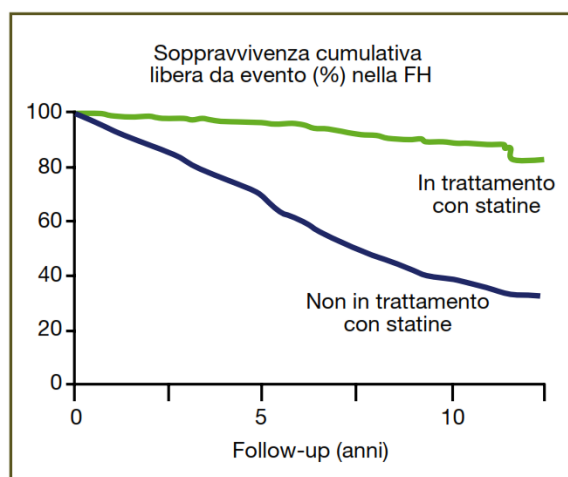
I **sintomi muscolari** sono l'effetto avverso più comune e clinicamente rilevante della terapia con statine. La forma di miopatia indotta da statine più severa è la rabdomiolisi, caratterizzata da forte dolore muscolare, necrosi muscolare e mioglobinuria, e può potenzialmente condurre a insufficienza renale e morte. Nella rabdomiolisi i livelli plasmatici di CPK aumentano a partire da un minimo di 10 volte, ma spesso anche oltre le 40 volte rispetto ai valori normali [84]. La frequenza dei casi di rabdomiolisi è stimata intorno a 1 – 3 casi/100.000 pazienti all'anno [85]. Una forma più comune di effetto avverso muscolare è la mialgia in assenza di aumento di CPK o perdita funzionale maggiore. L'attuale frequenza di tale effetto avverso è tuttavia spesso non chiaro e varia in differenti riferimenti bibliografici. Nelle meta-analisi di trials randomizzati controllati, non si è dimostrata un aumento della frequenza nei gruppi trattati con statine [86,87]. La diagnosi è basata sull'osservazione clinica e quando i sintomi scompaiono alla sospensione della terapia con statine, ricomparendo alla ripresa della terapia stessa. In pazienti con elevato rischio per CHD, è essenziale confermare la diagnosi prima di lasciare i pazienti senza il beneficio del trattamento con statine.

**Danno epatocellulare.** L'attività plasmatica dell'ALT è comunemente usata per dimostrare il danno epatocellulare. Un lieve aumento dell'ALT si verifica nel 0.5 – 2% dei pazienti in trattamento con statine, soprattutto nelle statine a maggiore efficacia e ad alto dosaggio. La comune definizione di aumento di ALT clinicamente rilevante è pari ad almeno 3 volte oltre i livelli normali in due occasioni. Un lieve aumento di ALT non è associato a reale epatotossicità o alterazione nella funzionalità epatica. La progressione a insufficienza epatica è eccezionalmente rara, perciò il monitoraggio di routine dei valori plasmatici di ALT in corso di terapia con statine non è più raccomandato [88]. I pazienti con aumento dei valori di ALT dovuto a steatosi epatica sono stati studiati durante terapia con statine e non c'è indicazione sul fatto che tale trattamento causi un peggioramento della funzionalità epatica [89-91].

Si è dimostrato che pazienti in terapia con statine possano presentare un aumento del rischio di sviluppo di **diabete mellito tipo 2**; tale rischio è tuttavia maggiore nel caso di utilizzo di statine ad alto dosaggio [92], e il rischio di diabete è maggiore in pazienti più anziani e in presenza di altri fattori di rischio per diabete come sovrappeso o insulino-resistenza [93].

L'effetto delle statine sulla *funzionalità renale* è ancora dibattuto. E' stato riportato un aumento della frequenza di proteinuria, ma è stato osservato per tutte le statine, ma soprattutto per la rosuvastatina, probabilmente perché legato agli alti dosaggi (80 mg). La proteinuria indotta dalle statine è di origine tubulare e si suppone sia dovuta a un ridotto riassorbimento tubulare e non a una disfunzione glomerulare [94]. Nei trials clinici la frequenza di proteinuria è in generale bassa e in molti casi non maggiore rispetto al placebo [95].

La terapia appropriata per pazienti con dislipidemia familiare può essere atorvastatina 40 o 80 mg oppure rosuvastatina 20 o 40 mg; simvastatina 80 mg non deve essere usata, poiché questa dose è stata associata ad elevato rischio di miosite e rhabdmiolisi. Le statine sono farmaci di prima scelta a causa delle numerose e consistenti evidenze di riduzione statine-mediata degli eventi cardiovascolari maggiori [73, 96-98]. L'introduzione delle statine ha anche ridotto gli eventi coronarici in soggetti con FH tanto che il trattamento prima dell'insorgenza di CHD porta ad una sopravvivenza libera da CHD simile a quella della popolazione generale (Figura 20).



**Figura 20.** Stima cumulativa di sopravvivenza libera da malattia coronarica (tramite curva di Kaplan-Meier) negli individui con FH in base al trattamento con statine ( $p < 0,001$  per la differenza). Basato su 413 e 1537 soggetti olandesi con FH eterozigote con o senza trattamento con statine. Adattato da Versmissen et al. [3] Tratto da Averna et al. [99].

Tuttavia, meno di un soggetto con FH su 20 raggiunge l'obiettivo raccomandato di colesterolo LDL. Pertanto, dato che la maggior parte dei soggetti FH ha bisogno di ridurre il colesterolo LDL di almeno il 50%, molti soggetti FH ricevono dosi di statine basse o intermedie, insufficienti per conseguire gli obiettivi di livelli ottimali di LDL, molti medici non titolano la dose di farmaco

nonostante risultati subottimali, si consiglia di iniziare la terapia farmacologica in adulti con FH con la dose massima di una statina ad alta efficacia.

La valutazione clinica di efficacia e sicurezza è consigliabile dopo 4-6 settimane dall'inizio del trattamento [99].

### **2.10.2 Ezetimibe**

Nonostante l'utilizzo delle più alte dosi di statine ad alta efficacia, molti soggetti con FH non raggiungeranno l'obiettivo terapeutico in termini di colesterolo delle LDL con la sola monoterapia. In questa situazione è raccomandata la cosomministrazione di un inibitore di assorbimento del colesterolo, come ezetimibe. Questa combinazione di farmaci riduce il colesterolo LDL fino a circa 60-70%.

L'ezetimibe è il primo farmaco ipolipemizzante che inibisce l'assorbimento intestinale del colesterolo alimentare e biliare senza influire nell'assorbimento di altri nutrienti liposolubili. Inibendo l'assorbimento del colesterolo a livello dell'orletto a spazzola dell'intestino, l'ezetimibe riduce la quota di colesterolo distribuita al fegato, e di conseguenza il fegato risponde riducendo l'espressione di LDLR, provocando un aumento della clearance del colesterolo delle LDL dal circolo [49].

### **2.10.3 Resine sequestranti acidi biliari.**

Gli acidi biliari sono sintetizzati nel fegato a partire dal colesterolo e vengono rilasciati a livello del lume intestinale, ma una quota importante ritorna al fegato tramite l'assorbimento nell'ileo terminale. I farmaci sequestranti acidi biliari non sono assorbiti o alterati dagli enzimi digestivi, per cui il loro effetto benefico è indiretto: legando gli acidi biliari, i farmaci prevengono la loro entrata in circolo. La riduzione della quota di acidi biliari che ritorna al fegato induce una stimolazione dell'enzima responsabile della sintesi di acidi biliari a partire dal colesterolo (CYP7A1), e ciò si traduce in un aumento compensatorio dell'attività

del LDLR, che potenzia quindi l'assorbimento di LDL-C dal circolo, riducendo i suoi livelli plasmatici [49].

Per i soggetti a rischio molto elevato con CHD nota o diabete di tipo 2 e con colesterolo LDL al di sopra di 1,8 mmol/L (70 mg/dL), è consigliata l'aggiunta di una resina sequestrante gli acidi biliari (colestiramina, colestipolo o colesevelam) quando si rende necessario un terzo farmaco [99].

Gli effetti avversi gastrointestinali (soprattutto flatulenza, costipazione, dispepsia e nausea) sono spesso presenti con questi farmaci, anche per bassi dosaggi, e ciò ha limitato il loro utilizzo nella pratica clinica [49].

#### **2.10.4 LDL-afèresi.**

In individui con FH ad altissimo rischio cardiovascolare e/o con CHD, e con elevati livelli di colesterolo LDL nonostante la terapia, o con intolleranza alle statine, deve essere considerato il trattamento aggiuntivo con LDL-afèresi. L'afèresi settimanale o bi-settimanale riduce il colesterolo LDL del 50-70% e ha benefici clinici in soggetti con FH grave [100]. Le soglie per l'inizio della procedura di afèresi variano da Paese a Paese.

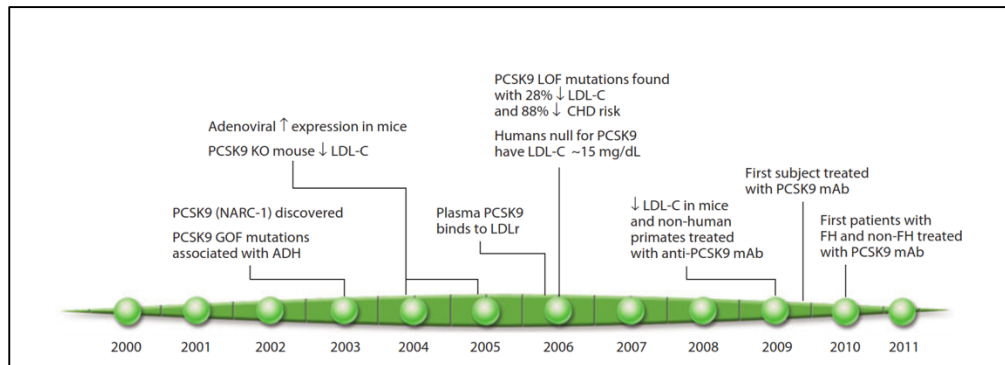
### **2.10.5 I nuovi farmaci ipolipemizzanti**

Lo studio PURE [101] condotto in diversi continenti, con differenti condizioni socio-economiche, ha dimostrato che l'impiego di statine è largamente sottoutilizzato nei pazienti in prevenzione secondaria, anche nei paesi ad elevato sviluppo economico raggiunge solo il 71%. I dati europei forniti dall'ultimo registro EUROASPIRE III [102] indicano un sostanziale miglioramento della prescrizione di statine in prevenzione secondaria rispetto alla precedente rilevazione, anche se la maggioranza dei pazienti rimane con livelli di colesterolo delle LDL >70 mg/dl. Un recente studio italiano [103] condotto su tutta la penisola in circa 900 pazienti con precedenti eventi ischemici cardiovascolari, valutati ad una mediana di 17 mesi dall'evento indice, ha riportato che il 91% di essi continua ad assumere statine, confermando i dati della coorte italiana dell'EUROASPIRE, ma solo il 37% dei pazienti non diabetici ed il 44% dei pazienti diabetici raggiunge livelli di colesterolo delle LDL <70 mg/dl. I motivi del mancato raggiungimento dei target sono molteplici e riguardano aspetti differenti, che vanno dalla sospensione del farmaco al non corretto impiego delle statine attualmente disponibili [104-106]. Da questi dati emerge la necessità di terapie diverse da quella statinica che, con meccanismi d'azione differenti, possano contribuire a portare agli obiettivi raccomandati i pazienti ad elevato rischio cardiovascolare. I farmaci attualmente in sviluppo hanno caratteristiche farmacodinamiche completamente differenti dagli inibitori della 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reduttasi e sono rappresentati dagli oligonucleotidi diretti al blocco della trascrizione dell'mRNA per l'apolipoproteina B (ApoB, mipomersen), dagli inibitori delle proteine microsomiali che trasferiscono i trigliceridi e intervengono nella formazione dell'ApoB a livello epatico ed intestinale (lomitapide) e dagli inibitori di PCSK9. Di questi, il mipomersen non è stato approvato per l'uso in Europa, la lomitapide è stata sviluppata ed è approvata solo per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare omozigote, mentre gli anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9 rappresentano i farmaci di maggiore interesse in fase di sviluppo clinico avanzato per il trattamento dei pazienti ad alto rischio [107].



## La scoperta di PCSK9

La scoperta e la validazione del ruolo di PCSK9 nel metabolismo lipidico e il conseguente sviluppo della terapia con anticorpi monoclonali rappresenta uno dei più importanti esempi di medicina transazionale dell'ultimo decennio (Figura 21).



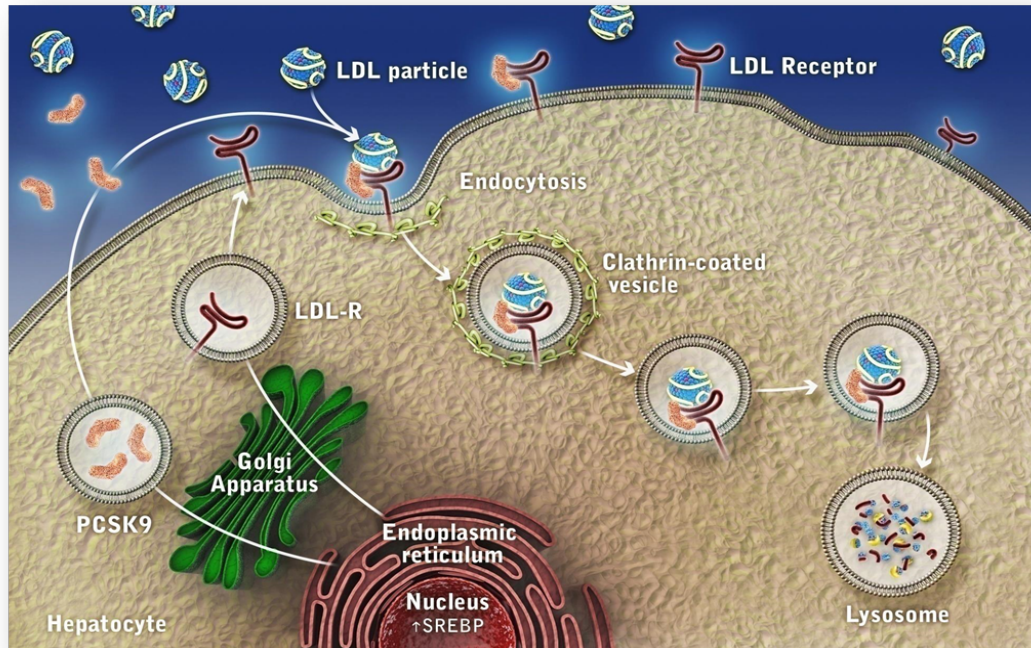
**Figura 21.** PCSK9: rapida progressione dalla scoperta al trattamento. ADH=autosomal dominant hypercholesterolemia; CHD=coronary heart disease; FH=familial hypercholesterolemia; GOF=gain of function; KO=knockout; LDL-C=low-density lipoprotein cholesterol; LDLr=low-density lipoprotein receptor; LOF=loss of function; mAb= monoclonal antibody.

Questo rapido sviluppo iniziò in Francia nel 2003, quando Abifadel e colleghi studiarono una famiglia che sembrava avere tutti gli aspetti fenotipici dell'FH, risultando però negativa alla ricerca di mutazioni note per il recettore delle LDL (LDLR) o per apolipoproteina B (APOB). Vennero dunque identificate due mutazioni missenso che aumentavano l'attività di PCSK9, una proteina all'epoca solo recentemente scoperta e inizialmente chiamata NARC-1 [24]. La mutazione "gain of function" determinava una sostituzione amminoacidica (S127R e F216L) senza determinare modificazioni nel gene di LDLR o APOB, ma inducendo un fenotipo clinico tipico dell'ipercolesterolemia autosomica dominante. Maxwell & Breslow negli Stati Uniti studiarono poi topi transgenici con overespressione di PCSK9 e riportarono che in tali casi la funzione di LDLR era inibita, determinando elevati livelli plasmatici di colesterolo LDL [108]. Ancora però non era noto il motivo per cui PCSK9 riducesse l'attività di LDLR. Poco dopo Rashid e co. mostrarono con topi knock-out che se la produzione di PCSK9 veniva eliminata, l'attività di LDLR veniva sostanzialmente potenziata e si riducevano i livelli plasmatici di colesterolo LDL [109]. Queste osservazioni nei modelli animali portarono allo sviluppo di successivi studi umani, e nel 2006 Cohen et al. [110] pubblicarono dati provenienti da un largo studio longitudinale epidemiologico in ambito cardiovascolare, nel quale si esaminarono famiglie con

bassi livelli plasmatici di colesterolo LDL e si trovarono mutazioni in PCSK9 “loss-of-function”. Non era ancora evidente però il meccanismo mediante il quale PCSK9 determinasse una riduzione dell’attività dell’LDLR. Questo venne elucidato nel 2006, quando Lagace et al. [111] dimostrarono che PCSK9 plasmatica legando LDLR determinava la sua internalizzazione e conseguente degradazione, prevenendo il suo riciclo e riducendone quindi l’espressione sulla membrana cellulare. Tale informazione fu fondamentale per stimolare la ricerca di possibili metodi per inibire PCSK9. Entro un anno furono sviluppati anticorpi monoclonali che dimostrarono sia in topi sia in primati non umani di essere efficaci nel legame con PCSK9, prevenendo il legame con LDLR e riducendo di conseguenza i livelli plasmatici di colesterolo delle LDL [112]. Nel 2009 venne prodotto un anticorpo monoclonale antiPCSK9 completamente umanizzato e fu per la prima volta somministrato a un umano. Il vantaggio dell’anticorpo monoclonale completamente umanizzato è che, a differenza di quello umanizzato e chimerico, non contiene alcuna componente proteica murina, ed evita quindi la maggior parte delle reazioni locali legate a questa prima generazione di anticorpi. All’inizio del 2012 fu pubblicato il primo lavoro che dimostrava come dosi singole e multiple di anticorpi monoclonali anti-PCSK9 portassero ad una riduzione drammatica dei livelli di colesterolo LDL [113].

### **Ruolo di PCSK9**

PCSK9 è primariamente sintetizzata nel piccolo intestino e nel fegato [114]. Dopo una scissione autocatalitica intracellulare del suo prodominio, la PCSK9 matura è secreta dalle cellule epatiche [115]. Studi animali hanno dimostrato che il legame tra PCSK9 e LDLR induce la degradazione lisosomiale del recettore stesso, suggerendo un meccanismo mediante il quale PCSK9 potesse influire sul metabolismo del colesterolo [116]. In assenza di PCSK9, LDLR epatico è riportato sulla membrana plasmatica dopo aver distribuito il colesterolo al lisosoma per la degradazione. Il legame di PCSK9 previene che il LDLR venga riportato sulla membrana plasmatica e ne induce invece la degradazione [117] (Figura 22).



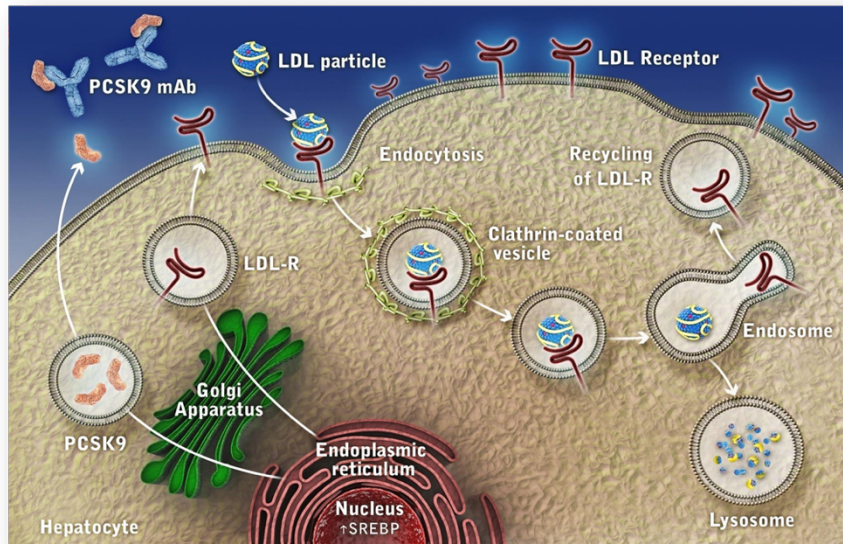
**Figura 22.** Meccanismo d'azione di PCSK9 nel modulare l'espressione di LDLR sulla membrana plasmatica degli epatociti.

L'espressione di PCSK9 e di LDLR è in entrambi i casi primariamente regolata dai livelli intracellulari di colesterolo tramite SREBP-2 (transcription factor sterol-responsive element binding protein-2). Di conseguenza, riducendo i livelli intracellulari epatici di colesterolo, l'effetto benefico delle statine sull'espressione del LDLR è parzialmente contrastata dall'aumentata espressione di PCSK9. Infatti, diversi studi hanno dimostrato una relazione positiva tra il trattamento con statine e i livelli circolanti di PCSK9 [118]. L'inibizione di PCSK9 potrebbe dunque potenzialmente esercitare un effetto sinergico con le statine.

### **Inibitori di PCSK9: meccanismo d'azione**

Gli inibitori di PCSK9 interferiscono con il ricircolo di LDLR aumentando la loro espressione sulla superficie cellulare degli epatociti con conseguente riduzione dei livelli circolanti di colesterolo delle LDL. In condizioni fisiologiche il LDLR presenta nella sua conformazione un dominio per l'APOB che consente il legame con il colesterolo delle LDL e l'internalizzazione del complesso LDL/LDLR il quale viene inglobato in una vescicola rivestita da clatrina che viene ad essere dissociata all'interno degli endosomi per la presenza di un ambiente acido [119,120]. La dissociazione lascia libero il LDLR di tornare sulla superficie cellulare con un meccanismo di ricircolo, mentre il colesterolo delle LDL libero

viene trasportato ai lisosomi dove viene degradato a lipidi ed aminoacidi [119]. Gli anticorpi monoclonali contro PCSK9 determinano una maggiore espressione genica a livello epatico dell'LDLR, con conseguente pronunciato effetto ipocolesterolemizzante che deriva da un aumento dei processi di internalizzazione delle LDL (Figura 24).



**Figura 24.** Impatto dell'Anticorpo contro PCSK9 sull'Espressione del Recettore delle LDL. PCSK9 mAb = anticorpo monoclonale anti-PCSK9.

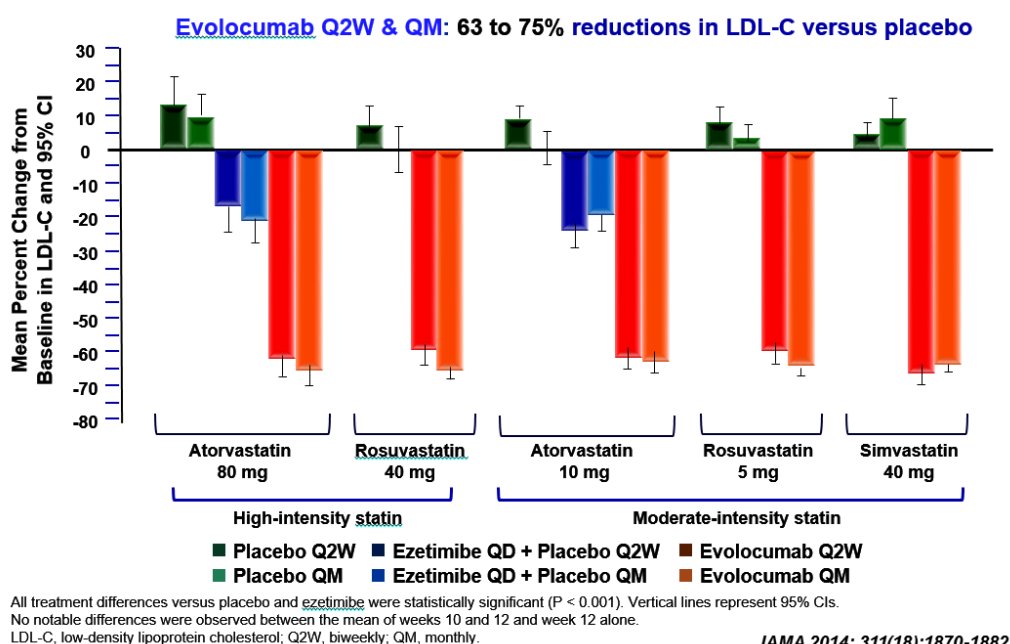
Nello studio ARIC [121], una popolazione di soggetti afroamericani portatori di una mutazione con perdita di funzione di PCSK9 tale da ridurre di circa 1 mmol/l i livelli di colesterolo delle LDL rispetto ai soggetti con variante genetica normale, ha dimostrato una riduzione degli eventi cardiovascolari maggiori tra i 40 e i 55 anni del 90%.

### **Evolocumab e Alirocumab**

Numerosi anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9 sono in fase di sviluppo, ma attualmente i dati principali provengono dagli studi su due di essi, che sono anticorpi monoclonali di derivazione completamente umana, evolocumab e alirocumab, entrambi attualmente in commercio.

Il recente Studio Clinico Randomizzato LAPLACE-2 (LDL-C Assessment with PCSK-9 Monoclonal Antibody Inhibition Combined With Statin Therapy) [122] è stato disegnato per valutare efficacia e sicurezza di evolocumab rispetto a placebo

o ezetimibe, la più comune terapia prescritta tolte le statine, in pazienti randomizzati a terapia con statine a media o alta efficacia, osservati per un periodo di 12 settimane. In confronto al placebo, con evolocumab, sempre in aggiunta a terapia con statine a media o alta efficacia, si è riscontrata una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL del 66-75% se somministrato ogni 2 settimane e del 63-75% se somministrato una volta al mese. La riduzione di colesterolo delle LDL, aggiuntiva rispetto a quella ottenuta con statine a media e alta efficacia, ottenuta con evolocumab (140 mg ogni 2 settimane o 420 mg sottocute una volta al mese) è risultata fino al 66%, significativamente superiore rispetto a quella ottenuta con ezetimibe 10 mg, che ha dimostrato invece una riduzione ulteriore fino al 24%. Con l'aggiunta di evolocumab la maggior parte dei pazienti (86-94%) ha ottenuto dei livelli di colesterolo delle LDL inferiori a 70 mg/dl tra la 10° e la 12° settimana e alla 12° settimana. Al contrario, nel braccio di terapia con statine a media e alta efficacia ed ezetimibe la percentuale di soggetti che ha raggiunto livelli di colesterolo delle LDL inferiori a 70 mg/dl tra la 10° e la 12° settimana e alla 12° settimana era pari al 17-62% (Figura 25).



**Figura 25.** LAPLACE-2: la risposta in termini di livelli di LDL-C tra la 10° e la 12° settimana nei vari bracci di trattamento.

Inoltre evolocumab è stato ben tollerato, con un tasso di eventi avversi paragonabile a quelli evidenziati con placebo ed ezetimibe per il periodo di

trattamento di 12 settimane. Eventi avversi si sono verificati nel 36% dei pazienti trattati con evolocumab e nel 39% dei pazienti trattati con placebo (Figura 26). Sintomi muscoloscheletrici o cefalea si sono dimostrati come gli eventi avversi più comuni (Figura 26). Gli eventi avversi che hanno determinato l'interruzione dello studio sono stati rispettivamente l'1.9% nel gruppo in terapia con evolocumab, l'1.8% nel gruppo ezetimibe, e il 2.2% nel gruppo placebo. Eventi avversi seri sono stati riportati nel 2.1% dei pazienti trattati con evolocumab, nel 0.9% dei pazienti trattati con ezetimibe e nel 2.3% dei pazienti trattati con placebo (Figura 26). L'aumento dei livelli di ALT oltre le 3 volte rispetto alla norma sono stati non comuni, e l'aumento dei livelli di CPK oltre le 5 volte rispetto alla norma sono stati rari tra i vari gruppi di trattamento. Durante le 12 settimane di trattamento, si sono verificati eventi cardiovascolari significativi nel 0.4% dei pazienti trattati con evolocumab, 0.9% dei pazienti trattati con ezetimibe e 0.4% dei pazienti trattati con placebo. Disturbi neurocognitivi sono stati riportati in 1 paziente trattato con evolocumab (0.1%), 3 pazienti trattati con ezetimibe (1.4%) e nessun paziente trattato con placebo. Reazioni sul sito di iniezione sono state riportate nel 1.3% dei pazienti trattati con evolocumab, nel 0.9% dei pazienti trattati con ezetimibe, e nel 1.4% dei pazienti trattati con placebo. Prima della somministrazione del farmaco, erano stati rilevati anticorpi leganti (binding antibodies) in 3 pazienti poi trattati con evolocumab, e di questi 1 solo ne ha rilevati al termine del protocollo (Figura 26).

n (%)	Any Statin + Placebo (N = 558)	Atorvastatin + Ezetimibe (N = 221)	Any Statin + Evolocumab (N = 1117)
Treatment-emergent AEs	219 (39)	89 (40)	406 (36)
Most common AEs <sup>a</sup>			
Back pain	14 (3)	7 (3)	20 (2)
Arthralgia	9 (2)	4 (2)	19 (2)
Headache	15 (3)	5 (2)	19 (2)
Muscle spasms	6 (1)	6 (3)	17 (2)
Pain in extremity	7 (1)	3 (1)	17 (2)
Serious AEs	13 (2)	2 (1)	23 (2)
AEs leading to study drug discontinuation	12 (2)	4 (2)	21 (2)
Positively adjudicated CV events	2 (0.4)	2 (0.9)	5 (0.4)
CK > 5 x ULN	2 (0.4)	0 (0)	1 (0.1)
ALT or AST > 3 x ULN	6 (1)	3 (1)	4 (0.4)
Potential injection site reactions <sup>b</sup>	8 (1)	2 (1)	15 (1)
Neurocognitive AEs <sup>c</sup>			
Disturbance in attention	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)
Cognitive disorder	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)
Disorientation	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.1)
Post-baseline binding antibodies	NA	NA	1 (0.1) <sup>d</sup>

Figura 26. LAPLACE-2: sicurezza e tollerabilità.

Lo studio inoltre si poneva come obiettivo quello di rispondere alla questione in merito alla sicurezza nell'esposizione a livelli di colesterolo delle LDL molto bassi. Tra i pazienti dello Studio LAPLACE-2 in terapia con evolocumab dal 18% al 25% dei pazienti in terapia basale con statine a media efficacia e il 42% dei pazienti in terapia basale con statine ad alta efficacia hanno raggiunto livelli di colesterolo delle LDL inferiori a 25 mg/dl in almeno due misurazioni consecutive. Uno studio aperto a lungo termine ha dimostrato che evolocumab in aggiunta a terapia basale con atorvastatina era sicuro ed efficace; in questo trial si sono osservati tassi di eventi avversi simili tra pazienti con LDL-C inferiori a 25 mg/dl e pazienti con LDL-C inferiori a 50 mg/dl o 50 mg/dl o superiori [122].

Lo studio MENDEL-2 includeva 625 pazienti con FH che non avevano ricevuto terapia ipolipemizzante fino ai 3 mesi precedenti l'arruolamento, randomizzati nei seguenti gruppi: ezetimibe e placebo sottocutaneo, placebo orale ed evolocumab 140 mg ogni 2 settimane, placebo orale ed evolocumab 420 mg una volta al mese, placebo orale e placebo sottocutaneo. Dopo 12 settimane di trattamento, si è dimostrato come evolocumab determini una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL rispettivamente del 57% e del 55% a seconda della dose ogni 2 settimane o una volta al mese. Inoltre, evolocumab induceva effetti benefici anche sui livelli di altre lipoproteine, in particolare con una riduzione dei livelli di Lp(a) rispettivamente del 20% e del 18% a seconda della dose ogni 2 settimane o una volta al mese. L'incidenza di eventi avversi non era differente nei vari gruppi di trattamento, a sostegno del fatto che evolocumab sia considerato sicuro e ben tollerato [123].

Nello studio GAUSS-2 erano inclusi 307 pazienti ipercolesterolemici che non tolleravano una dose adeguata di almeno due statine, randomizzati a terapia con evolocumab 140 mg ogni 2 settimane, 420 mg una volta al mese, o placebo sottocutaneo oltre a terapia con ezetimibe. Dopo un trattamento di 12 settimane, si è osservata una riduzione media dei livelli di colesterolo delle LDL pari a 38% rispetto a ezetimibe, che corrispondeva a una riduzione rispettivamente del 56% e del 53% rispetto ai livelli di base, a seconda della dose 140 mg ogni 2 settimane o 420 mg una volta al mese. Si è osservata inoltre una riduzione dei livelli di Lp(a) pari rispettivamente al 25% e al 28% rispetto a ezetimibe. Nel complesso,

evolocumab è stato ben tollerato nel 96% dei soggetti e la percentuale di eventi avversi era simile nei vari gruppi [124].

Lo studio Descartes aveva lo scopo di valutare efficacia a lungo termine e sicurezza di evolocumab in un gruppo di 905 soggetti dislipidemicici, ossia con livelli di colesterolo delle LDL > 75 mg/dl e trigliceridemia a digiuno < 400 mg/dl nonostante terapia ipolipemizzante (solo dieta, dieta e atorvastatina 10 mg, atorvastatina 80 mg o atorvastatina 80 mg ed ezetimibe), randomizzati a evolocumab 420 mg una volta al mese o placebo, osservati per 52 settimane, in corso di proseguimento della terapia ipolipemizzante di base. In tale studio evolocumab induceva una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL del 57% rispetto ai livelli di base dopo 52 settimane di trattamento, simili ai livelli osservati dopo 12 settimane. Evolocumab inoltre determinava un miglioramento complessivo del profilo lipidico, inclusi i livelli di Lp(a). Inoltre, nonostante la percentuale di pazienti con riferiti eventi avversi seri sia superiore nei pazienti trattati con evolocumab, non c'è alcuna suggestione sul fatto che tali eventi siano correlati al trattamento [125].

Lo studio RUTHERFORD-2, uno studio randomizzato, in doppio cieco, arruolava 331 pazienti affetti da FH eterozigote che non raggiungevano l'obiettivo terapeutico di colesterolo delle LDL con terapia con statine e l'aggiunta o meno di altri farmaci ipolipemizzanti. I soggetti venivano randomizzati a evolocumab 140 mg ogni due settimane, 420 mg una volta al mese, o placebo e osservati per un periodo di trattamento di 12 settimane. Al termine dello studio, la riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL in terapia con evolocumab rispetto al placebo era rispettivamente pari al 59% e al 61% a seconda della dose ogni 2 settimane o una volta al mese. L'incidenza di eventi avversi era paragonabile nel gruppo in terapia con evolocumab e in quello con placebo, per cui evolocumab era considerato come ben tollerato. I più comuni effetti avversi in entrambi i gruppi erano nasofaringiti (9% dei pazienti in evolocumab e 5% dei pazienti in placebo) e sintomi muscolari (5% dei pazienti in evolocumab e 1% dei pazienti in placebo) [126].

Nello studio TESLA B venivano inclusi 50 pazienti affetti da FH omozigote con età superiore a 12 anni, in corso di terapia intensiva con statine ma non in LDL-



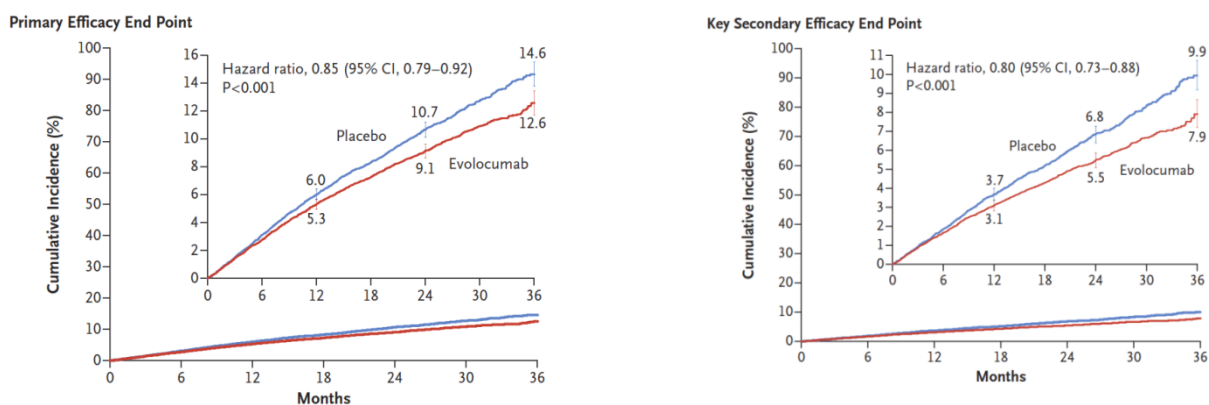
aferesi, con una media di livelli di colesterolo delle LDL pari a 350 mg/dl. Questi soggetti sono stati randomizzati a trattamento con evolocumab 420 mg una volta al mese o placebo, per un periodo di 12 settimane. Rispetto al gruppo in placebo, i soggetti in terapia con evolocumab hanno mostrato una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL pari al 31%. Non sono stati riportati eventi avversi gravi e nessun paziente ha sospeso la terapia con evolocumab in seguito alla comparsa di eventi avversi [127].

Nel complesso, questi sei studi in fase III hanno riportato dati di efficacia di evolocumab in termini di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL in un totale di 4275 pazienti. In particolare in tutti i trials si è osservata, in seguito all'introduzione di trattamento con evolocumab di almeno 12 settimane, una riduzione significativa dei livelli di colesterolo delle LDL in popolazioni differenti con differente terapia ipolipemizzante di base [128].

Per quanto riguarda alirocumab, lo studio ODYSSEY ha reclutato 735 pazienti affetti da FH eterozigote (distinti in FH I, reclutati in 89 centri tra Nord America, Europa e Sud Africa, e FH II, ritrovati in 26 centri in Europa) e inadeguato controllo dei livelli di colesterolo delle LDL in corso di terapia ipolipemizzante massimale tollerata (rosuvastatina 20–40 mg, atorvastatina 40–80 mg, o simvastatina 80 mg con o senza altre terapie ipolipemizzanti; dosaggi inferiori erano accettati qualora giustificati per esempio da intolleranza a statine). Tali soggetti sono stati randomizzati a trattamento con alirocumab 75 mg o placebo ogni 2 settimane e osservati per un periodo di 78 settimane. Alla 12<sup>o</sup> settimana la dose di alirocumab poteva essere potenziata a 150 mg, qualora i livelli di colesterolo delle LDL rilevati all'8<sup>o</sup> settimana fossero  $\geq 70$  mg/dl. In tale studio si dimostrava come i livelli medi di colesterolo delle LDL, nel gruppo randomizzato ad alirocumab FH I, si riducessero da 144.7 mg/dl come livelli di base fino a 71.3 mg/dl alla 24<sup>o</sup> settimana, corrispondenti a una riduzione percentuale pari al 57.9% rispetto al placebo. Nei pazienti randomizzati ad alirocumab FH II si osservava una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL da 134.6 mg/dl fino a 67.7 mg/dl, corrispondente a una riduzione in percentuale pari al 51.4% rispetto al placebo). Tali livelli venivano mantenuti fino alla 78<sup>o</sup> settimana. Livelli di colesterolo delle LDL inferiori a 1.8 mmol/L (circa 70 mg/dl), indipendentemente dal rischio cardiovascolare, venivano raggiunti alla 24<sup>o</sup> settimana dal 59.8% e dal

68.2% dei pazienti trattati con alirocumab, rispettivamente FH I e FH II. Gli effetti avversi che hanno indotto una sospensione della terapia con alirocumab si sono osservati nel 3.4% dei pazienti FH I (rispetto al 6.1% dei pazienti in placebo) e nel 3.6% dei pazienti FH II (rispetto al 1.2% dei pazienti in placebo). La percentuale di reazioni a livello del sito di iniezione nei pazienti trattati con alirocumab era 12.4% nei FH I e del 11.4% nei FH II (in confronto rispettivamente al 11.4% e al 7.4% dei pazienti in placebo) [129].

Lo studio FOURIER (Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subject with Elevated Risk) [130], uno studio clinico internazionale randomizzato, in doppio cieco, con controllo-placebo, ha analizzato 27.564 pazienti tra 40 e 85 anni con malattia cardiovascolare aterosclerotica stabilizzata e livelli di colesterolo delle LDL superiore a 70 mg/dl in terapia massimale con statine con o senza ezetimibe, dei quali 13.784 randomizzati a terapia con evolocumab e 13.780 a placebo. Da tale studio è emerso come l'aggiunta di evolocumab a terapia con statine riduca in modo significativo il rischio di eventi cardiovascolari, in particolare con una riduzione del 15% del rischio in termini di endpoint primario composto di morte cardiovascolare, infarto miocardico, ictus, ospedalizzazione per angina instabile o rivascolarizzazione coronarica, e con una riduzione del 20% nel rischio di endpoint secondario composto di morte cardiovascolare, infarto miocardico, o ictus (Figura 27) [130].



**Figura 27.** Incidenza cumulativa di eventi cardiovascolari distinta tra end-point primari e secondari in terapia con evolocumab confrontata con placebo nello studio FOURIER [130].

Durante una mediana di 26 mesi di follow-up, l'unico effetto avverso che si è notato essere più comune in associazione a evolocumab è collegato a reazioni sul sito di iniezione, ma si è trattato comunque di eventi rari, e la frequenza di sospensione della terapia nel regime di studio non è stata maggiore con evolocumab rispetto al placebo. Inoltre, i dati provenienti da questo studio hanno dimostrato una riduzione dei livelli mediani di colesterolo delle LDL maggiore rispetto ai precedenti trials. Ciò dimostra che pazienti con malattia cardiovascolare aterosclerotica beneficiano di una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL al di sotto dei correnti obiettivi terapeutici [130].

Sono stati recentemente pubblicati anche lavori in merito ad analisi "ancillari" rispetto allo studio FOURIER. All'interno della popolazione dello studio FOURIER, della quale il 40% era affetta da diabete mellito e il 60% non affetta, uno studio ha approfondito l'efficacia e la sicurezza di evolocumab in pazienti con diabete mellito, e l'effetto di evolocumab su glicemia e rischio di sviluppo di diabete. Da tale analisi si è confermato come evolocumab riduca in modo significativo gli eventi cardiovascolari in termini di endpoint primario composito (morte cardiovascolare, infarto del miocardio, ictus, accesso ospedaliero per angina instabile o rivascolarizzazione coronarica) e di endpoint secondario di morte cardiovascolare, infarto miocardico e ictus, sia in pazienti affetti da diabete, sia nei soggetti non affetti, e nei pazienti con diabete si è evidenziata una riduzione significativamente maggiore di tali eventi. Inoltre si è dimostrato come la terapia con evolocumab non determini un incremento del rischio di sviluppare nuovi casi di diabete, così come non peggiora i livelli di glicemia [131].

Un'altra analisi ha invece considerato la popolazione dello studio FOURIER per approfondire efficacia e sicurezza di evolocumab in pazienti con arteriopatia periferica, definita come presenza di claudicatio intermittens e indice caviglia-braccio < 0.85 o in caso di precedente procedura vascolare periferica. I soggetti con arteriopatia periferica sono ad alto rischio di eventi cardiovascolari, e in tale lavoro emerge come l'inibizione di PCSK9 con evolocumab riduca in modo significativo tale rischio. Inoltre si è dimostrato che la riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL con evolocumab si associa a una riduzione del rischio di eventi avversi maggiori a carico degli arti, che includono ischemia acuta dell'arto,

amputazione maggiore, o rivascolarizzazione periferica urgente per ischemia [132].

Sono stati recentemente presentati all'American College of Cardiology di Marzo 2018 i dati relativi all'efficacia di alirocumab in termini di riduzione del rischio cardiovascolare, analizzati nello studio ODYSSEY OUTCOMES. In tale studio sono stati reclutati 18924 pazienti con recente sindrome coronarica acuta e non adeguati livelli di colesterolo delle LDL in terapia ipolipemizzante massimale tollerata, randomizzati a trattamento con alirocumab 75/150 mg ogni due settimane o placebo e osservati per un periodo di 3 anni. In tale studio emerge come in tali pazienti, rispetto al placebo, con alirocumab si ottengano dei livelli medi di colesterolo delle LDL compresi tra 25 e 50 mg/dl, con valori minimi anche di 15 mg/dl, e si osservi una riduzione significativa di eventi cardiovascolari in termini di mortalità per cardiopatia ischemica, infarto miocardico non fatale, ictus ischemico od ospedalizzazione per angina instabile, una riduzione significativa della mortalità per tutte le cause. Il trattamento con alirocumab si è inoltre dimostrato come sicuro e ben tollerato per tutta la durata dello studio. [133].

### **Linee Guida ESC/EAS 2017**

Basandosi sui risultati dello Studio FOURIER [130] e sulle correnti evidenze scientifiche, la Task Force del 2017 di ESC/EAS [134] raccomanda che la terapia con inibitori di PCSK9 dovrebbe essere considerata nei seguenti gruppi di pazienti:

- pazienti con malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD) definita come a rischio molto elevato [49, 135] che presentino elevati livelli di colesterolo delle LDL nonostante la terapia con statine al massimo dosaggio tollerato con o senza terapia con ezetimibe, cioè considerati a rischio particolarmente elevato di prognosi avversa;
- pazienti con ASCVD e a rischio molto elevato, che non tollerino una dose appropriata di almeno tre statine, che presentino così elevati livelli plasmatici di colesterolo delle LDL;

- pazienti con FH senza diagnosi clinica di ASCVD, con rischio cardiovascolare elevato o molto elevato, e con livelli plasmatici di LDL-C sostanzialmente elevati nonostante terapia con statine al dosaggio massimo tollerato associata a terapia con ezetimibe.

In caso di presenza di ASCVD si indica come livello di colesterolo delle LDL sopra il quale è raccomandata l'aggiunta di inibitori di PCSK9 un livello >140 mg/dl in assenza di indici aggiuntivi di severità rischio, mentre un livello > 100 mg/dl in caso di loro presenza (FH, diabete mellito con danno d'organo o con fattori di rischio maggiori, severa ASCV o sua rapida progressione).

Invece, in caso di pazienti con FH in assenza di ASCVD, si considera come livello limite di colesterolo delle LDL un livello superiore a 180 mg/dl nel caso dell'assenza di ulteriori fattori di rischio o 140 mg/dl nel caso di loro presenza (diabete mellito con danno d'organo o con un fattore di rischio maggiore, Lipoproteina(a) > 50 mg/dl, presenza di fattori di rischio maggiori come fumo o marcata ipertensione arteriosa, età superiore ai 40 anni senza trattamento, familiarità di primo grado per eventi cardiovascolari precoci, indicatori di imaging).

Si sottolinea come soggetti con malattia cardiovascolare documentata, diabete mellito tipo 1 o tipo 2, fattori di rischio cardiovascolare di gravità molto elevata o insufficienza renale cronica, siano automaticamente considerati a rischio cardiovascolare totale molto elevato o elevato. Per tutti gli altri soggetti è indicato utilizzare gli score validati per definire il rischio cardiovascolare totale in base ai singoli fattori di rischio, la cui combinazione può anche risultare in un inaspettato rischio cardiovascolare elevato o molto elevato [49].

### **Linee guida AIFA 2017**

Nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana del 7 Febbraio 2017 sono stati definiti i criteri per la prescrizione degli inibitori di PCSK9 [136].

In Italia, infatti, la terapia con inibitori di PCSK9 può essere prescritta mediante piano terapeutico nelle seguenti categorie di pazienti:

- pazienti con ASCVD che presentino livelli di colesterolo delle LDL > 100 mg/dl nonostante la terapia con statine al massimo dosaggio tollerato associata a terapia con ezetimibe;
- pazienti con FH senza diagnosi clinica di ASCVD, con rischio cardiovascolare elevato o molto elevato, e con livelli plasmatici di colesterolo delle LDL > 130 mg/dl nonostante terapia con statine al dosaggio massimo tollerato associata a terapia con ezetimibe.

## **SCOPI DELLA TESI**

Questo lavoro si propone di:

1. Valutare la mappatura genetica dell'Ipercolesterolemia Familiare in relazione al fenotipo clinico nei pazienti afferenti al Centro Dislipidemie ed Aterosclerosi della Clinica Medica I dell'Università di Padova
2. Esplorare la possibilità che la presenza di xantomi tendinei in soggetti con diagnosi di Ipercolesterolemia Familiare sia correlata ad un fenotipo aterosclerotico più aggressivo
3. Valutare l'utilità dell'impiego dell'ecografia dei tendini achillei come strumento di approfondimento ed ausilio diagnostico in soggetti con diagnosi clinica di Ipercolesterolemia Familiare
4. Analizzare dati di efficacia e sicurezza della terapia addizionale con inibitori di PCSK9 (alirocumab o evolocumab) in termini di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL e del profilo lipidico complessivo

# **MATERIALI E METODI**

## **1\_ Soggetti**

Sono stati studiati 194 pazienti con diagnosi clinica possibile, probabile o definita di Ipercolesterolemia Familiare formulata in accordo con i criteri raccomandati dal Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCN score). I pazienti provenivano dagli ambulatori di Dislipidemie ed Aterosclerosi della Clinica Medica 1° dell'Università di Padova e sono stati reclutati nel periodo compreso tra maggio 2015 e luglio 2018.

Criteri specifici di esclusione erano: ipercolesterolemia secondaria e trigliceridemia  $\geq 400$  mg/dl (4,5 mmol/l).

I pazienti coinvolti hanno compreso ed accettato volontariamente di partecipare fornendo il consenso informato scritto. Per i soggetti minori è stato chiesto ai genitori o al legale rappresentante di esprimere il consenso alla partecipazione del minore allo studio.

Questo studio si è sviluppato nel contesto nazionale del Progetto LIPIGEN (LipidTransPortDisordersItalianGENetic Network) della SISA (Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi).

## **2\_ Metodi**

I pazienti sono stati visitati presso gli ambulatori di Dislipidemie ed Aterosclerosi della Clinica Medica 1 dell'Università di Padova dove è stata raccolta l'anamnesi della storia personale e familiare di malattia cardiovascolare e di dislipidemia, sono stati eseguiti un esame clinico e un prelievo venoso per l'effettuazione di un test genetico a scopo diagnostico.

## **3\_ Misure antropometriche**

Tutte le misure antropometriche sono state rilevate in soggetti che indossavano abiti leggeri e senza scarpe. L'altezza è stata misurata utilizzando uno stadiometro e con un'approssimazione per eccesso di 0,5 cm. Il peso corporeo è stato determinato, con un'approssimazione per eccesso di 0,1 Kg, con l'ausilio di una bilancia calibrata.



L'Indice di Massa Corporea (IMC) o Body Mass Index (BMI), è stato calcolato come il rapporto tra il peso corporeo espresso in Kg e il quadrato dell'altezza espresso in m<sup>2</sup>:

$$\text{IMC} = \text{altezza}^2 (\text{m}^2) / \text{peso (kg)}$$

#### **4\_Prelievo BuffyCoat per l'estrazione del DNA**

Il prelievo di sangue per l'effettuazione del test genetico è stato effettuato utilizzando una provetta contenente EDTA. Presso i laboratori del Centro di Aterosclerosi e Dislipidemia dell'Università di Padova si è proceduto alla centrifugazione del campione a 3000 rpm per 12 minuti e alla separazione dell'anello di cellule bianche che si trova tra il plasma (sovrantante) e le emazie. Tali cellule bianche (Buffycoat) sono state trasferite in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 mL che, etichettata adeguatamente con il codice corrispondente al nominativo del paziente, è stata congelata a -20°C per essere successivamente analizzata.

#### **4.1\_Diagnosi molecolare**

L'analisi delle mutazioni genetiche è stata centralizzata presso il laboratorio coordinatore SISA nel Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Laboratorio di genetica molecolare e genomica cardiovascolare, Ospedale Bassini di Cinisello B. (Milano).

La ricerca delle mutazioni associate all'Ipercolesterolemia Familiare è stata effettuata in parte utilizzando un kit validato (in parte SEQPRO LIPO IS e in parte LIPIDINCODE) che rileva varianti associate all'Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH) e all'Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva (ARH). In particolare, il saggio rileva sostituzioni e delezioni di esoni ed introni dei seguenti geni:

- LDLR gene (FH): 18 esoni
- APOB gene: regione degli esoni 26 e 29 coinvolti nel legame con LDLR
- PCSK9 gene (ADH3): 12 esoni
- APOE gene: regione dell'esone 4

- LDLRAP1 gene (ARH): 9 esoni
- STAP1 gene: 9 esoni

Le metodiche del kit sono basate sull'amplificazione PCR della sezione del gene interessata dalla mutazione seguita dalla digestione del prodotto di amplificazione con un opportuno enzima di restrizione in modo da ottenere un pattern di digestione diverso dall'allele normale e da quello mutato.

Nei casi in cui la mutazione non consenta di distinguere, in base a differenze del pattern di restrizione, l'allele normale da quello mutato, l'amplificazione viene effettuata con un primer mutagenico che crea, con l'allele normale o con quello mutato, un sito di restrizione artificiale su uno dei due alleli. In alternativa si ricorre all'uso dell'amplificazione allele-specifica, utilizzando un primer in grado di amplificare l'allele mutato ma non quello normale.

In merito al kit validato SEQPRO LIPO IS le varianti sono identificate e classificate confrontandole con le sequenze di riferimento e il database di Progenika.

Se una variante (correlata a ADH o ARH) viene identificata, il report indica la specifica mutazione, il gene, l'esone, il nucleotide, la posizione dell'aminoacido e lo stato della patogenicità (patogenico, probabile, possibile). Il rapporto indica anche se la specifica mutazione è eterozigote o omozigote.

I comuni polimorfismi non sono riportati in quanto considerati non avere effetto sul livello e sull'attività delle proteine. Variazioni silenti per cui non sono stati trovati cambiamenti nello splicing pattern con le analisi bioinformatiche, sono classificate come non patogenetiche e non sono riportate.

Infine, tra i limiti della metodica si segnalano i casi in cui la mutazione non viene individuata, in quanto i pazienti potrebbero essere portatori di una variante non ancora analizzata dal saggio.

## **5\_Parametri biumorali**

I prelievi per i parametri biumorali sono stati eseguiti al mattino a digiuno da almeno 12 ore presso centri validati anche presso altre sedi. I prelievi ematici per le analisi dei lipidi sono stati raccolti in provette senza anticoagulante e lasciati a temperatura ambiente per 30 minuti.

La determinazione del colesterolo totale è stata effettuata con metodo enzimatico colorimetrico automatizzato con Cobas Mira Plus (CHOP- PAP); quella dei trigliceridi con metodo colorimetrico enzimatico automatizzato (lo stesso usato per il colesterolo totale), dopo precipitazione selettiva delle lipoproteine contenenti Apo B (VLDL e LDL) con polianioni (acido fosforotungstico + MgCl).

Il valore di colesterolo delle LDL, espresso in mg/dl, è stato calcolato applicando la Formula di Friedewald [137]:

$$\text{colesterolo totale} - (\text{Trigliceridi}/5 + \text{colesterolo HDL})$$

I livelli di colesterolo non HDL sono stati ottenuti dalla differenza tra il colesterolo totale e quello delle HDL.

Per la valutazione del CPK plasmatico abbiamo raccomandato ai pazienti non sottoporsi a sforzi fisici moderati nelle 48 ore precedenti i prelievi.

Il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula di Friedwald: C-LDL = colesterolo totale - (trigliceridi/5) - colesterolo HDL.

### **5.1\_Determinazione delle LDL ossidate**

Il dosaggio delle LDL ossidate è stato effettuato con metodica ELISA utilizzando il kit Mercodiaoxidized LDL ELISA (Mercodia AB, Uppsala-Sweden).

Si tratta di un test immunoenzimatico con tecnica sandwich, determinazione che prevede l'utilizzo di due anticorpi monoclonali, diretti verso due diversi epitopi di Apo B.

Il primo, specifico per un sito antigenico dell'apolipoproteina B nelle LDL ossidate, è legato alla piastra; il secondo anticorpo, coniugato all'enzima perossidasi, riconosce un secondo sito antigenico di Apo B.

I campioni sono stati prediluiti con tampone specifico e seminati in doppio nei rispettivi pozzetti.

Il primo anticorpo, fissato nella piastra da 96 pozzetti, lega solo le oxLDL con il primo epitopo antigenico. Dopo 2 ore di incubazione (a temperatura ambiente) ed una serie di ulteriori lavaggi per l'eliminazione del "non legato", si aggiungerà il secondo anticorpo coniugato con perossidasi che lega il secondo sito antigenico. Il legame Ab primario-oxLDL-Ab coniugato viene rilevato con l'aggiunta di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, substrato della perossidasi.

La reazione enzimatica, bloccata dopo 15 minuti per aggiunta di una soluzione 0,5M di acido solforico, produce una colorazione gialla, letta con il lettore di piastre Multiskan Go- ThermoScientific (Milano, Italy) alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Il livello di LDL ossidate è espresso in unità / litro (U/l).

Nel kit sono forniti una curva standard a 6 punti, e due sieri di controllo.

Caratteristiche di performance di questo metodo sono:

Lower detection limit 0,6mU/L calcolato secondo le norme ISO11843

Prova di recupero 85-107% (media valori 95%)

Coeff. di variazione (CV) CVinter4.7 ;CVintra 6.3

## **6\_ Valutazione ecografica.**

Alcuni soggetti sono stati sottoposti anche ad ecografia tendinea per valutare l'eventuale presenza di xantomi ecografici.

Venivano esclusi dallo studio pazienti con:

- storia di rotture, traumi o tendiniti dei tendini achillei
- storia di arterite dei grossi vasi (A. di Horton, A. di Takajasu)
- età inferiore a 18 anni
- età superiore a 75 anni

## **6.1\_Ecografia dei tendini d’Achille**

L’ecografia tendinea è stata condotta da un unico operatore utilizzando un ecografo ad alta risoluzione (Toshiba Aplio XV) con sonda lineare 5-10 MHz. Ogni soggetto è stato posto in posizione prona sul lettino mantenendo i piedi fuori dal lettino flessi con un angolo di 90° rispetto alla gamba. Sono state quindi ottenute sezioni sagittali e trasversali di entrambi i tendini di Achille volte a valutarne l’ecostruttura in termini di omogeneità o disomogeneità, a ricercare eventuali formazioni ipoecogene nel suo contesto e a misurare lo spessore anteroposteriore del tendine a 1 cm e 2 cm dall’inserzione dello stesso sulla tuberosità calcaneare oltre allo spessore massimo del tendine.

Il cut-off da noi utilizzato per classificare come patologico o meno lo spessore tendineo massimo (6,15 mm) è stato tratto dallo studio del collega Simoni F. et al. (138), il quale prendeva in considerazione tre gruppi di pazienti, uno composto da soggetti FH, uno da soggetti ipercolesterolemici non FH, e un gruppo di controllo di individui sani. Poiché i valori di spessore tendineo tendevano in parte a sovrapporsi tra i soggetti FH e quelli non FH era stata costruita una curva ROC per determinare la soglia ottimale, in termini di sensibilità e specificità, per il valore di spessore achilleo massimo. Il cut-off di 6,15 mm si configurava quindi come il migliore, determinando una sensibilità del 63,6% ed una specificità dell’85,7%.

## **6.2\_Ecografia delle carotidi**

La valutazione eco-color-doppler delle arterie carotidi è stata eseguita da un unico operatore esperto nella metodica tramite ecografo ad alta risoluzione Esaote Technos tramite sonda lineare 5-10 MHz. I pazienti sono stati valutati in posizione supina. La valutazione delle arterie carotidi ha incluso la misura dello spessore medio-intimale (IMT) e la ricerca di placche. L’IMT, convenzionalmente definito come la distanza tra l’interfaccia lume/intima e media/avventizia, è stato misurato in proiezione longitudinale a livello della parete posteriore della carotide comune su immagini in B-mode statiche magnificate tramite box ad alta risoluzione e per ogni immagine sono state ottenute più misure. L’IMT carotideo è stato considerato come qualitativamente aumentato qualora fosse presente un

valore di IMT massimo maggiore o uguale a 1 mm. Si considerano normali nella popolazione adulta valori di IMT compresi tra 0,7 e 0,9 mm. Quando l'IMT è superiore a 1 mm si parla di ispessimento, mentre oltre 1,5 mm si entra nella definizione di placca. Tramite scansioni longitudinali e trasversali dell'asse vascolare è stata ricercata la presenza di lesioni con caratteristiche morfologiche riferibili a placche e la percentuale di stenosi è stata misurata a livello della placca come rapporto tra diametro totale del vaso ed il lume residuo.

Nel complesso, le variabili tenute in considerazione nell'ambito delle dissertazioni statistiche a proposito dei soggetti studiati sono state dunque:

- dati demografici: data di nascita, età, sesso
- anamnesi e dati antropometrici: età alla diagnosi di dislipidemia, altezza, peso, BMI, abitudini tabagiche, diabete, ipertensione arteriosa, tipo di eventi cardiovascolari eventualmente occorsi
- anamnesi familiare, con particolare riferimento a presenza di dislipidemia o CVD precoce
- esame obiettivo: xantomi palpabili, gerontoxon
- tipo di terapia specifica per dislipidemia
- diagnosi molecolare
- esami biochimici: assetto lipidico completo pre-trattamento ipolipemizzante, assetto lipidico completo in terapia, LDL ossidate
- ecografia tendini achillei: spessore tendineo a 1 e 2 centimetri dalla tuberosità calcaneare, spessore massimo, omogeneità della struttura, presenza di formazioni ipoecogene riferibili a xantomi

## **7\_Terapia con inibitori anti PCSK9**

20 pazienti, tutti affetti da Ipercolesterolemia Familiare (FH) in eterozigosi, sono stati introdotti alla terapia con inibitori di PCSK9 nell'arco temporale da Settembre 2013 a Gennaio 2018. La popolazione è stata stratificata sulla base della terapia con inibitori di PCSK9, cioè 10 pazienti erano in terapia con evolocumab e 10 pazienti in terapia con alirocumab.

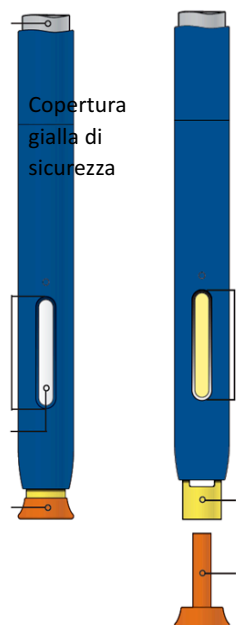
Una parte dei pazienti (5) ha partecipato al Trial Clinico multicentrico di fase III in doppio cieco iniziato nel Maggio 2013 che voleva analizzare sicurezza ed

efficacia della terapia con evolocumab rispetto a placebo o ezetimibe, in pazienti randomizzati a terapia con statine a media o alta efficacia, osservati per un periodo di 12 settimane. I dati rilevati sono stati in seguito raccolti dallo Studio LAPLACE-2 [122]. Altri 7 pazienti sono stati arruolati nel Trial Clinico multicentrico di fase III che analizzava i dati di efficacia e sicurezza di alirocumab a partire dal 2015. Gli altri hanno iniziato terapia con inibitori di PCSK9 negli anni successivi e in particolare dall'introduzione in commercio degli stessi. Tutti i pazienti hanno da allora proseguito la terapia con inibitori di PCSK9 fino al momento attuale.

### **7.1 Modalità di somministrazione degli inibitori di PCSK-9**

I nuovi farmaci ipolipemizzanti inibitori di PCSK9 sono anticorpi monoclonali somministrati per via iniettiva sottocutanea. In Figura 25 è riportata un'immagine relativa a un esempio di iniettore di farmaco. Consiste in un iniettore preconfezionato con il farmaco, dotato di una *finestra* attraverso la quale è possibile visualizzare il liquido contenente il farmaco e lo stantuffo giallo che scende durante la somministrazione, un *pulsante grigio* superiore da premere per iniziare la somministrazione, un *cappuccio arancio* sulla base da rimuovere, una *copertura gialla* che protegge l'ago. Per somministrare il farmaco è necessario rimuoverlo dal frigo per almeno 15 minuti (deve essere somministrato a temperatura ambiente), visionare il liquido del farmaco attraverso la finestra per escludere corpuscoli o cambiamenti del colore, poi disinfettare la cute della sede di iniezione (addome ad almeno 5 cm dall'ombelico o cosce), rimuovere il cappuccio arancio di protezione, sollevare la plica di cute e premere con forza l'iniettore sulla cute per far salire la copertura gialla di sicurezza, quindi premere il pulsante grigio tenendo l'iniettore appoggiato alla cute per 10-15 secondi visualizzando la discesa dello stantuffo fino a completa iniezione del farmaco. Al termine della somministrazione si dovrebbe avvertire un "click".

I pazienti sono stati adeguatamente informati in merito alle modalità di conservazione e iniezione del farmaco per svolgere la somministrazione in autonomia.



**Figura 28.** Esempio di iniettore di farmaco.

## 7.2\_Efficacia e sicurezza

L'efficacia alla terapia è stata valutata sulla base della risposta clinica in termini di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL. La sicurezza invece è stata monitorata sulla base dei valori plasmatici di transaminasi (AST, ALT) e CPK e in termini di riferimento anamnestico di sintomi di nuova comparsa in corso di terapia.

## 8\_Analisi statistica

I valori delle variabili quantitative riportati nelle tabelle rappresentano valori medi  $\pm$  deviazione standard (DS).

In riferimento a ciascuna variabile qualitativa nominale e ordinale sono state calcolate le frequenze assolute e percentuali.

Le differenze di distribuzione di variabili qualitative sono state analizzate con il test Chi-quadrato.



I confronti tra le medie degli assetti lipidici al tempo basale e in terapia attuale sono stati fatti applicando il test t di Student per dati appaiati.

Per il confronto tra più gruppi di pazienti è stata utilizzata l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal Bonferroni t-test.

L'analisi di correlazione è stata valutata su variabili quantitative con la correlazione di Pearson.

L'analisi logistica multipla è stata usata per verificare l'associazione tra variabili risultate significative all'analisi di correlazione.

Nei modelli dell'analisi multivariata l'età, il colesterolo LDL al tempo basale e il colesterolo LDL in terapia attuale sono state considerate come variabili continue, mentre il sesso (maschi vs femmine) e la terapia ad elevata efficacia (presente vs assente) sono state considerate come variabili dicotomiche.

Per tutte le analisi in questione, il livello di significatività è stato definito con un valore di  $p < 0,05$ .

I dati sono stati elaborati utilizzando la versione 23.0 del software statistico IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences).

# RISULTATI

## Ipercolesterolemia Familiare: GENETICA E FENOTIPO

- **Caratteristiche cliniche dei soggetti studiati**

Tutti i 194 pazienti sono stati sottoposti a screening genetico ma al momento attuale 168 pazienti dispongono della diagnosi genetica mentre i restanti 26 sono ancora in attesa di referto.

Pertanto queste analisi sono state effettuate valutando 168 pazienti (87 maschi e 81 femmine) con età media pari a 45 anni e nota diagnosi clinica di Ipercolesterolemia Familiare (FH) secondo i criteri del Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCN Score); gli score dei pazienti andavano da un minimo di 4 ad un massimo di 24 punti.

Le caratteristiche cliniche del gruppo studiato sono descritte nella *Tabella II*. In merito alle manifestazioni obiettive del FH, il 55.0% dei pazienti presentava xantomi, il 12.5% presentava xantelasmi e il 35.9% gerontoxon.

Per quanto riguarda l'anamnesi familiare, il 98.5% dei soggetti aveva almeno un familiare di I° grado con ipercolesterolemia e l'81% presentava familiarità per malattie cardiovascolari aterosclerotiche in età precoce (età < 55 anni nei parenti maschi di I° grado oppure età < di 60 anni nei parenti femmine di I° grado); in merito alla storia personale, il 29.0% dei pazienti presentava storia di malattia cardiovascolare precoce, il 72.3% vasculopatia carotidea, il 9.2% diagnosi di ipertensione arteriosa, il 3.0% diagnosi di diabete mellito e il 30.7% storia attuale o pregressa di tabagismo.

La valutazione della terapia ipocolesterolemizzante in corso al momento dell'arruolamento, mostrava come il 49.2% del totale dei pazienti (pari al 58.6% dei 58 pazienti in terapia con statina e/o ezetimibe) assumesse una terapia ipolipemizzante ad alta efficacia, cioè realizzata con atorvastatina 40-80 mg +/- ezetimibe 10 mg, rosuvastatina 20-40 mg +/- ezetimibe 10 mg oppure simvastatina 40 mg con ezetimibe 10 mg. Tre dei pazienti in terapia ad alta intensità si sottoponevano anche a sedute di LDL aferesi.

Nello specifico, tra i pazienti in terapia con farmaci ipocolesterolemizzanti convenzionali (statine, ezetimibe, combinazione dei due), il 22.4% risultava in simvastatina associato ad ezetimibe, il 20.7% in rosuvastatina, il 20.7% in rosuvastatina associata ad ezetimibe, il 17.2% in sola atorvastatina, il 6.9% in atorvastatina associato ad ezetimibe, il 6.9% in sola simvastatina, il 3.4% era in sola ezetimibe e l'1.7% in pravastatina associata ad ezetimibe.

Infine, solo il 4.3% del totale dei pazienti raggiungeva il target di LDL-colesterolo in accordo con le recenti linee guida EAS/ASC.

Al momento della diagnosi clinica di FH, i pazienti presentavano un assetto lipidico caratteristico con elevati livelli di colesterolo totale ( $411.1 \pm 93.4$  mg/dl) e di CT-LDL ( $332.7 \pm 91.5$  mg/dl) mentre i livelli di trigliceridi e di lipoproteine ad alta densità (HDL) rientravano ancora nei valori di norma.

**Tabella II:** Caratteristiche cliniche e bioumorali dei pazienti con Ipercolesterolemia Familiare (FH). I dati sono espressi come media + deviazione standard. IMC= indice di massa corporea. DLCN=Dutch Lipid Clinic Network.

Caratteristiche cliniche	Valore	valore minimo	valore massimo
Sesso (m/f) (n, %)	87/81 (52/48)		
Età (anni)	45.0±17.5	11.0	74.0
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.6±4.2	15.8	34.4
<b>DLCN Score</b>			
DLCN Score	11.1±4.8	4.0	24.0
Diagnosi possibile di FH, (%)	10	-	-
Diagnosi probabile di FH, (%)	14	-	-
Diagnosi definitiva di FH, (%)	76.0	-	-
<b>Xantomi (%)</b>			
Xantomi (%)	55.0	-	-
<b>Xantelasmi (%)</b>			
Xantelasmi (%)	12.5	-	-
<b>Gerontoxon (%)</b>			
Gerontoxon (%)	35.9	-	-
Colesterolemia totale (mg/dl)	411.1±93.4	-	-
Trigliceridemia (mg/dl)	125.2±67.8	-	-

<b>CT-HDL (mg/dl)</b>	54.3±16.0	-	-
<b>CT-LDL (mg/dl)</b>	332.7±91.5	-	-
<b>CK (U/L)</b>	234.0±263.6	-	-
<b>AST (U/L)</b>	26.4±6.3	-	-
<b>ALT (U/L)</b>	26.5±13.7	-	-
<b>Familiarità per ipercolesterolemia (%)</b>			
<b>Familiarità per ipercolesterolemia (%)</b>	98.5	-	-
<b>Familiarità per CVD precoce (%)</b>			
<b>Familiarità per CVD precoce (%)</b>	81.3	-	-
<b>Storia personale di CVD precoce (%)</b>			
<b>Storia personale di CVD precoce (%)</b>	29.0	-	-
<b>Vasculopatia carotidea (%)</b>			
<b>Vasculopatia carotidea (%)</b>	72.3	-	-
<b>Storia di ipertensione arteriosa (%)</b>			
<b>Storia di ipertensione arteriosa (%)</b>	9.2	-	-
<b>Storia di diabete mellito (%)</b>			
<b>Storia di diabete mellito (%)</b>	3.0	-	-
<b>Storia di tabagismo (%)</b>			
<b>Storia di tabagismo (%)</b>	30.7	-	-
<b>Terapia ipo CT ad elevata efficacia (%)</b>			
<b>Terapia ipo CT ad elevata efficacia (%)</b>	49.2	-	-
<b>LDL Aferesi</b>			
<b>LDL Aferesi</b>	3	-	-
<b>Colesterolo LDL a target ( %)</b>			
<b>Colesterolo LDL a target ( %)</b>	4.3	-	-
<b>Terapia ipolipemizzante: 84.0%</b>			
<b>Terapia ipolipemizzante: 84.0%</b>	-	-	-
<b>Ezetimibe (%)</b>			
<b>Ezetimibe (%)</b>	3.4	-	-
<b>Simvastatina (%)</b>			
<b>Simvastatina (%)</b>	6.9	-	-
<b>Simvastatina+ezetimibe (%)</b>			
<b>Simvastatina+ezetimibe (%)</b>	22.4	-	-
<b>Atorvastatina (%)</b>			
<b>Atorvastatina (%)</b>	17.2	-	-
<b>Atrovastatina+Ezetimibe (%)</b>			
<b>Atrovastatina+Ezetimibe (%)</b>	6.9	-	-
<b>Rosuvastatina (%)</b>			
<b>Rosuvastatina (%)</b>	20.7	-	-
<b>Rosuvastatina+Ezetimibe (%)</b>			
<b>Rosuvastatina+Ezetimibe (%)</b>	20.7	-	-
<b>Pravastatina+Ezetimibe (%)</b>			
<b>Pravastatina+Ezetimibe (%)</b>	1.7	-	-

- **Aspetti genetici dei pazienti con Ipercolesterolemia Familiare**

Dei 168 pazienti con diagnosi clinica di FH, 122 soggetti (pari al 72.6%) presentavano mutazioni nel gene per il recettore delle lipoproteine a bassa densità LDL (LDLR), di cui 2 in forma omozigote, 15 in associazione a mutazione di altro gene (2 con STAP1, 2 con APOE, 4 con PCSK9, 7 con APOB) mentre i restanti 105 in forma eterozigote; 1 paziente presentava mutazioni nel gene LDLRAP1 in forma omozigote e 2 pazienti in forma eterozigote, 7 pazienti presentavano mutazioni del gene APOB in eterozigosi, 2 pazienti presentava eterozigosi composta per la presenza di mutazione dei geni APOB e STAP1 ed APOB e APOE rispettivamente, 1 paziente presentava eterozigosi per PCSK9; e nei restanti 33 pazienti (pari al 19.6%) non veniva ritrovata alcuna mutazione tra quelle testate (geni di LDLR, PCSK9, LDLRAP1, APO B, STAP 1).

Dei 105 pazienti eterozigoti permutazioni del LDLR, 43 (pari al 41 %) appartenevano alla classe funzionale allele nullo, che include il maggior numero di mutazioni note e che normalmente determina un difetto nella sintesi del recettore con conseguente funzione recettoriale quasi completamente abolita (<5% rispetto alla norma); i restanti 62 pazienti ( pari al 59%) apparteneva alle altre quattro classi funzionali legate ad un'alterata sintesi della proteina dovuta ad alterazioni della sequenza amminoacidica che comporta difetti nel trasporto del recettore, nel legame tra ligando e recettore, nella localizzazione dello stesso a livello della superficie cellulare e infine nel riciclaggio (*Figura 13*).

Mutazione	Soggetti (n)
<b>LDL-recettore</b>	<b>122</b>
Omozigoti	2
Eterozigoti:	105
• allele nullo	43
• aa change	62
Eterozigosi composta:	15
• LDL-R e STAP 1	2
• LDL-R e APOE	2
• LDL-R e PCSK9	4

• LDLR-R e APOB	7
<b>LDL- RAP1</b>	
Omozigoti	1
Eterozigoti	2
<b>APOB</b>	
Eterozigoti	7
Eterozigosi composta:	
• APOB e STAP-1	1
• APOB e APOE	1
<b>PCSK9</b>	
Eterozigoti	1
<b>Non rilevate mutazioni note</b>	33

**Tabella III:** Mutazioni rilevate nei pazienti con Ipercolesterolemia Familiare sottoposti a genotipizzazione.

In particolare, dei 62 soggetti portatori di una mutazione nel gene LDLR dovuta ad alterazioni della sequenza amminoacidica, 21 presentavano la mutazione FH Padova-1 (di cui 2 in forma di eterozigosi composta e 1 in omozigosi), 2 la mutazione FH Napoli-1, 6 la mutazione FH Palermo-1, 2 la mutazione FH Napoli-4. Uno dei pazienti con forma omozigote per il gene LDLR era portatore di un'altra alterazione della sequenza amminoacidica chiamata FH Afrikaner-1 (esone 4, 681C>G, Asp206Glu) (Tabella IV).

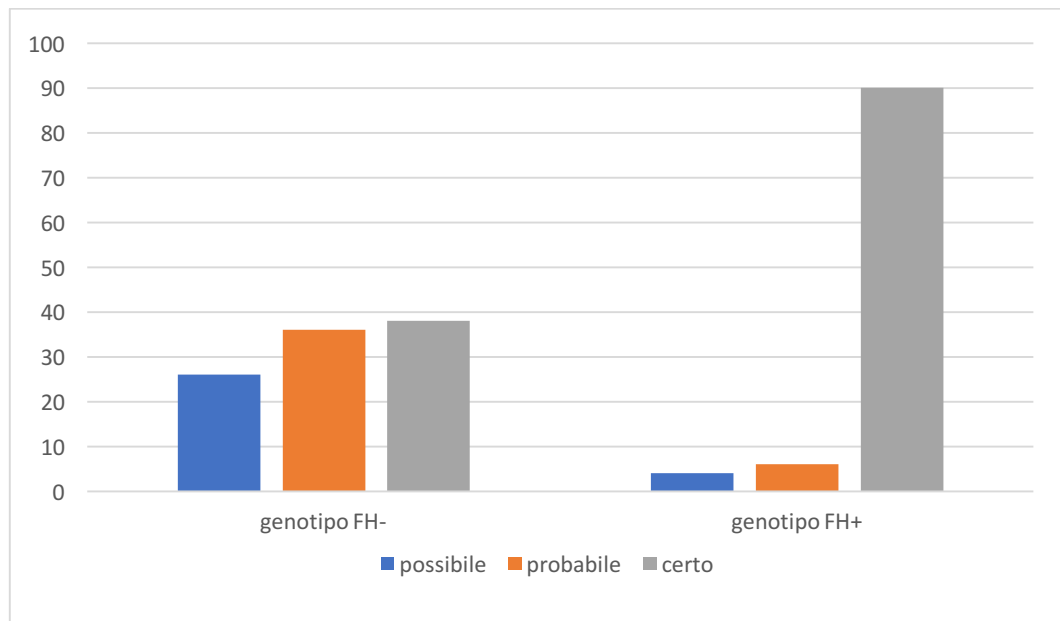
Nome mutazione	Sito mutazione	Mutazione amminoacido	Classe funzionale	Attività recettore	Area Italiana	N
FH Padova-1	esone 4, 662 A>G	D200G, Asp200Gly (GAC→GGC)	2B (completo trasporto difettivo)	<2% (etero)	Nord-Est	21
FH Napoli-1	Esone 8, 1135 T>C	C358R, Cys358Arg (TGT→CGT)	5 (riciclo difettivo)	<15-30% (omo)	Sud (Campania)	2
FH Palermo-1	Esone 11, 1646 G>A	G528D, Gly528Asp (GGT→GAT)	2A (parziale trasporto difettivo)	<2% (omo)	Campania, Sicilia	6
FH Napoli-4	Esone 12, 1775 G>A	G571E, Gly571Glu (GGG→GAG)	5 (riciclo difettivo)	5-15% (etero)	Sud (Basilicata, Campania, Puglia)	2

**Tabella IV:** Principali mutazioni italiane rilevate nei pazienti con Ipercolesterolemia Familiare.

- **Mutazioni causa di Ipercolesterolemia Familiare e Dutch Lipid Clinic Network Score**

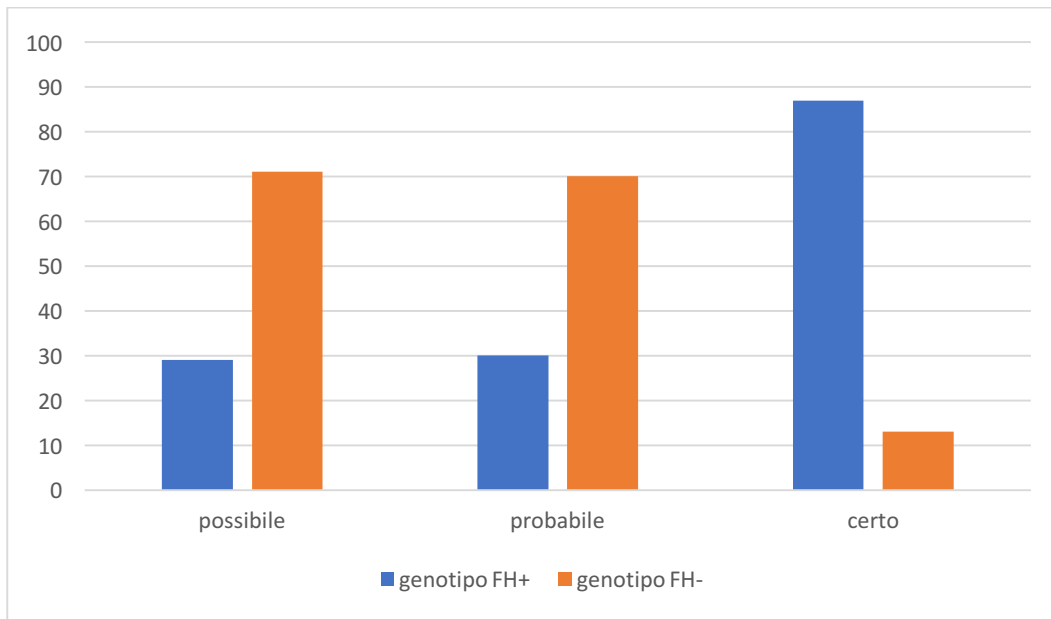
I 168 pazienti sono stati stratificati in base al Dutch Lipid Clinic Network Score in diagnosi fenotipica di FH possibile, probabile e definita.

Tra i pazienti per cui non è stata ritrovata una mutazione, oltre il 60% dei casi presentava una diagnosi clinica probabile o possibile mentre il restante 38% una diagnosi clinica definita per FH (*Figura 29a*).



**Figura 29a:** Distribuzione della diagnosi clinica possibile, probabile, certa di Ipercolesterolemia Familiare secondo il DCLN Score in base alla presenza o meno di mutazione responsabile di FH.

Inoltre, nonostante quasi il 90 % dei pazienti con diagnosi clinica certa per FH sia portatore di una mutazione responsabile di FH, quasi il 30% dei pazienti con diagnosi clinica possibile per FH è portatore di genotipo positivo per la stessa. (*Figura 29b*).



**Figura 29b:** Riscontro delle mutazioni responsabili di FH in base alla distribuzione della diagnosi clinica di FH secondo il DLCN Score.

- **Caratteristiche cliniche dei soggetti studiati:**

Dei 168 pazienti di cui era disponibile la diagnosi genetica, sono stati presi in considerazione i 105 con eterozigosi per il gene del LDL recettore e i 33 per cui non era stata trovata alcuna mutazione tra quelle testate.

Pertanto sono stati suddivisi in tre gruppi rispettivamente in base alla:

- classe fenotipica/funzionale delle mutazioni dell'LDLR:
  - 43 pazienti con allele nullo (NA),
  - 62 pazienti con alterazioni della sequenza amminoacidica (DEF)
- 33 pazienti senza riscontro di mutazioni all'analisi genetica (NM)

I tre gruppi sono risultati simili per quanto riguarda età, genere e IMC.

I pazienti con classe fenotipica allele nullo e alterazioni della sequenza amminoacidica (quindi con mutazioni dell'LDLR) ricevevano diagnosi di FH con uno score secondo i criteri Dutch maggiore rispetto ai pazienti senza mutazioni rilevate ( $14.1 \pm 4.4$  vs  $8.9 \pm 4.7$ ,  $p = 0.005$  vs e  $13.1 \pm 4.5$  vs  $8.9 \pm 4.7$ ,  $p = 0.016$ ).



Tra le caratteristiche fisiche del FH, la presenza di xantomi e di gerontoxon risultava significativamente diversa tra i due gruppi, con una prevalenza nettamente maggiore nei pazienti appartenenti alla classe fenotipica allele nullo.

La storia familiare e personale dei pazienti dei tre gruppi risultava priva di differenze statisticamente significative.

In merito al profilo lipidico alla diagnosi, quindi in assenza di terapia ipocolesterolemizzante, i livelli di colesterolo totale e di CT-LDL erano significativamente differenti nei tre gruppi considerati. In particolare i pazienti con classe fenotipica allele nullo e alterazioni della sequenza amminoacidica mostravano livelli di colesterolemia totale ( $430.6 \pm 105.8$  vs  $408.2 \pm 89.3$  vs  $314.0 \pm 105.4$ ;  $p=0,004$  Anova) e CT-LDL ( $316 \pm 117$  vs  $321 \pm 109$  vs  $199 \pm 44$  mg/dl:  $p=0,002$  Anova) superiori rispetto ai pazienti senza mutazioni. Non vi erano differenze significative nei tre gruppi per quanto riguardava i trigliceridi e le lipoproteine ad alta densità (HDL).

Infine, la percentuale di pazienti in terapia ipocolesterolemizzante ad altra efficacia era statisticamente omogenea nei tre gruppi (*Tabella V*).

**Tabella V:** Caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti FH suddivisi per il tipo di mutazioni rilevate. Alcuni dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. NA= allele nullo, DEF=alterazioni della sequenza amminoacidica; NM=assenza di mutazioni responsabili di FH. IMC= indice di massa corporea. DLCN=Dutch Lipid Clinic Network. n.s. =non significativo.

Caratteristiche cliniche	NA (n=43)	DEF (n=62)	NM (n=33)	ANOVA (p-value)
Sesso (m/f) (%)	60/40	48/52	54/46	n.s.
Età (anni)	47.8 $\pm$ 16.7	44.5 $\pm$ 17.0	41.8 $\pm$ 20.9	n.s.
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.9 $\pm$ 3.6	24.1 $\pm$ 4.7	26.1 $\pm$ 2.5	n.s.
DCLN Score	<b>14.1<math>\pm</math>4.4</b>	<b>13.1<math>\pm</math>4.5</b>	<b>8.9<math>\pm</math>4.7</b>	<b>0.005</b> ◇ ○
Xantomi (%)	<b>71.4</b>	<b>48.5</b>	<b>30.7</b>	<b>0.054</b>
Xantelasmi (%)	19.0	11.4	0	n.s.
Gerontoxon (%)	<b>52.4</b>	<b>28.5</b>	<b>15.4</b>	<b>0.047</b>
Familiarità per ipercolesterolemia (%)	90.4	100	100	n.s.
Familiarità per CVD precoce (n, %)	66.0	71.4	69.2	n.s.
Storia personale di CVD precoce (%)	28.5	31.4	15.4	n.s.
Vasculopatia carotidea (%)	52.4	48.5	46.1	n.s.
Storia di ipertensione arteriosa (%)	9.0	11.4	0	n.s.
Storia di diabete mellito (%)	0	5.0	0	n.s.
Storia di tabagismo (%)	33.3	25.7	30.7	n.s.
				n.s.
Colesterolemia alla diagnosi (mg/dl)	<b>430.6<math>\pm</math>105.8</b>	<b>408.2<math>\pm</math>89.3</b>	<b>314.0<math>\pm</math>105.4</b>	<b>0.004</b> ◇ ○
Trigliceridemia alla diagnosi (mg/dl)	115.5 $\pm$ 68.2	131.2 $\pm$ 69.1	102.9 $\pm$ 53.2	n.s.
CT-HDL alla diagnosi (mg/dl)	53.5 $\pm$ 13.7	53.6 $\pm$ 16.1	58.8 $\pm$ 16.2	n.s.
CT-LDL alla diagnosi (mg/dl)	<b>326,5<math>\pm</math>97,7</b>	<b>316,9<math>\pm</math>93,9</b>	<b>211,1<math>\pm</math>76,3</b>	<b>0.002</b> ◇ ○
Terapia ipoCT ad elevata efficacia (%)	57.1	48.5	38.4	n.s.

◇: 0 vs 2, p<0,05

▪: 0 vs 1, p<0,05

○: 1 vs 2, p<0,05

## **IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE: ECOGRAFIA TENDINEA**

- **Caratteristiche cliniche dei soggetti studiati**

Tra i soggetti reclutati, 101 venivano sottoposti anche ad ecografia tendinea. Le caratteristiche cliniche sono illustrate nella Tabella VI. Il nostro campione risultava composto da 63 femmine (pari al 62,4%) e 38 maschi (pari al 37,6%) di età compresa tra i 18 e i 76 anni (età media $\pm$ DS 48,0 $\pm$ 15,5 anni). L'IMT medio dei nostri pazienti era di 25,1 $\pm$ 4,5 kg/m<sup>2</sup>, ovvero borderline per sovrappeso.

L'età media al primo riscontro di ipercolesterolemia era di 26,9 $\pm$ 13,4 anni. Vi erano infatti individui ai quali erano stati riscontrati valori di colesterolo elevati fin dalla nascita, ma anche soggetti etichettati come dislipidemici all'età di 60 anni, nell'ambito dello screening a cascata a partire da un familiare noto per essere FH. Inoltre il primo riscontro di ipercolesterolemia non necessariamente coincideva in tutti i casi con la diagnosi di ipercolesterolemia familiare.

L'attribuzione ad ogni paziente dello score calcolato sulla base del DCLN ha permesso di definire una popolazione caratterizzata da uno score medio pari a 10,1 $\pm$ 4,9, all'interno della quale erano presenti individui con diagnosi certa (n=58), ma anche probabile (n=26), possibile (n=17) di ipercolesterolemia familiare.

Agli esami bioumorali basali, ovvero senza alcuna terapia, i pazienti presentavano una colesterolemia totale (CT) pari a 351,8 $\pm$ 107,3 mg/dl, ed una colesterolemia LDL di 268,6 $\pm$ 106,2 mg/dl. Si segnala la presenza di forme familiari particolarmente gravi (n=12) con picchi di colesterolo LDL superiori a 400 mg/dl.

All'esame obiettivo volto ad identificare i markers clinici di FH, il 34,7% dei pazienti mostrava la presenza di arco corneale lipidico in età precoce (<45 anni), mentre il 10,2% presentava xantomi tendinei apprezzabili alla palpazione manuale.

Il 97% dei pazienti aveva familiarità per dislipidemia, mentre il 58,2% aveva anche familiarità per eventi cardiovascolari prematuri. Per quanto riguardava

invece la storia personale, il 12,9% aveva dato manifestazione di malattia coronarica o cerebrovascolare in età precoce.

Riguardo ai fattori di rischio cardiovascolare, il 20,8% dei soggetti era iperteso e il 5% diabetico. In merito al tabagismo si rilevava una quota decisamente maggiore di ex-fumatori (34%) rispetto alla quota di fumatori attivi (13%).

**Tabella VI.** Caratteristiche cliniche e bioumorali dei pazienti sottoposti ad ecografia tendinea. I dati sono espressi come media±deviazione standard. IMC= indice di massa corporea. DLCN=Dutch Lipid Clinic Network.

Caratteristiche Cliniche	Valore	Minimo	Massimo
<b>Sesso (m/f) (n, %)</b>	38/63 (37,6/62,4)	-	-
<b>Età (anni)</b>	48,0±15,5	18	76
<b>Peso (kg)</b>	70,7±14,9	46,0	122,0
<b>Altezza (m)</b>	1,67±0,10	1,43	1,93
<b>IMT (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	25,1±4,5	17,8	42,3
<b>Età alla diagnosi (anni)</b>	26,9±13,4	0	60
<b>DCLN Score</b>	10,1±4,9	4	24
<b>Diagnosi certa (%)</b>	58 %		
<b>Diagnosi probabile (%)</b>	26 %		
<b>Diagnosi possibile (%)</b>	16%		
<b>Colesterolo totale (mg/dl)</b>	351,83±107,33	144	690
<b>CT-LDL (mg/dl)</b>	268,62±106,20	74	609
<b>APO B100 (mg/dl)</b>	116.69±35.31	27	275
<b>LDL ossidate (U/L)</b>	66.46±24.89	37.99	162.71
<b>Xantomi obiettivi (%)</b>	10,2	-	-

<b>Gerontoxon (%)</b>	34,7	-	-
<b>Familiarità per dislipidemia (%)</b>	97	-	-
<b>Familiarità per eventi CVD precoci (%)</b>	58,2	-	-
<b>Storia personale di eventi CVD precoci (%)</b>	12,9		
<b>Ipertesi (%)</b>	20,8	-	-
<b>Diabetici (%)</b>	5	-	-
<b>Ex fumatori (%)</b>	34	-	-
<b>Fumatori attivi (%)</b>	13	-	-
<b>Sigarette/die (n)</b>	11,46±9,77	1	50
<b>Anni di fumo (n)</b>	19,31±12,9	1	50
<b>Pacchetti all'anno (n)</b>	209,17±178,27	18,25	912,50

In Tabella VII è possibile apprezzare la suddivisione dei soggetti in base al tipo di terapia ipocolesterolemizzante assunta. Com'era da attendersi, trattandosi di una popolazione ad elevato rischio cardiovascolare, la quasi totalità dei pazienti assumeva almeno un tipo di presidio farmacologico, mentre il 14,9% non assumeva alcuna terapia. Le statine utilizzate erano prevalentemente Rosuvastatina (30,7%) e Simvastatina (25,7%), e il 39,6% assumeva una terapia combinata statina-ezetimibe.

Per avere un quadro ancora più chiaro della situazione, è stata presa in considerazione anche la quota di soggetti in terapia ipocolesterolemizzante ad elevata efficacia, dove per terapia ad elevata efficacia si intendeva una tra le seguenti opzioni:

- Rosuvastatina  $\geq$  20 mg/die
- Atorvastatina  $\geq$  40 mg/die
- Atorvastatina + Ezetimibe 10 mg/die
- Rosuvastatina + Ezetimibe 10 mg/die
- Simvastatina 40 mg/die + Ezetimibe 10 mg/die

Nel complesso circa la metà dei pazienti (47%) era sottoposto ad una terapia ipocolesterolemizzante ad elevata efficacia, con riduzione media attesa del C-LDL di almeno il 50%.

**Tabella VII.** Terapia ipocolesterolemizzante nei soggetti valutati (n=101).

Terapia ipocolesterolemizzante	Valore (%)
Nessuna	15
Atorvastatina	23
Rosuvastatina	31
Simvastatina	26
Lovastatina	1
Nutraceutici	4
Ezetimibe + statina	40
<b>Terapia ipoCT ad elevata efficacia (%)</b>	<b>47</b>

- **Impatto della terapia farmacologica**

Sono state analizzate le differenze negli assetti lipidici dei pazienti al momento della diagnosi di dislipidemia e durante l'assunzione della terapia farmacologica. I risultati, riportati in Tabella VIII, hanno evidenziato una riduzione statisticamente significativa dei valori di colesterolo totale ( $\Delta = -37,7\%$ ,  $p < 0,001$ ) e di colesterolo LDL ( $\Delta = -49,5\%$ ,  $p < 0,001$ ). Trigliceridi e colesterolo HDL non hanno invece subito variazioni statisticamente significative.

**Tabella VIII.** Confronto tra l'assetto lipidico al tempo basale (tB) e l'assetto lipidico in terapia attuale (tA). I dati sono espressi come media±deviazione standard. n.s.= non significativo.

Assetto lipidico	tB	tA	Delta %	p value
CT (mg/dl)	368,8±106,5	221,9±55,0	-37,7	0,001
CT-HDL (mg/dl)	61,1±16,5	61,9±16,7	+2,2	n.s.
TG (mg/dl)	112,1±56,1	109,2±61,1	+2,4	n.s.
CT-LDL (mg/dl)	285,3±105,6	138,1±49,3	-49,5	0,001

- **Parametri ecografici**

Nel contesto della visita ambulatoriale, ogni singolo paziente è stato sottoposto ad ecografia dei tendini d'Achille destro e sinistro. Delle varie misurazioni fatte (spessore tendineo rispettivamente a 1 e a 2 cm dall'inserzione sulla tuberosità calcaneare e spessore massimo) abbiamo focalizzato la nostra attenzione sullo spessore massimo rilevato. Lo spessore massimo medio era di 6,59±2,75 mm a destra, e di 6,69±2,62 mm a sinistra, con valori oscillanti da un minimo di 3,60 mm a un massimo di 22,0 mm (Tabella IX).

Della popolazione studiata 71 soggetti sono stati indagati anche con eco-color-doppler nel distretto carotideo, con riscontro di un IMT a livello di carotide comune (CC) destra pari a 0,66±0,22 mm, 0,64±0,26 mm a sinistra. Valori simili sono stati trovati anche per quanto riguardava l'arteria carotide interna (ACI), con IMT medio di 0,66±0,45 mm a destra, e di 0,64±0,40 mm a sinistra.

**Tabella IX.** Parametri ecografici tendinei e carotidei. I dati sono espressi come media±deviazione standard. IMT= intima media thickness, CC= carotide comune, ACI= arteria carotide interna.

Misurazioni ecografiche	Valore	Minimo	Massimo
<b>Tendini Achillei</b>			
Spessore max destra (mm)	6,59±2,75	3,70	22,00
Spessore max sinistra (mm)	6,69±2,62	3,60	21,10
<b>Carotidi</b>			
IMT CC DX (mm)	0,66±0,22	0,30	1,30
IMT ACI DX (mm)	0,66±0,45	0,20	2,80
IMT CC SX (mm)	0,64±0,26	0,3	1,6
IMT ACI SX (mm)	0,64±0,40	0,2	2,5

Da uno studio precedente, condotto in seno al nostro gruppo di ricerca, è stato deciso di utilizzare il valore di cut-off di 6,15 mm per considerare patologicamente ispessito il tendine d'Achille.

Applicando alla popolazione da noi studiata il cut-off di 6,15 mm quale discriminante per parlare di ispessimento patologico, è risultato che circa la metà dei pazienti (45,9% per il tendine destro, 49,5% per il tendine sinistro) presentava uno spessore massimo misurato ecograficamente superiore al valore soglia (Tabella X). Inoltre alla valutazione dell'ecostruttura il 22,7% dei pazienti (23,2% a destra, 22,2% a sinistra) presentava un certo grado di disomogeneità, mentre una quota minore mostrava delle formazioni ipoecogene riferibili ad accumuli lipidici (17,3% a destra, 16,3% a sinistra).



**Tabella X.** Parametri ecografici tendinei. Alcuni dei dati sono espressi come media±deviazione standard.

	<b>Tendine achilleo destro</b>	<b>Tendine achilleo sinistro</b>
<b>Spessore massimo (mm)</b>	6.59±2.75	6.69±2.62
<b>Spessore &gt; 6,15 mm (%)</b>	45,9	49,5
<b>Ecostruttura disomogenea (%)</b>	23,2	22,2
<b>Formazioni ipoecogene (%)</b>	17,3	16,3

È stato considerato lo spessore tendineo massimo maggiore per ogni coppia di tendini achillei indagati, assumendolo come parametro indicatore di gravità di malattia. Ne risultava, come da Tabella XI, che la media dei valori dello spessore tendineo massimo assoluto era pari a 7,04±2,79 mm, con il 59,2% dei soggetti aventi almeno uno dei due tendini di Achille ispessito oltre la soglia patologica di 6,15 mm.

**Tabella XI.** Parametri ecografici tendinei.

	<b>Valore</b>
<b>Spessore max (mm)</b>	7,04±2,79
<b>Spessore max&gt; 6,15 mm (n,%)</b>	58 (59,2)

In base al cut-off di 6,15 mm e alle caratteristiche di ecogenicità è stato possibile stabilire i criteri per considerare l'esame ecografico positivo per presenza di xantommi tendinei achillei, ovvero:

- spessore tendineo superiore a 6,15 mm e/o

- presenza di noduli ipoecogeni nello spessore del tendine

Ai 58 pazienti sopra descritti, presentanti uno spessore tendineo massimo superiore al cut-off, se ne aggiungevano 2 che presentavano solamente le formazioni ipoecogene in assenza di spessore tendineo patologicamente aumentato. Secondo i criteri sopraenunciati ne risultava che in totale 60 pazienti presentavano xantomi ecografici in almeno uno dei due tendini d’Achille.

Prendendo in considerazione l’intero gruppo studiato ne derivava che 38 soggetti (pari al 38,8% del totale) non avevano xantomi tendinei né all’esame obiettivo (EO-) né all’ecografia (US-). Al contrario 50 pazienti (pari al 51% del totale) presentavano xantomi all’ecografia (US+), ma non all’esame obiettivo (EO-). Com’era da attendersi invece tutti i pazienti (n=10) nei quali la palpazione manuale aveva rilevato xantomi tendinei erano anche positivi all’imaging ultrasonografico (US+, EO+) (Tabella XII).

**Tabella XII.** Relazione tra Xantomi obiettivi e Xantomi ecografici. Xantomi EO+/EO- = presenza/assenza di xantomi obiettivi; Xantomi US+/US- = presenza/assenza di xantomi ecografici. P-value = 0.000.

	<b>Xantomi EO-</b>	<b>Xantomi EO+</b>
<b>Xantomi US – (%)</b>	38,8	0,0
<b>Xantomi US + (%)</b>	51,0	10,2

Pertanto, per meglio definire le caratteristiche del gruppo con xantomi ecografici ma non obiettivabili, abbiamo messo a confronto i seguenti tre gruppi:

- Pazienti con xantomi ecografici ed obiettivi (pz US+EO+)
- Pazienti con xantomi US ma non EO (US+EO-)
- Pazienti senza xantomi US o EO (US-EO-)

I tre gruppi risultavano omogenei per quanto riguardava il sesso e l’età alla diagnosi. I soggetti US+EO+ presentavano un’età media più elevata rispetto agli altri due gruppi (58,8 $\pm$ 11,4, 48,4 $\pm$ 14,3 e 43,9 $\pm$ 17,0 anni, rispettivamente US+EO+, US+EO- e US-EO-; p= 0,023) (Tabella XIII).

Il DLCN score mostrava una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) tra i diversi gruppi confrontati, rivelandosi maggiore nel gruppo US+EO+ ( $16,7 \pm 4,9$ ) rispetto ai gruppi US+EO- ( $10,7 \pm 4,2$ ) e US-EO- ( $7,6 \pm 4,0$ ).

Per quanto riguardava l'assetto lipidico, si notava una tendenza all'aumento del valore del LDL-C nel gruppo con US+EO+, pur mantenendosi questo parametro su valori elevati anche negli altri gruppi. Anche il colesterolo totale risultava significativamente superiore ( $p < 0,001$ ) nel gruppo US+EO+ rispetto agli altri soggetti considerati. Le LDL ossidate non presentavano una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi considerati.

I tre gruppi risultavano omogenei in quanto ad anamnesi familiare di dislipidemia, ed eventi cardiovascolari precoci sia in famiglia che nella propria storia personale.

L'intensità della terapia ipolipemizzante differiva statisticamente ( $p = 0,028$ ) tra i gruppi. In particolare la terapia ad elevata efficacia era utilizzata maggiormente per i soggetti US+EO+.

Infine, a proposito della misurazione mediante eco-doppler dello spessore medio intimale a livello carotideo, è stata rilevata una differenza significativa tra i tre gruppi sia sullo spessore medio intimale valutato alla carotide comune di destra ( $p = 0,017$ ) sia alla carotide comune di sinistra ( $p = 0,014$ ). I pazienti che non presentavano né xantomi obiettivabili né xantomi visibili all'ecografia presentavano infatti un IMT carotideo inferiore rispetto a quelli con xantomi rilevati all'EO o tramite imaging.

**Tabella XIII.** Confronto dei parametri clinici, biumorali ed ecografici tra i tre gruppi in base alla presenza/assenza di xantomi ecografici e obiettivi. US+EO= presenza di xantomi ecografici ed obiettivi; US+EO- presenza di xantomi ecografici ed assenza di xantomi obiettivi; US- EO- assenza di xantomi sia ecografici che obiettivi. I dati sono espressi come media±deviazione standard. n.s.= non significativo.

Caratteristiche cliniche	US+EO+ (n=10)	US+EO- (n=51)	US-EO- (n=40)	ANOVA (p-value)
Sesso (m/f) (%)	2/8 (20/80)	22/29 (42/58)	15/25 (36,8/63,8)	n. s.
Età (anni)	<b>58,8±11,4</b>	<b>48,4±14,3</b>	<b>43,9±17,0</b>	<b>0,023</b> ◇
Età alla diagnosi (anni)	27,1±9,6	25,8±13,1	28,2±14,9	n. s.
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	<b>27,9±6,5</b>	<b>25,7±4,7</b>	<b>23,9±3,4</b>	<b>0,025</b> ◇
DCLN (score)	<b>16,7±4,9</b>	<b>10,7±4,2</b>	<b>7,6±4,0</b>	<b>0,000</b> ◇ ■ ○
CT basale (mg/dl)	<b>449,2±69,0</b>	<b>373,3±115,8</b>	<b>291,0±65,3</b>	<b>0,000</b> ◇ ■
TG basale (mg/dl)	107,2±50,9	117,4±59,9	103,5±53,1	n. s.
CT-HDL basale (mg/dl)	<b>51,5±12,9</b>	<b>58,8±16,1</b>	<b>64,5±13,6</b>	<b>0,035</b> ◇
CT-LDL basale (mg/dl)	<b>374,0±73,8</b>	<b>289,1±113,5</b>	<b>208,7±65,2</b>	<b>0,000</b> ◇ ■
LDL ossidate (mg/dl)	66.45±22.06	69.71±30.58	62.29±16.69	n.s.
Familiarità dislipidemia (%)	100	98	94,7	n. s.
Familiarità eventi CVD precoci (%)	60,0	44,7	31,6	n. s.
Storia personale CVD precoce (%)	30,0	14,0	7,9	n. s.
Terapia ad alta efficacia (%)	<b>80,0</b>	<b>47,8</b>	<b>30,8</b>	<b>0,028</b>

<b>IMT CC DX (mm)</b>	<b>0,9±0,2</b>	<b>0,6±0,2</b>	<b>0,6±0,2</b>	<b>0,017</b> ◇ ○
<b>IMT ACI DX (mm)</b>	1,4±1,2	0,5±0,3	0,6±0,2	<b>0,004</b> ◇
<b>IMT CC SN (mm)</b>	0,8±0,3	0,7±0,3	0,5±0,2	<b>0,014</b> ◇

◇: 0 vs 2, p<0,05      ▪: 0 vs 1, p<0,05      ○: 1 vs 2, p<0,05

I risultati delle correlazioni tra spessore massimo tendineo achilleo e profilo lipidico e valutazione ecografica carotidea sono presentati nella Tabella XIV. Per quanto riguarda l'assetto lipidico, lo spessore massimo achilleo è risultato significativamente correlato ai valori di CT e LDL-C, ed inversamente correlato ai valori di HDL-C (Figura 29). Non è emersa una correlazione significativa con le LDL ossidate. In merito all'esame ultrasonografico carotideo tutti i parametri considerati sono risultati significativamente correlati con lo spessore massimo del tendine di Achille.

**Tabella XIV.** Correlazioni tra spessore massimo del tendine achilleo e alcuni parametri dell'assetto lipidico e carotidei. n.s.= non significativo. IMT spessore intima media; CC= arteria carotide comune, ACI= arteria carotide interna

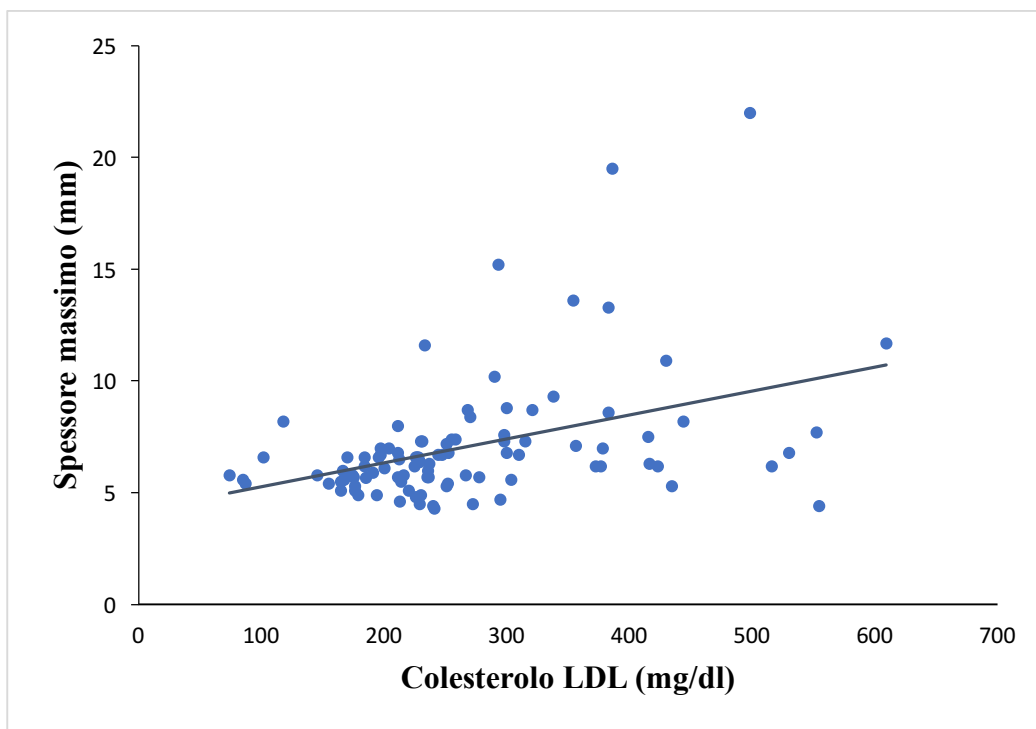
		Età	CT	CT-HDL	CT-LDL	LDL ox	IMT CC DX	IMT ACI DX	IMT CC SX	IMT ACI SX
<b>Spessore max.</b>	<b>Corr. di Pearson</b>	<b>0,215</b>	<b>0,372</b>	<b>-0,204</b>	<b>0,411</b>	-0.150	0,489	0,779	0,457	0,707
		◇	◇	◇	◇	n.s.	◇	◇	◇	◇

◇: p<0,05

$$y = 4,18 + 0,01x$$

$$R^2 = 0.169$$

**Figura 29** Correlazione tra spessore massimo tendineo e colesterolo LDL basale in tutti i soggetti.



Alla luce delle correlazioni rilevate è stata costruita un'analisi logica multivariata utilizzando come variabile dipendente lo xantoma ecografico e come variabili indipendenti quelle variabili risultate significativamente correlate con lo spessore tendineo massimo. Nel modello rappresentato in Tabella XVa, aggiustato per età e sesso, il colesterolo LDL basale risultava il parametro significativamente associato con la presenza di xantomi ( $p < 0,001$ ).

**Tabella XVa.** Analisi di regressione logica multipla con xantoma ecografico come variabile dipendente, ed LDL-C al tempo basale. n.s.= non significativo

	OR (IC 95%)	p value
<b>Età</b>	1,024 (0,993-1,055)	n.s.
<b>Sesso</b>	0,748 (0,285-1,963)	n.s.
<b>CT-LDL basale</b>	<b>1,014 (1,006-1,021)</b>	<b>0,000</b>

Anche nel modello aggiustato per età, sesso e terapia ad elevata efficacia il valore di LDL-C in terapia attuale si confermava statisticamente associato ( $p = 0,012$ ) agli xantomi tendinei.

**Tabella XVb.** Analisi di regressione logistica multipla con xantoma ecografico come variabile dipendente, ed LDL-C in terapia attuale. n.s.= non significativo.

	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p value</b>
<b>Età</b>	1,012 (0,973-1,053)	n.s.
<b>Sesso</b>	0,611 (0,205-1,818)	n.s.
<b>Terapia ad elevata efficacia</b>	2,314 (0,791-6,771)	n.s.
<b>LDL in terapia attuale</b>	<b>1,020 (1,004-1,035)</b>	<b>0,012</b>

I risultati delle correlazioni statisticamente significative tra LDL ossidate e spessore massimo tendineo achilleo, profilo lipidico e valutazione ecografica carotidea sono presentati nella Tabella XVI. Per quanto riguarda l'assetto lipidico, le LDL ossidate non sono risultate significativamente correlate ad alcun parametro così come non è emersa alcuna relazione con i parametri ecografici tendinei. In merito all'esame ultrasonografico carotideo, lo spessore medio intimale (IMT) a livello del bulbo bilateralmente è risultato significativamente correlato con i valori di LDL ossidate.

**Tabella XVI:** Correlazioni tra LDL ossidate, LDL e parametri ecografici carotidei.

		<b>IMT bulbo DX</b>	<b>IMT bulbo SX</b>	<b>LDL</b>
<b>LDL ossidate</b>	Corr. di Pearson	<b>0.381</b> ◇	<b>0.490</b> ◇	0.157

◇:  $p < 0,05$

In tabella XVII è stata analizzata la correlazione di Pearson tra valori di LDL ossidate nei tre gruppi (US-EO-, US+EO- e US+EO+) e alcuni parametri. In particolare si vede come i valori di LDL ossidate correlino con lo spessore massimo dei tendini solo nel gruppo di pazienti con xantomi obiettivi (0,752 con p value di 0,012). E' da notare che a dispetto della bassa numerosità del gruppo (solo 10 pazienti) la correlazione statistica sembra essere molto forte.

Il colesterolo totale e il C-LDL correlano con le LDL ossidate solo nel gruppo di pazienti con ecografia positiva (rispettivamente 0,706 con p value <0,001 e 0,732 con p value < 0,001). Questa correlazione si mantiene anche se valutiamo i pazienti totali (per il colesterolo totale la correlazione è di 0,572 con p value < 0,001 e per il C-LDL la correlazione è di 0,573 con p value < 0,001)

**Tabella XVII.** Correlazione tra le LDL ox nei tre gruppi e le tre variabili elencate.

	<b>Pazienti totali</b> (n=78)	<b>Pazienti US-EO-</b> (n=29)	<b>Pazienti US+EO-</b> (n=38)	<b>Pazienti US+EO+</b> (n=10)
<b>LDL ossidate in U/L</b>				
<b>Spessore max (mm)</b>	0,127	-0,150	-0,202	<b>0,752</b> ○
<b>CT (mg/dL)</b>	<b>0,572</b> ○	0,289	<b>0,706</b> ○	0,324
<b>CT-LDL (mg/dL)</b>	<b>0,573</b>	0,157	<b>0,732</b> ○	0,431

○: p<0,05



## **IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE: CARATTERIZZAZIONE GENETICA, ECOGRAFIA DEI TENDINI ACHILLEI E DUTCH LIPID CLINIC NETWORK SCORE**

Dei 101 pazienti sottoposti ad ecografia tendinea, la diagnosi genetica è attualmente disponibile per 74 soggetti. Di questi ultimi, 52 pazienti presentano mutazione coinvolgente il gene che codifica il recettore delle LDL (LDL-R) in forma eterozigote, di cui 23 portatori di allele nullo e 29 di sostituzioni amminoacidiche (delezioni), 2 soggetti con mutazione coinvolgente il gene per APOB in eterozigosi, 1 paziente con mutazione coinvolgente gene che codifica per PCSK9 in eterozigosi e 19 soggetti con ricerca negativa per le mutazioni note responsabili di FH.

Le analisi che seguono hanno preso in considerazione solo i 52 pazienti con mutazione coinvolgente LDLR e i 19 con ricerca delle mutazioni negativa per FH.

I soggetti sono stati suddivisi in tre gruppi rispettivamente in base alla:

- classe fenotipica/funzionale delle mutazioni dell'LDLR:
  - 23 pazienti con allele nullo (NA),
  - 29 pazienti con alterazioni della sequenza amminoacidica (DEF)
- 19 pazienti senza riscontro di mutazioni all'analisi genetica (NM)

I tre gruppi sono risultati simili per quanto riguarda età, genere e IMC.

I pazienti con classe fenotipica allele nullo e alterazioni della sequenza amminoacidica (quindi con mutazioni dell'LDLR) ricevevano diagnosi di FH con uno score secondo i criteri Dutch maggiore rispetto ai pazienti senza mutazioni rilevate ( $12.5 \pm 4.8$  vs  $12.4 \pm 4.7$  vs  $6.8 \pm 4.4$ ,  $p < 0.005$  Anova).

Tra le caratteristiche fisiche del FH, la presenza di xantomi e di gerontoxon risultava significativamente diversa tra i due gruppi, con una prevalenza nettamente maggiore nei pazienti appartenenti alla classe fenotipica allele nullo.

La storia familiare e personale dei pazienti dei tre gruppi risultava priva di differenze statisticamente significative.

In merito al profilo lipidico alla diagnosi, quindi in assenza di terapia ipocolesterolemizzante, i livelli di colesterolo totale e di CT-LDL erano significativamente differenti nei tre gruppi considerati. In particolare i pazienti con classe fenotipica allele nullo e alterazioni della sequenza amminoacidica mostravano livelli di colesterolemia totale (NA vs DEF vs NM  $390\pm 120$  vs  $405\pm 110$  vs  $284\pm 47$  mg/dl:  $p<0,001$  Anova) e CT-LDL (NA vs DEF vs NM  $316\pm 117$  vs  $321\pm 109$  vs  $199\pm 44$  mg/dl:  $p<0,001$  Anova) superiori rispetto ai pazienti senza mutazioni. Non vi erano differenze significative nei tre gruppi per quanto riguardava i trigliceridi e le lipoproteine ad alta densità (HDL).

Infine, la percentuale di pazienti in terapia ipocolesterolemizzante ad alta efficacia era statisticamente omogenea nei tre gruppi (*Tabella XVIII*).

**Tabella XVIII:** Caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti FH suddivisi per genotipo. NA= allele nullo, DEF=alterazioni della sequenza amminoacidica; NM=assenza di mutazioni responsabili di FH. IMC = indice di massa corporea, DCLN Dutch Clinic Lipid Network, CV= cardiovascolari. I dati sono espressi come media±deviazione standard. n.s.= non significativo.

	<b>NA (n=23)</b>	<b>DEF (n=29)</b>	<b>NM (n=19)</b>	<b>ANOVA p-value</b>
<b>Sesso(m/f) (%)</b>	9/14 (39/61)	10/19 (34/66)	9/10 (47/53)	n.s.
<b>Età (anni)</b>	<b>44±17</b>	<b>44±13</b>	<b>54±11</b>	<b>0.05</b>
<b>Età alla diagnosi (anni)</b>	<b>19±13</b>	<b>22±10</b>	<b>38±13</b>	<b>0.000</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25.4±3.5	25.3±5.8	25.3±2.6	n.s.
<b>DCLN Score (n)</b>	<b>12.5±4.8</b>	<b>12.4±4,7</b>	<b>6.8±4,4</b>	<b>&lt;0,005</b>
<b>Xantomi EO (%)</b>	<b>26,1</b>	<b>13,8</b>	<b>0</b>	<b>0.054</b>
<b>Gerontoxon (%)</b>	<b>43</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>0.057</b>
<b>CT basale (mg/dl)</b>	<b>398±120</b>	<b>405±110</b>	<b>284±47</b>	<b>0.000</b>
<b>TG basale (mg/dl)</b>	99±41	106±54	127±55	n.s.
<b>CT-HDL basale (mg/dl)</b>	59±16	58±18	62±14	n.s.
<b>CT-LDL basale (mg/dl)</b>	<b>316±117</b>	<b>321±109</b>	<b>199±44</b>	<b>0.000</b>
<b>APO B (mg/dl)</b>	120.86±32.18	132.50±44.37	106.65±28.9	n.s.
<b>LDL ossidate (U/L)</b>	64.44±19.1	76.25±34.2	58.9±16.7	n.s.
<b>Familiarità per dislipidemia (%)</b>	100	100	100	n.s.
<b>Familiarità per eventi CV precoci (%)</b>	<b>41</b>	<b>52</b>	<b>0</b>	<b>0.044</b>
<b>Storia personale eventi CV precoci (%)</b>	0	17.2	0	n.s.
<b>Terapia ad alta efficacia (%)</b>	59	51	0	n.s.
<b>Fumo (%)</b>	<b>26</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0.007</b>
<b>Iperensione arteriosa (%)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>37</b>	<b>0.025</b>
<b>Diabete mellito(%)</b>	0	0	0	n.s.

Gli spessori tendinei massimi tra i tre gruppi sono significativamente differenti (7,64±2.06mm vs 7,65±4.03mm vs 5,7±0.75mm; p< 0,005).

Tra i pazienti con Allele nullo, il 78,2% aveva spessore tendineo superiore al cut-off, tra i pazienti con Delezioni il 66,7% e tra i pazienti ipercolesterolemici ma con genetica negativa per FH, il 26,3% (Tabella XIX).

**Tabella XIX:** Caratteristiche ecografiche, LDL ossidate ed Apo B dei pazienti suddivisi per genotipo. Alcuni dati sono espressi come media±deviazione standard. n.s.= non significativo.

	NA (n=23)	DEF (n=29)	NM (n=19)	ANOVA p-value
Spessore max (mm)	7,95±2.43	7,77±4.04	5,78±0.80	<0,05
Spessore max> 6,15 mm (n,%)	18 (78.2)	20(66,7)	5 (26,3)	<0,001
LDL ossidate (U/L)	64.44±19.1	76.25±34.2	58.9±16.7	n.s.
APO B (mg/dl)	120.86±32.18	132.50±44.37	106.65±28.9	n.s.

Tra i pazienti con spessore tendineo superiore al cut off (> 6,15 mm), il 42 % presentava mutazioni per allele nullo, il 46% sostituzioni amminoacidiche e il 12% non presentava mutazioni tra quelle indagate.

Tra i pazienti portatori di mutazione per allele nullo, il 78,3% aveva xantomati ecografici (definiti come spessore tendineo superiore al cut off e/o formazioni ipoecogene), tra i pazienti con Delezioni il 72,4% e tra i pazienti ipercolesterolemici ma con genetica negativa per FH, il 31,6% (Tabella XX).

**Tabella XX:** Prevalenza degli xantomi tendinei ecografici in base al genotipo. NA= allele nullo, DEF=alterazioni della sequenza amminoacidica; NM=assenza di mutazioni responsabili di FH.

	NA (n=23)	DEF (n=29)	NM (n=19)	ANOVA p-value
<b>Xantomi US (n,%)</b>	<b>18(78,2)</b>	<b>21 (72.4)</b>	<b>6 (31,6)</b>	<b>&lt;0,001</b>

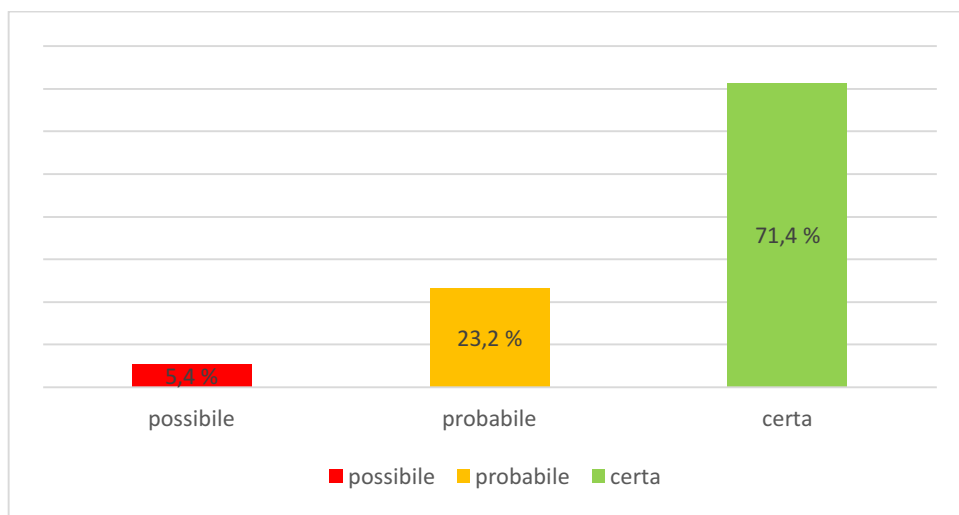
Tra i pazienti con xantomi tendinei ecografici, il 64 % presentava mutazioni per allele nullo, il 25% sostituzioni amminoacidiche e il restante 11% non presentava mutazioni tra quelle indagate.

Inoltre, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nella distribuzione delle formazioni ipoecogene tra i gruppi (Tabella XVII).

Gli xantomi ecografici nei tre gruppi si differenziano quindi per lo spessore massimo tendineo ma non per la presenza di formazioni ipoecogene.

Il Dutch Lipid Clinic Network Score da solo può permettere di ottenere diagnosi clinica di Ipercolesterolemia Familiare (FH). Infatti con score superiore a 8 abbiamo diagnosi certa di FH. Con score inferiore o uguale a 8, si distinguono due classi: diagnosi possibile se punteggio tra 3-5 e probabile se tra 6-8.

Tra i pazienti con test genetico positivo (n=56) il 71,4% aveva diagnosi certa secondo i criteri del Dutch Clinic Lipid Network Score, il 23,2 % diagnosi probabile, il 5,4% possibile (Figura 30).



**Figura 30:** Diagnosi clinica di Ipercolesterolemia Familiare (FH) secondo i criteri del Dutch Clinic Lipid Network (DLCN) nei pazienti con genotipo positivo per FH.

Ne risulta che 16 pazienti (il 28% di quelli con mutazione) non ottenevano un punteggio con il DLCS tale da formulare una diagnosi certa di FH nonostante fossero portatori di una mutazione responsabile di FH.

Pertanto abbiamo considerato i 16 pazienti la cui diagnosi con DCLS non fosse certa (<8 punti) e abbiamo valutato la frequenza degli xantomi sia obiettivi (EO) che ecografici (US). (Tabella XXI).

**Tabella XXI:** Prevalenza degli Xantomi obiettivi (EO) ed ecografici (US) nei pazienti con diagnosi genetica di FH.

	<b>Pz DLNS&lt;8 (n=16)</b>
<b>Xantomi EO (n, %)</b>	1 (6,3)
<b>Xantomi US (n, %)</b>	10 (62,5)

Quindi, dei 10 pz con xantomi US, uno solo aveva avuto reperto obiettivo. Escluso questo paziente, 9 pazienti presentavano xantoma US la cui presenza non è stata conteggiata nel DCLC Score.

## IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE: TRATTAMENTO CON INIBITORI DI PCSK9

Nel presente studio sono stati reclutati 20 soggetti con Ipercolesterolemia Familiare eterozigote, di cui 6 femmine e 14 maschi, che abbiamo esaminato in toto e stratificati in due gruppi in base alla terapia con inibitori di PCSK9 in atto, cioè con evolocumab o con alirocumab.

Dall'analisi dei dati (Tabella XXII) emerge che la popolazione reclutata aveva un'età media di 53 anni (deviazione standard 14 anni), senza differenze statisticamente significative tra il gruppo di pazienti in terapia con evolocumab e il gruppo in terapia con alirocumab.

Per quanto riguarda i dati antropometrici, i soggetti avevano un indice di massa corporea (IMC) espresso come media  $\pm$  deviazione standard pari a  $27,8 \text{ kg/m}^2 \pm 4,4$ . Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative per quanto riguarda peso, altezza e indice di massa corporea tra i due gruppi.

	Tutti	Evolocumab	Alirocumab	<i>p</i>
Sesso, %femmine (n)	30% (6)	40% (4)	20% (2)	<i>Ns</i>
% maschi (n)	70% (14)	60% (6)	80% (8)	
Età (anni)	$52,9 \pm 14,4$	$55,5 \pm 16,3$	$50,3 \pm 12,5$	<i>ns</i>
Peso (kg)	$81,7 \pm 15,7$	$77,8 \pm 18,3$	$85,6 \pm 12,3$	<i>ns</i>
Altezza (cm)	$173 \pm 8,0$	$172 \pm 9,2$	$174 \pm 7,0$	<i>ns</i>
IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	$27,8 \pm 4,4$	$26,3 \pm 4,7$	$29,3 \pm 3,8$	<i>ns</i>

**Tabella XXII.** Caratteristiche cliniche della popolazione stratificata in base alla terapia in atto con evolocumab o alirocumab. I dati sono espressi come media + deviazione standard. IMC=indice di massa corporea. ns=non significativo.

I dati anamnestici relativi a familiarità per dislipidemie e per malattia cardiovascolare (CVD) precoce sono descritti in Tabella XXIII, da cui si evince

che tutti i soggetti avevano familiarità per la presenza di dislipidemie e la maggior parte familiarità per malattia cardiovascolare precoce, senza differenze statisticamente significative tra il gruppo di pazienti in terapia con evolocumab e quello in terapia con alirocumab.

	Tutti	Evolocumab	Alirocumab	<i>p</i>
<b>Familiarità per dislipidemie, % (n)</b>	100% (20)	100% (10)	100% (10)	<i>ns</i>
<b>Familiarità per CVD precoce, % (n)</b>	85% (17)	80% (8)	90% (9)	<i>ns</i>

**Tabella XXIII.** Familiarità per dislipidemie e malattia cardiovascolare precoce (CVD). I dati sono espressi come percentuale e come numero puro, e stratificati in base alla terapia in atto con evolocumab o alirocumab. ns=non significativo.

In Tabella XXIV sono riportati i dati relativi alla storia personale di CVD precoce, malattia vascolare periferica (intesa come stenosi carotidea almeno del 20%), ipertensione arteriosa essenziale, diabete mellito e fumo in atto o pregresso.

	Tutti	Evolocumab	Alirocumab	<i>p</i>
<b>CVD precoce, % (n)</b>	55% (11)	50% (5)	60% (6)	<i>ns</i>
<b>Malattia vascolare periferica, % (n)</b>	50% (10)	40% (4)	60% (6)	<i>ns</i>
<b>Ipertensione arteriosa, % (n)</b>	20% (4)	20% (2)	20% (2)	<i>ns</i>
<b>Diabete mellito, % (n)</b>	10% (2)	0% (0)	20% (2)	<i>ns</i>
<b>Fumo attivo, % (n)</b>	10% (2)	0% (0)	20% (2)	<i>ns</i>
<b>Fumo pregresso, % (n)</b>	40% (8)	30% (3)	50% (5)	<i>ns</i>

**Tabella XXIV.** Anamnesi relativa a storia personale di CVD precoce, malattia vascolare periferica, ipertensione arteriosa, diabete mellito, fumo. I dati sono espressi in percentuale e numero puro, e stratificati in base alla terapia in atto con evolocumab o alirocumab. ns=non significativo.

In merito all'anamnesi personale dei soggetti reclutati, il 55% presentava storia di CVD precoce, il 50% di malattia vascolare periferica, mentre solo il 20% riferiva storia di ipertensione arteriosa essenziale e il 10% di diabete mellito. Inoltre, il



50% dei soggetti riferiva storia di fumo, dei quali il 10% attivo e il 40% pregresso. I due gruppi in studio non mostravano differenze statisticamente significative per quanto riguarda tali dati clinici anamnestici.

In Tabella XXV sono rappresentati i dati relativi all'esame obiettivo, con riferimento nello specifico ai segni clinici obiettivi di FH, cioè la presenza di xantomi tendinei, xantelasmi e/o arco corneale lipidico o Gerontoxon.

Dai dati raccolti emerge come, tra i soggetti in studio, sia stata reperita la presenza di xantomi tendinei nel 55% dei casi, di xantelasmi nel 15% e di Gerontoxon nel 40%, senza differenze statisticamente significative tra il gruppo di pazienti in terapia con evolocumab e quello in terapia con alirocumab.

	Tutti	Evolocumab	Alirocumab	<i>p</i>
Xantomi tendinei, % (n)	55% (11)	70% (7)	40% (4)	<i>ns</i>
Xantelasmi, % (n)	15% (3)	10% (1)	20% (2)	<i>ns</i>
Gerontoxon, % (n)	40% (8)	20% (2)	60% (6)	<i>ns</i>

**Tabella XXV.** Dati relativi a presenza di xantomi tendinei, xantelasmi e Gerontoxon (arco corneale), espressi come percentuale e numero puro, e stratificati in base alla terapia in atto con evolocumab o alirocumab. ns=non significativo.

Tutti i soggetti reclutati nello studio erano in terapia con statine a media/elevata efficacia al dosaggio massimale tollerato, stabile da almeno 6 mesi. In particolare un soggetto era in trattamento con pravastatina 40/80 mg, 4 pazienti con simvastatina 40/80 mg, 3 pazienti con atorvastatina 40/80 mg e 12 con rosuvastatina 20/40 mg. Tutti i pazienti reclutati erano in trattamento aggiuntivo con ezetimibe, eccetto un soggetto che aveva manifestato intolleranza. Si segnala inoltre che prima di iniziare il trattamento con inibitori di PCSK9, due dei nostri pazienti venivano regolarmente sottoposti a trattamento con LDL-afesi, con frequenza settimanale o bisettimanale, e che nel corso degli anni di terapia con

inibitori di PCSK9 hanno potuto sospendere il trattamento aferetico. Tra i nostri soggetti, i 12 pazienti in prevenzione secondaria erano in terapia farmacologica massimale tollerata per quanto riguarda la cardiopatia ischemica, in particolare tutti erano in terapia antiaggregante singola o doppia, 4 in terapia con ace-inibitori o sartani, 10 con beta bloccanti, 2 con calcio-antagonisti.

In Tabella XXVI sono rappresentati i dati relativi al profilo lipidico, caratterizzato da colesterolo totale, colesterolo delle LDL (lipoproteine a bassa densità), colesterolo delle HDL (lipoproteine ad alta densità), colesterolo non-HDL e trigliceridi, presentato dai pazienti in studio prima di iniziare qualsiasi terapia ipolipemizzante e in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale, intesa come statine ad alta efficacia al massimo dosaggio tollerato in associazione con ezetimibe.

	Senza terapia	In terapia massimale tradizionale	<i>p</i>
<b>Colesterolo Totale (mg/dl)</b>	450,5 ± 84,4	243,2 ± 37,8	<b>0,000</b>
<b>Colesterolo delle LDL</b>	375,9 ± 80,5	168,6 ± 29,8	<b>0,000</b>
<b>Colesterolo delle HDL</b>	46,9 ± 14,9	45,8 ± 13,6	<i>ns</i>
<b>Colesterolo non-HDL</b>	403,6 ± 89,1	197,4 ± 39,2	<b>0,000</b>
<b>Trigliceridi</b>	141,3 ± 65,5	138,9 ± 56,5	<i>ns</i>

**Tabella XXVI.** Profilo lipidico dei pazienti in studio in assenza di terapia ipolipemizzante e in corso di terapia ipolipemizzante massimale tradizionale. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. ns=non significativo.

Nella popolazione reclutata è evidente come in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale i livelli di colesterolo totale, colesterolo delle LDL e colesterolo non-HDL si riducano significativamente rispetto ai livelli in assenza di qualsiasi terapia ipolipemizzante. Invece, non sono risultate differenze statisticamente significative per quanto riguarda i livelli di colesterolo delle HDL e di trigliceridi in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale rispetto ai livelli in assenza di terapia.

In Tabella XXVII vengono riportati nuovamente i valori del profilo lipidico nei pazienti in studio in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale, confrontati con i valori del profilo lipidico in corso di terapia aggiuntiva con inibitori di PCSK9 (evolocumab o alirocumab).

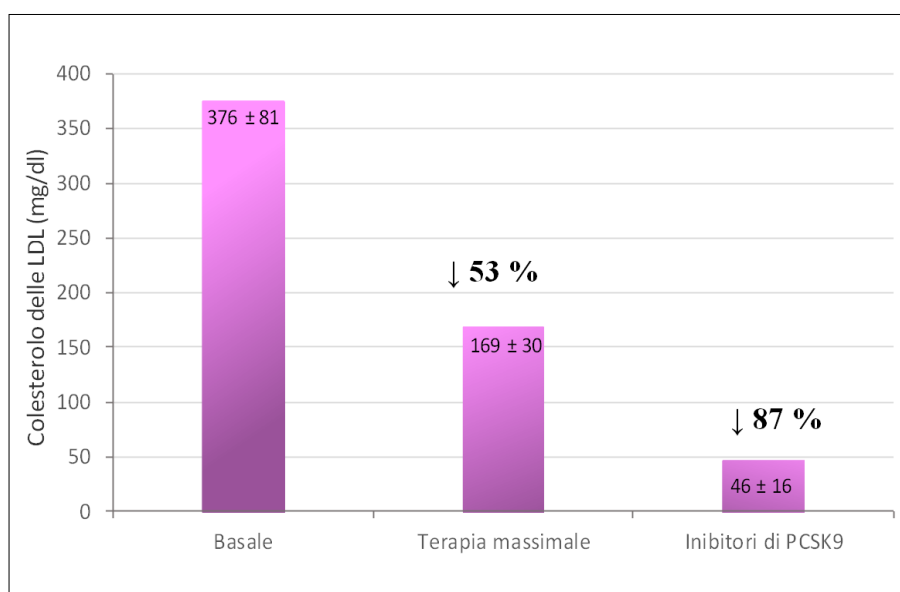
	In terapia massimale tradizionale	In terapia aggiuntiva con inibitori di PCSK9	<i>p</i>
<b>Colesterolo Totale (mg/dl)</b>	243,2 ± 37,8	115,3 ± 23,3	<b>0,000</b>
<b>Colesterolo delle LDL</b>	168,6 ± 29,8	46,0 ± 16,0	<b>0,000</b>
<b>Colesterolo delle HDL</b>	45,8 ± 13,6	47,1 ± 14,1	<i>ns</i>
<b>Colesterolo non-HDL</b>	197,4 ± 39,2	68,2 ± 18,8	<b>0,000</b>
<b>Trigliceridi</b>	138,9 ± 56,5	112,9 ± 51,8	<b>0,006</b>

**Tabella XXVII.** Profilo lipidico dei pazienti in studio in corso di terapia ipolipemizzante massimale tradizionale e con l'aggiunta di terapia con inibitori di PCSK9. I dati sono espressi come media ± deviazione standard. ns=non significativo.

Nella popolazione in studio si è osservata una riduzione significativa dei livelli di colesterolo totale, di colesterolo delle LDL, di colesterolo non-HDL e di trigliceridi in corso di terapia aggiuntiva con inibitori di PCSK9 rispetto a quelli in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale. Non si sono dimostrate, invece, differenze statisticamente significative per quanto riguarda i livelli di colesterolo delle HDL.

Nella Figura 31 è illustrata l'efficacia rispettivamente della terapia ipolipemizzante tradizionale massimale e della terapia aggiuntiva con PCSK9. Essa viene espressa in termini di percentuale di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL rispettivamente in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale e in corso di terapia aggiuntiva con inibitori di PCSK9 rispetto ai livelli basali in assenza di terapia ipolipemizzante.

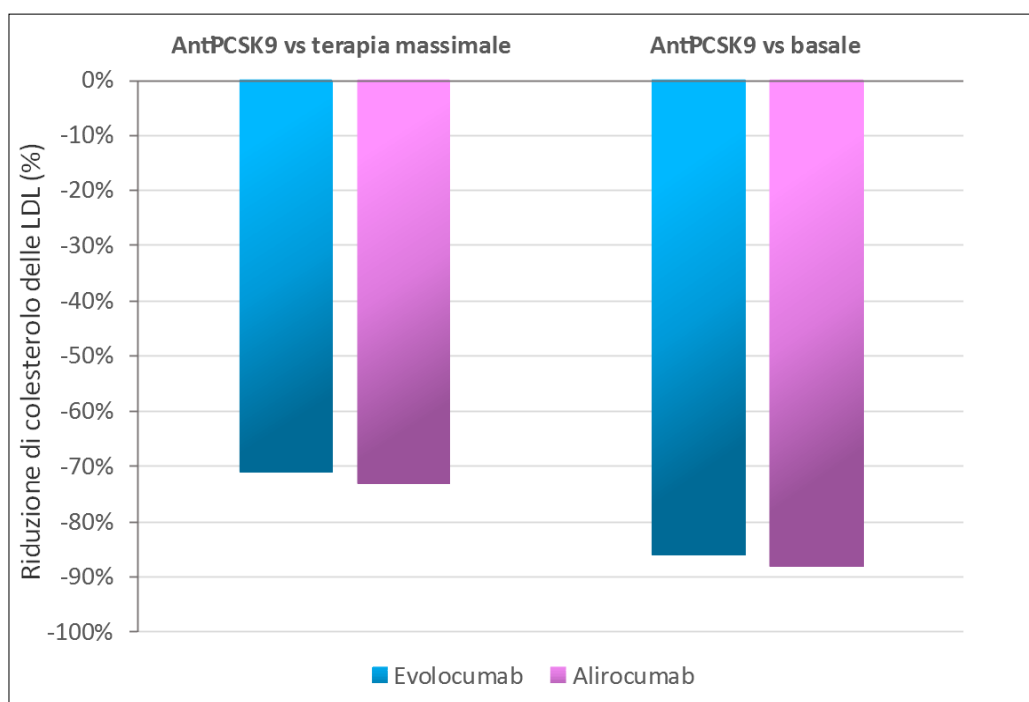
**Figura 31.** Riduzione media dei livelli di colesterolo delle LDL in terapia ipolipemizzante massimale e terapia aggiuntiva con inibitori di PCSK9 rispetto ai livelli basali in assenza di terapia (espresso in mg/dl e percentuale rispetto ai livelli basali).



Nella popolazione reclutata per lo studio si è dimostrata in corso di trattamento ipolipemizzante tradizionale massimale una riduzione media dei livelli di colesterolo delle LDL pari al 53% rispetto ai livelli in assenza di terapia, in un range da un minimo di 21,6% a un massimo di 69,4%.

In seguito all'aggiunta di trattamento con inibitori di PCSK9 si è ottenuta, rispetto al trattamento ipolipemizzante tradizionale massimale, una riduzione media ulteriore dei livelli di colesterolo delle LDL del 72,4%, con valore minimo pari a 41,5% e massimo pari a 87,5%. Osservando i livelli di colesterolo delle LDL in seguito all'aggiunta di terapia con inibitori di PCSK9 rispetto alla situazione basale in assenza di terapia ipolipemizzante, nei pazienti in studio si è dimostrata una riduzione media pari a 86,9%, con valore minimo di 72,8% e massimo di 95,9%.

Il confronto tra il trattamento con i due diversi anticorpi monoclonali anti-PCSK9 (evolocumab e alirocumab) in termini di percentuale di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL è rappresentato nella Figura 32.



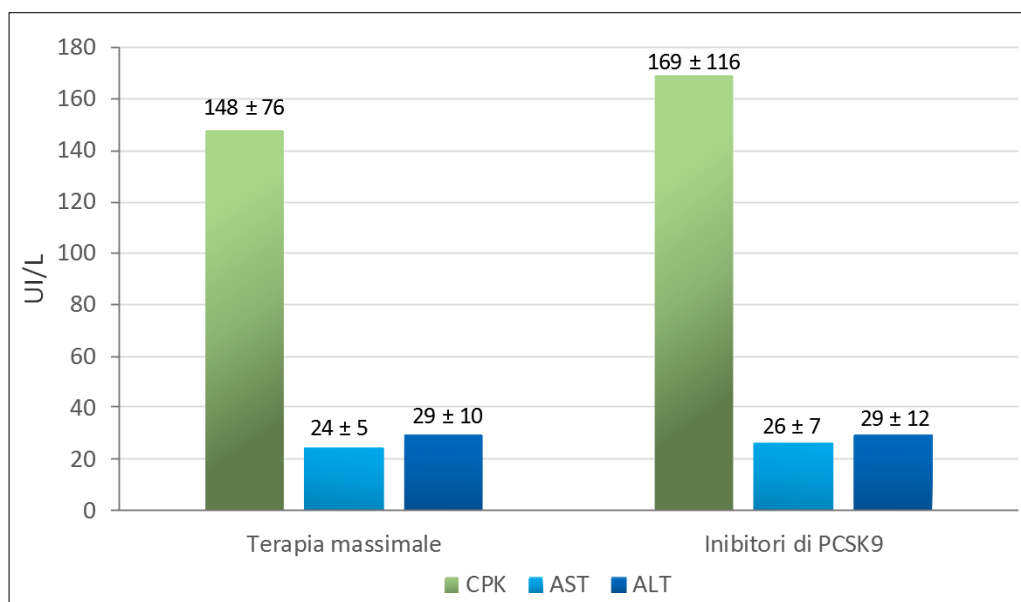
**Figura 32.** Riduzione percentuale dei livelli di colesterolo delle LDL, confrontando terapia con evolocumab e con alirocumab.

Nella popolazione in studio non sono emerse differenze statisticamente tra il trattamento con evolocumab e quello con alirocumab in termini di percentuale di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL, sia confrontando i livelli di colesterolo LDL in seguito all'introduzione della terapia con inibitori di PCSK9 rispetto ai livelli di colesterolo delle LDL in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale, sia confrontandolo con il valore di colesterolo delle LDL in assenza di terapia ipolipemizzante.

All'interno della popolazione in studio, il 35% dei soggetti era da considerarsi in prevenzione primaria per cui l'obiettivo di colesterolo delle LDL era pari a 100 mg/dl. Per il restante 65%, essendo nella categoria relativa alla prevenzione secondaria, era previsto l'obiettivo in termini di colesterolo delle LDL pari a 70 mg/dl.

In corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale si otteneva l'obiettivo di colesterolo delle LDL previsto in base al personale livello di rischio cardiovascolare nello 0% dei casi. Con l'aggiunta della terapia con inibitori di PCSK9, invece, il 100% dei soggetti reclutati per lo studio otteneva il raggiungimento dell'obiettivo di colesterolo delle LDL previsto.

Nella Figura 33 sono rappresentati i livelli di CPK, AST e ALT (espressi come media  $\pm$  deviazione standard) nei pazienti in studio in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale e in corso di terapia aggiuntiva con inibitori di PCSK9.



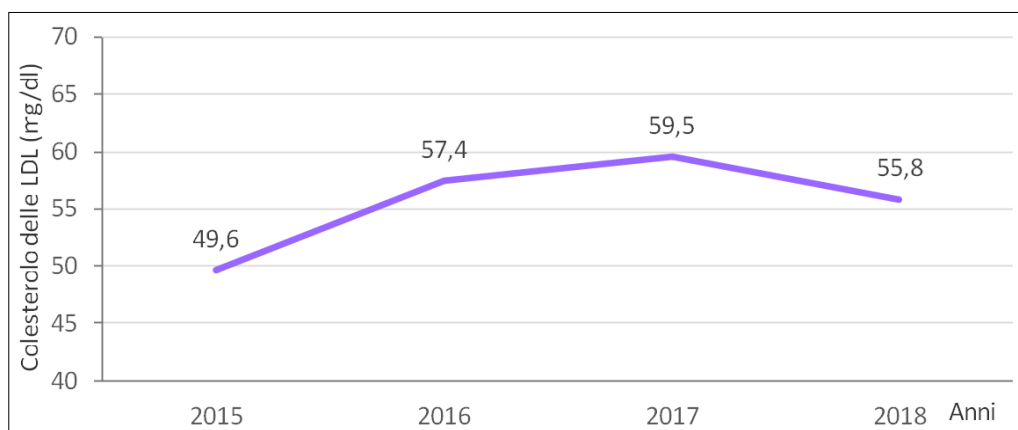
**Figura 33.** Livelli di CPK, AST e ALT espressi in UI/L come media  $\pm$  deviazione standard, in terapia ipolipemizzante massimale e in terapia aggiuntiva con inibitori di PCSK9.

Nei pazienti in studio, in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale, i livelli di CPK espressi come media  $\pm$  deviazione standard erano  $147,6 \pm 76,0$  UI/L, con valore minimo di 66 e massimo di 368. Con l'introduzione del trattamento con inibitori di PCSK9 i livelli di CPK non presentavano un aumento statisticamente significativo rispetto alla terapia ipolipemizzante tradizionale massimale, essendo pari a  $169,5 \pm 116,3$  UI/L, con valore minimo di 18 e

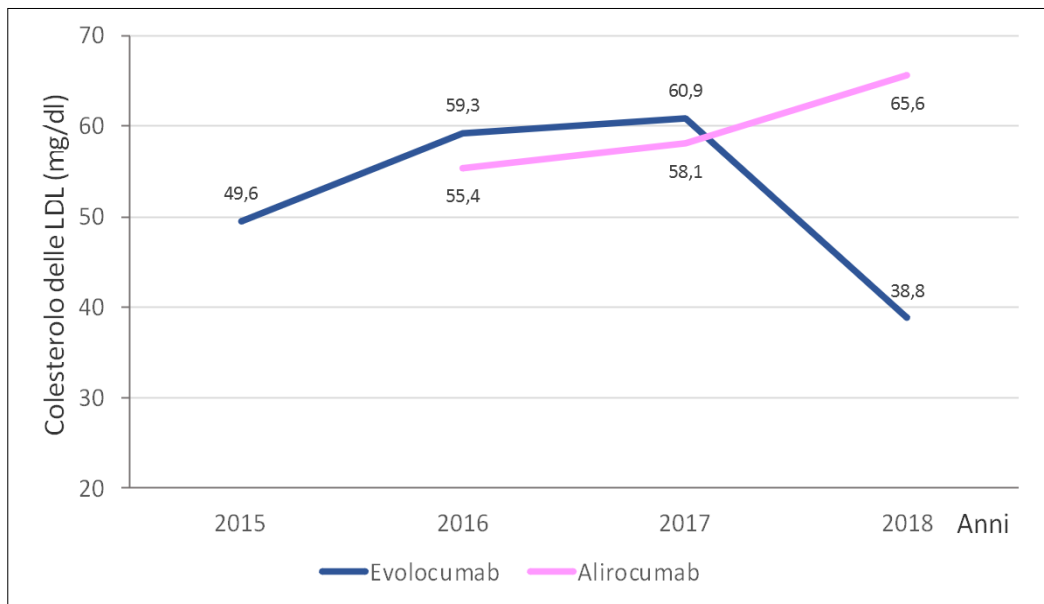
massimo di 480. Nessuno dei pazienti in studio ha riferito sintomatologia muscolare significativa in seguito all'aggiunta di terapia con inibitori di PCSK9.

Per quanto riguarda le transaminasi, in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale i livelli di AST e ALT espressi come media  $\pm$  deviazione standard erano rispettivamente pari a  $24,3 \pm 5,0$  UI/L e pari a  $29,2 \pm 10,3$  UI/L. In seguito all'aggiunta di terapia con inibitori di PCSK9, non si osservava un aumento statisticamente significativo di AST e ALT, i cui livelli espressi come media  $\pm$  deviazione standard risultavano rispettivamente pari a  $25,9 \pm 6,7$  UI/L e pari a  $29,0 \pm 11,8$  UI/L. Due pazienti di genere femminile, una in trattamento con evolocumab e una con alirocumab, hanno riferito comparsa di lieve rinorrea autolimitantesi al mattino, forse da considerate come quadro di "rinite allergica", che tuttavia non ha influenzato la prosecuzione della terapia. Alcuni soggetti hanno riferito delle reazioni cutanee transitorie nel sito di iniezione, come "rossore" e/o "prurito" non meglio caratterizzate e mai evidenziate alla nostra osservazione.

Per analizzare l'efficacia e la sicurezza a lungo termine della terapia con inibitori di PCSK9 abbiamo osservato l'andamento dei livelli di colesterolo delle LDL nel corso degli anni di trattamento aggiuntivo con inibitori di PCSK9 oltre a terapia ipolipemizzante tradizionale massimale tollerata, disponibile per 14 dei pazienti in studio (il 70% del totale della popolazione reclutata). Tale andamento è illustrato in Figura 34 per i 14 pazienti in toto e in Figura 35 distinto tra pazienti in trattamento con evolocumab e con alirocumab.



**Figura 34.** Andamento negli anni del colesterolo delle LDL nei pazienti in studio in trattamento aggiuntivo con inibitori di PCSK9.



**Figura 35.** Andamento negli anni del colesterolo delle LDL nei pazienti in studio in trattamento aggiuntivo con inibitori di PCSK9, distinto tra evolocumab e alirocumab

Si può osservare che i livelli di colesterolo delle LDL si mantengono abbastanza stabili nel corso degli anni. Nel 2015 i livelli di colesterolo delle LDL nei pazienti in studio espresso come media  $\pm$  deviazione standard era pari a  $49,6 \pm 12,2$  mg/dl, con valore minimo di 31 e massimo di 61, mentre nel 2018 si sono osservati livelli di colesterolo delle LDL pari a  $55,8 \pm 30,7$ .

Confrontando la terapia aggiuntiva con evolocumab e alirocumab, non si osservano differenze in merito al mantenimento dei livelli di colesterolo delle LDL nel corso degli anni.





## DISCUSSIONE

A fronte dell'enorme mole di conoscenze ed evidenze scientifiche che negli ultimi quarant'anni hanno permesso di comprendere i meccanismi di malattia, le cause genetiche e le possibilità di trattamento, l'Ipercolesterolemia Familiare (FH) rimane sotto-diagnosticata e sotto-trattata comportando tra l'altro nella pratica un evidente aumento della spesa sanitaria per l'assistenza di pazienti nei quali l'evento clinico si sarebbe potuto prevenire [3, 5].

In Italia, infatti, come anche in altre realtà europee, l'Ipercolesterolemia Familiare è sotto-diagnosticata con solo l'1% degli affetti con diagnosi genetica certa, e sotto-trattata con la maggior parte dei soggetti FH che non raggiunge il target per LDL-colesterolo (CT-LDL) [49]. La problematica del sotto-trattamento in questa tipologia di pazienti emerge anche dal nostro lavoro, in cui solamente il 49.2% del totale dei pazienti con FH assume una terapia ad elevata efficacia e solo il 4.3% del totale dei pazienti riesce a raggiungere il target per LDL-colesterolo (CT-LDL < 100 mg/dl). Questi dati sono in accordo con la letteratura esistente che mette in luce come anche nei migliori centri internazionali il raggiungimento dell'obiettivo terapeutico divenga più difficile all'abbassarsi del CT-LDL target [139].

Va sottolineato come solo la precoce identificazione di tali pazienti e il precoce raggiungimento del target terapeutico siano gli unici strumenti in grado di ridurre il rischio cardiovascolare in questi pazienti; gli FH infatti hanno il "LifetermRisk" più alto se confrontati con le altre categorie di pazienti a rischio, proprio perché l'esposizione ad elevati livelli di LDL-colesterolo inizia alla nascita (Figura 15).

In questo contesto si inserisce la necessità di creare un network fondato su una stretta interazione tra centri clinici e territorio, al fine di identificare pazienti con dislipidemie genetiche, facilitarne la diagnosi genetico-molecolare di dislipidemia, contribuire ad aumentare la consapevolezza e la cultura nell'ambito delle dislipidemie genetiche, creare un database nazionale e favorire la ricerca consorziata nel campo delle dislipidemie genetiche. In Italia tali necessità sono state recepite e, sotto l'egida scientifica della Società Italiana per lo Studio dell'Arteriosclerosi – SISA, ha preso forma il progetto LIPIGEN

(LipidTransportDisordersItalianGenetic Network) che attualmente vede coinvolti numerosi centri [69].

Nella pratica attuale, l'individuazione delle forme genetiche avviene prevalentemente in modo opportunistico (riscontro a seguito di contatti richiesti dal paziente per i motivi più diversi), dato che le procedure di screening attivo non sono ancora compatibili con le risorse disponibili e con la pratica clinica comunemente messa in atto da colleghi specialisti e medici di medicina generale. L'elevato numero di contatti con la gran parte della popolazione assistita nel corso di pochi anni permette comunque un approccio sistematico ed efficace a questo problema semplicemente applicando quanto già previsto dalle linee guida come normale buona pratica clinica.

La diagnosi clinica di FH può avvalersi di un utile strumento, l'algoritmo diagnostico, che, con un opportuno sistema di punteggi permette di formulare una diagnosi certa attraverso una semplice anamnesi clinica e biochimica del paziente e dei familiari di primo grado, pur non raggiungendo l'accuratezza diagnostica di un'indagine genetica.

Anche i nostri dati confermano quanto emerge in letteratura in merito al grado di sovrapposizione tra diagnosi clinica e diagnosi molecolare nei pazienti FH; i dati pubblicati evidenziano come un 10-40% dei soggetti con diagnosi clinica non ha una mutazione causale rilevabile [39, 40]. I pazienti arruolati nel nostro studio, avevano un DCLN Score piuttosto elevato ( $11.1 \pm 4.8$ ), a fronte del quale però nel 19.6% dei casi non è stata riscontrata una mutazione rilevabile; i pazienti per cui non è stata ritrovata una mutazione presentavano in quasi il 60% dei casi una diagnosi clinica probabile o possibile e nel restante 30% una diagnosi certa per FH. Pertanto, nonostante il raffinato contributo della genetica, l'assenza del riscontro di una mutazione riconosciuta non deve far cambiare né ritardare la terapia ipocolesterolemizzante nel paziente con diagnosi clinica di FH.

L'indagine genetico-molecolare può comunque fornire la certezza della diagnosi con differenziazione delle varie forme di ADH e può promuovere e facilitare il counseling genetico, screening a cascata per identificare soggetti affetti appartenenti allo stesso nucleo familiare, possibilità di aumentare l'aderenza alla dieta ed al trattamento farmacologico, identificare soggetti a rischio molto elevato

di CAD precoce o aterosclerosi preclinica.

A tal proposito con il nostro studio abbiamo cercato di analizzare il possibile rapporto tra genotipo e fenotipo in base alle differenti classi funzionali di mutazione e all'assenza di rilievo di mutazione. Dalle nostre analisi non sono emerse differenze rilevanti tra il sottogruppo portatore di allele nullo ed il sottogruppo portatore di altre alterazioni della sequenza amminoacidica, probabilmente a causa della forma eterozigote che vede il difetto compensato da parte dell'allele sano. Anche dai nostri dati è comunque emersa la tendenza ad un fenotipo più severo da parte della variante nulla LDLR. La correlazione genotipo-fenotipo comunque merita di essere indagata, perché una delle principali implicazioni della individuazione del difetto molecolare nell'ambito di una data famiglia affetta da FH è un più preciso orientamento clinico e terapeutico così che la scelta terapeutica possa essere mirata in base al deficit presente.

Il riscontro all'esame obiettivo di gerontoxon, xantelasmi e xantomi palpabili a livello dei tendini di Achille sono reperti suggestivi per poter indirizzare il clinico verso la diagnosi di FH. Infatti il riscontro di xantomi alla palpazione manuale rende conto da solo di un punteggio pari a 6 all'interno del DCLN Score.

L'utilità di questo segno è stata finora limitata dalla bassa sensibilità della palpazione, in quanto il rilievo di xantomi tendinei è soggettivo e si basa sull'esperienza del medico, e d'altronde vi possono essere ispessimenti così lievi (ma specifici) e noduli xantomatosi così minuti da sfuggire alla palpazione anche da parte del clinico più esperto.

Oggi giorno l'ecografia come strumento diagnostico è una tecnica molto utilizzata anche al letto del paziente grazie alla sua facilità di esecuzione, non invasività ed economicità. In tale contesto da qualche anno questa metodica sta prendendo piede anche come supporto nella diagnosi clinica di individui FH. L'interesse per questo tipo di approccio nasce nell'ambito di alcuni studi pilota risalenti già alla fine degli anni '80, grazie alle intuizioni dei giapponesi Yuzawa I.S. et al.,[140] o il gruppo di Ebeling et al. [141] per citarne alcuni, i quali cominciarono ad utilizzare l'ecografia dei tendini di Achille come ausilio per la ricerca di xantomi

ancora subclinici, quale strumento di supporto nella diagnosi di soggetti sospetti per essere FH eterozigoti.

Nell'ambito della valutazione ecografica tendinea abbiamo posto particolare attenzione nell'indagare lo spessore massimo misurato per ogni coppia di tendini achillei. Tale parametro è stato quello su cui si è focalizzata anche la maggior parte della letteratura a tal riguardo[140, 141, 142]. Il cut-off da noi utilizzato per classificare come patologico lo spessore tendineo massimo (6,15 mm) è stato tratto dallo studio del collega patavino Simoni F. et al.[ 138] e tale cut-off è peraltro in linea con quelli proposti da altre casistiche presenti in letteratura: Deschamps et al.[143] hanno proposto un limite analogo (5,8 mm), riportando valori di sensibilità e specificità associati sovrapponibili a quelli del nostro studio (75% e 85% rispettivamente); Junyent et al.[142] hanno proposto cut-off specifici per sesso ed età ovvero 5,3 mm per gli uomini <45 anni, 5,7 mm per gli uomini > 45 anni, 4,8 mm per le donne <50 anni e 4,9 mm per le donne > 50 anni, riportando valori di sensibilità più bassi (49-75%) e specificità più alta (81-91%). È possibile che tali differenze derivino dalle differenze nelle modalità di selezione e nella numerosità della casistica.

In base al cut-off di 6,15 mm e alle caratteristiche di ecogenicità abbiamo definito l'esame ecografico positivo per presenza di xantomi tendinei achillei in presenza di spessore tendineo superiore a 6,15 mm e/o presenza di noduli ipoecogeni nello spessore del tendine. Tale definizione è in accordo con la maggior parte di quelle che si stanno proponendo in letteratura e che considerano lo xantoma ecografico come la presenza di uno spessore tendineo superiore ad un determinato cut-off, associato o meno a disomogeneità ecografiche. Va sottolineato che questa definizione è ancora oggetto di discussione, visto l'esiguo numero di studi in tal senso, e che sarebbe auspicabile la produzione di una maggior letteratura a riguardo per poter supportare con studi più solidi una definizione di interesse clinico così promettente.

Nella nostra popolazione l'ecografia tendinea si è dimostrata infatti in grado di rivelare una notevole prevalenza di xantomi ecografici dei tendini achillei in soggetti il cui esame obiettivo era apparentemente normale, con il 51% di ecografie positive in pazienti FH classificati prima erroneamente come indenni.

L'esame obiettivo mediante palpazione manuale aveva invece riscontrato la presenza di xantomi solamente in un 10,2% dei soggetti esaminati.

Pur consapevoli dei limiti numerici del nostro studio, nei nostri pazienti abbiamo riscontrato delle correlazioni significative tra la presenza di xantomi tendinei (ecografici e non) ed uno spessore medio-intimale aumentato. Questo dato supporterebbe l'ipotesi (già esplorata in letteratura (144, 145, 146) secondo la quale la presenza di xantomatosi tendinea sottenderebbe ad un fenotipo clinico più aggressivo in termini di danno vascolare. Tuttavia non è ancora possibile stabilire con certezza l'entità del rischio cardiovascolare aggiuntivo conferito dalla presenza di xantomi tendinei, vista la molteplicità di fattori implicati nello sviluppo di malattia CV, come ad esempio lo stato di infiammazione sistemica o la presenza di altri fattori genetici indipendenti.

Per poter interpretare meglio questi risultati, va sicuramente notato come nei nostri pazienti la storia naturale della malattia sia stata pesantemente modificata dall'intenso regime terapeutico al quale la maggioranza di loro era sottoposta da molti anni. Tuttavia l'analisi multivariata ha permesso, nonostante quelli che potevano essere dei fattori confondenti come l'età e per l'appunto la somministrazione di terapia ad elevata efficacia, di stabilire che è il valore di colesterolemia LDL (sia al momento della diagnosi sia durante la terapia ipolipemizzante) il maggiore determinante per la presenza degli xantomi tendinei.

In questo lavoro si è voluto valutare una possibile correlazione tra i livelli di LDL ossidate e lo spessore del tendine d'Achille. Il razionale di ciò è quello di pensare che il processo di sviluppo ed evoluzione dello xantoma tendineo siano uguali a quelli della placca aterosclerotica presente a livello subintimale dei vasi arteriosi.

Dai dati analizzati emerge che i tre gruppi di pazienti stratificati in base alla presenza/assenza di xantomi ecografici ed obiettivi sono omogenei per quanto riguarda i livelli di LDL ossidate ma non si evidenzia una correlazione statisticamente significativa tra i livelli di LDL ossidate e lo spessore dei tendini.

Questo probabilmente dipende dal fatto che i tendini rappresentano una zona di accumulo del colesterolo ma non di infiammazione: nei tendini infatti non è presente un endotelio e dei macrofagi che attivano la risposta infiammatoria.

Quindi l'ispessimento tendineo si sviluppa a causa dei livelli elevati di LDL colesterolo in circolo ma a questo accumulo non fa seguito tutta la cascata patogenetica infiammatoria che permette lo sviluppo della placca aterosclerotica.

Solo nel gruppo che presenta sia xantomi obiettivi che ecografici risalta una correlazione significativa tra le LDL ossidate e lo spessore tendineo (0,752, p value = 0,012), è questo infatti il gruppo con manifestazioni xantomatose apprezzabili già obiettivamente oltre che ecograficamente, verosimilmente quindi un fenotipo clinico più grave o uno stato di malattia più avanzato. A questo stesso risultato è giunto lo studio olandese svolto nel 2009 [52] nel quale si è vista una correlazione tra la presenza di xantoma valutato all'esame obiettivo e alcuni polimorfismi dei geni responsabili della pathway delle LDL ossidate. Questo portava gli studiosi a rafforzare l'idea che lo xantoma e la placca aterosclerotica condividessero lo stesso meccanismo patogenetico. Probabilmente in realtà c'è una causa comune che gli accumuna e cioè i livelli elevati di LDL in circolo. Inoltre va aggiunto che la grandezza delle LDL in circolo nei pazienti con FH è molto grande quindi tendono a ossidarsi con più difficoltà [147].

Interessante a tal proposito sarà lo sviluppo di ricerche riguardanti lo studio del trasporto inverso del colesterolo al fine di valutare se un livello elevato di C-HDL possa far regredire gli xantomi del tendine d'Achille.

Questo lavoro, seppure abbia preso in considerazione un limitato numero di paziente con diagnosi genetica positiva per Ipercolesterolemia Familiare (n=10), ha inoltre cercato di sondare che spazio potrebbe avere l'ecografia tendinea nella riformulazione della diagnosi clinico-strumentale di Ipercolesterolemia Familiare soprattutto in quei pazienti con diagnosi probabile o possibile di FH tramite DLCN Score.

Col limite della numerosità, ne è emerso come in pazienti con DLCN Score da 3 a 8 punti, quindi con diagnosi clinica non certa di FH, in cui era presente xantoma ecografico ma non obiettivo, l'aggiunta dei 6 punti legati alla presenza di xantomi tendinei, avrebbe portato a diagnosi certa di FH.

In questo contesto, viene dunque da chiedersi se non sia giunto il momento di approfondire gli studi in questa direzione, puntando in un futuro prossimo al possibile inserimento dell'ecografia tendinea (esame di facile esecuzione anche a livello ambulatoriale, con un'elevata sensibilità e specificità, dal basso costo e che non utilizza radiazioni ionizzanti quindi privo di rischi per il paziente) anche all'interno degli stessi criteri di attribuzione del DCLN score. Tale strumento potrebbe infatti rivelarsi un valido alleato per il clinico, aiutandolo nel raggiungimento di una diagnosi sempre più precoce, ed una garanzia per il paziente di ricevere quanto prima il trattamento farmacologico più adeguato alla sua fascia di rischio.

I continui sforzi della ricerca porteranno verosimilmente ad opzioni di trattamento più efficaci e a strategie ottimali di trattamento in questo gruppo di pazienti, anche se in ogni caso è necessario ed opportuno mantenere l'attenzione sulla tutela della salute e la qualità di vita del paziente.

Dalla scoperta di PCSK9, entro circa 10 anni è stata possibile la sintesi di anticorpi monoclonali inibitori di tale proteina, dei quali evolocumab e alirocumab sono attualmente i farmaci in commercio, da somministrare in aggiunta a terapia ipolipemizzante tradizionale massimale secondo le linee guida definite [134,136].

In letteratura sono stati pubblicati recenti studi di efficacia e di sicurezza sia per evolocumab sia per alirocumab, esplorando popolazioni differenti con differente terapia ipolipemizzante di base [122-129]. In particolare lo studio LAPLACE-2, pubblicato nel 2014, in un trial di 12 settimane condotto in pazienti affetti da FH o dislipidemia mista, ha dimostrato come la terapia con evolocumab, in aggiunta a trattamento con statine a moderata o elevata intensità, determini una riduzione ulteriore significativa di colesterolo delle LDL [122]. Nello Studio ODYSSEY pubblicato nel 2015, analizzando pazienti affetti da FH eterozigote senza un adeguato controllo del colesterolo delle LDL in terapia ipolipemizzante tradizionale massimale, un trattamento per 78 settimane con alirocumab



determinava una significativa ulteriore riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL favorendo il raggiungimento dell'obiettivo di colesterolo delle LDL, risultando anche ben tollerata [133]. Nel nostro studio, si conferma tale dato, con una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL ulteriore pari a circa il 72% (riduzione superiore all'atteso, che si può giustificare con la dispersione delle misure dovuta alla scarsa numerosità del sottocampione) rispetto alla terapia ipolipemizzante massimale tollerata. Confrontandoli con la situazione basale in assenza di terapia ipolipemizzante, i nostri soggetti hanno presentato una riduzione dei livelli stessi pari a circa l'87%.

Alla nostra conoscenza, in letteratura al momento non sono disponibili dati riguardo al confronto tra l'efficacia di evolocumab e alirocumab in termini di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL. Nel nostro studio abbiamo stratificato la popolazione in base al trattamento con evolocumab o alirocumab, ottenendo due gruppi sostanzialmente omogenei, dal momento che non sono state evidenziate differenze statisticamente significative in termini di età, sesso, indice di massa corporea e rischio cardiovascolare. Con queste premesse, dalle analisi dei nostri dati, non abbiamo ottenuto differenze statisticamente significative di efficacia tra il trattamento con evolocumab e quello con alirocumab in termini di percentuale di riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL, sia confrontando i livelli di colesterolo delle LDL in seguito all'introduzione della terapia con inibitori di PCSK9 rispetto agli stessi livelli in corso di terapia ipolipemizzante tradizionale massimale, sia confrontandoli con i livelli basali in assenza di terapia ipolipemizzante.

Il recente studio FOURIER pubblicato nel 2017 evidenziava inoltre come l'inibizione di PCSK9 con evolocumab, sempre in aggiunta a terapia ipolipemizzante massimale tollerata, oltre a ridurre i livelli di colesterolo delle LDL sotto una mediana di 30 mg/dl, portasse a una riduzione degli eventi cardiovascolari [130]. Risultati analoghi sono stati ottenuti nello studio ODYSSEY OUTCOMES recentemente presentati all'American College of Cardiology in Marzo 2018. [133]. Il nostro studio non consente, per la bassa numerosità del campione, di dare una valutazione adeguata in merito alla riduzione del rischio cardiovascolare, ma possiamo sottolineare come i nostri pazienti, tutti ad elevato rischio cardiovascolare e 12 dei quali in prevenzione

secondaria, non raggiungessero l'obiettivo terapeutico di colesterolo delle LDL in terapia ipolipemizzante massimale tollerata. Con l'introduzione del trattamento con inibitori di PCSK9, la totalità dei nostri soggetti ha ottenuto il raggiungimento del proprio obiettivo terapeutico di colesterolo delle LDL, ossia < 100 mg/dl in prevenzione primaria e 70 mg/dl in prevenzione secondaria. L'efficacia del trattamento con inibitori di PCSK9 ha inoltre consentito a due dei nostri pazienti di sospendere il trattamento con LDL-afèresi nel corso dello studio.

I più recenti studi di outcome, oltre a dimostrare l'efficacia della terapia, hanno provato la buona tollerabilità dei farmaci in termini di eventi avversi e collaterali. In particolare, nello studio FOURIER, l'unico effetto avverso che si è notato essere più comune in associazione a evolocumab era collegato a reazioni sul sito di iniezione, ma si trattava comunque di eventi rari, e la frequenza di sospensione della terapia nel regime di studio non è stata maggiore con evolocumab rispetto al placebo. Inoltre, i dati provenienti da questo studio hanno dimostrato che pazienti con malattia cardiovascolare aterosclerotica beneficiano di una riduzione dei livelli di colesterolo delle LDL anche al di sotto dei correnti obiettivi terapeutici, dal momento che alcuni pazienti raggiungevano livelli di colesterolo delle LDL anche inferiori ai più comuni trials clinici [130]. Da un recente studio ancillare rispetto al precedente è emerso inoltre come la terapia con evolocumab non determini un incremento del rischio di sviluppare nuovi casi di diabete, così come non peggiora i livelli di glicemia [131]. In parallelo, nello studio ODYSSEY OUTCOMES il trattamento con alirocumab si è dimostrato come sicuro e ben tollerato per tutta la durata dello studio [133]. I principali effetti avversi esplorati nelle precedenti analisi rispecchiano, oltre agli effetti avverse legati a reazioni locali al sito di iniezione e a quelli nel complesso riferiti dai pazienti, quelli descritti per la terapia con statine. Di recente, però, in letteratura è stato dimostrato come una terapia a lungo termine con statine sia notevolmente sicura con un basso rischio di eventi avversi clinicamente rilevanti, in particolare concentrandosi sull'effetto sull'omeostasi della glicemia, sulla funzione cognitiva, sulla funzione renale ed epatica, sullo stroke emorragico e sulla cataratta [148]. Nello specifico di recente è stato pubblicato un lavoro in cui in terapia con evolocumab non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in merito alla funzione cognitiva rispetto al placebo [149]. In accordo con la

letteratura, nel nostro studio non abbiamo evidenziato eventi avversi significativi, per cui nessun paziente ha sospeso il trattamento con inibitori di PCSK9. Non abbiamo inoltre rilevato un aumento clinicamente rilevante dei livelli di CPK e transaminasi e i pazienti non hanno riferito sintomatologia muscolare. Due pazienti femmine, delle quali una in terapia con evolocumab e una con alirocumab, hanno riferito la comparsa di lieve rinorrea mattutina autolimitantisi, che potrebbe essere riferibile a rinite allergica, ma non ha determinato una sospensione della terapia.

Data la recente introduzione degli inibitori di PCSK9, alla nostra conoscenza non ci sono al momento studi in letteratura che documentino l'andamento a lungo termine (oltre 3 anni) dell'efficacia e della sicurezza nella pratica clinica quotidiana di tali farmaci. Per la maggior parte dei pazienti inclusi della nostra analisi (14 soggetti), abbiamo la possibilità di osservare i valori del profilo lipidico a distanza di anni dall'introduzione della terapia con PCSK9; tra questi, per 5 pazienti trattati con evolocumab abbiamo dati relativi al profilo lipidico a partire dal 2013, per gli altri a partire dal 2015 o dal 2016 fino al 2018. Dalla nostra analisi emerge come i livelli di colesterolo delle LDL si mantengano abbastanza stabili nel corso degli anni, a confermare la persistenza dell'efficacia degli inibitori di PCSK9 nel tempo. Nel nostro studio inoltre non abbiamo evidenziato differenze significative tra il trattamento con evolocumab e il trattamento con alirocumab nel corso degli anni.

## CONCLUSIONI

A fronte dell'enorme mole di conoscenze ed evidenze scientifiche che negli ultimi quarant'anni hanno permesso di comprendere i meccanismi di malattia, le cause genetiche e le possibilità di trattamento, la FH rimane sotto-diagnosticata e sotto-trattata comportando tra l'altro nella pratica un evidente aumento della spesa sanitaria per l'assistenza di pazienti nei quali l'evento clinico si sarebbe potuto prevenire.

In Italia, infatti, come anche in altre realtà europee, l'Ipercolesterolemia Familiare è sotto-diagnosticata con solo l'1% degli affetti con diagnosi genetica certa, e sotto-trattata con la maggior parte dei soggetti FH che non raggiunge il target per LDL-C.

Va sottolineato come solo la precoce identificazione di tali pazienti e il precoce raggiungimento del target terapeutico siano gli unici strumenti in grado di ridurre il rischio cardiovascolare in questi pazienti; gli FH infatti hanno il "LifetermRisk" più alto se confrontati con le altre categorie di pazienti a rischio, proprio perché l'esposizione ad elevati livelli di LDL-colesterolo inizia alla nascita.

In questo contesto si inserisce la necessità di creare un network fondato su una stretta interazione tra centri clinici e territorio, al fine di identificare pazienti con dislipidemie genetiche, facilitarne la diagnosi genético-molecolare di dislipidemia, contribuire ad aumentare la consapevolezza e la cultura nell'ambito delle dislipidemie genetiche, creare un database nazionale e favorire la ricerca consorziata nel campo delle dislipidemie genetiche.

La diagnosi clinica di FH può avvalersi di un utile strumento, l'algoritmo diagnostico che, con un opportuno sistema di punteggi permette di formulare una diagnosi certa attraverso una semplice anamnesi clinica e biochimica del paziente e dei familiari di primo grado, pur non raggiungendo l'accuratezza diagnostica di un'indagine genetica.

La caratterizzazione genotipica funzionale si conferma essere associata a fenotipi clinici diversi, anche in termini di spessori tendinei e prevalenza di xantomi ecografici, confermando come il paziente con allele nullo presenti una maggiore

aggressività clinica della patologia.

I risultati preliminari di questo studio suggeriscono inoltre come l'ecografia dei tendini di Achille possa essere uno strumento da considerare nell'aiutare a riclassificare quei pazienti per i quali il DLCN score è compatibile con diagnosi possibile o probabile di FH. E' infatti questo un gruppo di pazienti che si colloca spesso in una zona grigia per quanto riguarda la diagnosi di FH e la necessità di trattamento ipocolesterolemizzante più o meno aggressivo. Tale strumento potrebbe inoltre rivelarsi un valido alleato per il clinico, aiutandolo nel raggiungimento di una diagnosi sempre più precoce, ed una garanzia per il paziente di ricevere quanto prima il trattamento farmacologico più adeguato alla sua fascia di rischio.

L'utilizzo degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9, evolocumab ed alirocumab, rappresenta un approccio terapeutico innovativo, caratterizzato da elevato profilo di sicurezza ed altamente efficace in associazione alla terapia massimale attualmente disponibile nei pazienti eterozigoti per FH. Tali risultati non sono mai stati raggiunti da alcuna terapia ipolipemizzante sino ad oggi disponibile.

## BIBLIOGRAFIA

1. Goldstein JK, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill. 2001; 2863-2913.
2. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol*. 2004; 160: 407-420.
3. Versmissen J, Oosterveer DM, Yazdanpanah M, Defesche JC, Basart DC, Liem AH, Heeringa J, Wittteman JC, Lansberg PJ, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study. *BMJ*. 2008; 337: a2423.
4. Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Familial hypercholesterolemia in the danish general population: prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97: 3956-3964.
5. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2003; 168: 1-14.
6. World Health Organization. *World Health Statistics 2012*. Internet. [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2012/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/) (9 October 2012).
7. Zuliani G, Arca M, Signore A, Bader G, Fazio S, Chianelli M, Bellosta S, Campagna F, Montali A, Maioli M, Pacifico A, Ricci G, Fellin R. Characterization of a new form of inherited hypercholesterolemia: familial recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19 (3): 802-809.
8. Ciccarese M, Pacifico A, Tonolo G, Pintus P, Nikoshkov A, Zuliani G, Fellin R, Luthman H, Maioli M. A new locus for autosomal recessive hypercholesterolemia maps to human chromosome 15q25-q26. *Am J Hum Genet*. 2000; 66 (2): 453-460.
9. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*. 2001; 292 (5520): 1394-1398.
10. Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1795-1803.
11. Usifo E, Leigh SE, Whittall RA, Lench N, Taylor A, Yeats C, Orengo CA, Martin AC, Celli J, Humphries SE. Low-density lipoprotein receptor gene familial

- hypercholesterolemia variant database: update and pathological assessment. *Ann Hum Genet.* 2012; 76: 387-401.
12. Kolansky DM, Cuchel M, Clark BJ, Paridon S, McCrindle BW, et al. Longitudinal evaluation and assessment of cardiovascular disease in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2008; 102: 1438-1443.
  13. Moorjani S, Roy M, Torres A, Bétard C, Gagné C, et al. Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet.* 1993; 341: 1303-1306.
  14. Bertolini S, Pisciotta L, Rabacchi C, Cefalù AB, Noto D, et al. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis.* 2013; 227: 342-348.
  15. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007; 4: 214-225.
  16. Tybjaerg-Hansen A, Jensen HK, Benn M, Steffensen R, et al. Phenotype of heterozygotes for low-density lipoprotein receptor mutations identified in different background populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 211- 215.
  17. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet.* 2013; 381: 1293-1301.
  18. Schneider WJ, Brown MS and Goldstein JL. Kinetic defects in the processing of the LDL receptor in fibroblasts from WHHL rabbits and a family with familial hypercholesterolemia. *Mol Biol Med* 1983; 1: 353-67.
  19. Tolleshaug H, Hobgood KK, Brown MS and Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: Multiple mutations disrupting the transport and processing of a membrane receptor. *Cell* 1983; 32: 941-51.
  20. Esser V, Limbird LE, Brown MS Goldstein JL and Russel DW. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1988; 263: 13282-90.
  21. Hobbs HH, Brown MS and Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1: 445-66.
  22. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic*

- Acids Res 1997; 25: 172-80.
23. Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity TL. The molecular mechanism for the genetic disorder Familial Defective Apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 2001; 276: 9214-8.
  24. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf K, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003; 34: 154-6.
  25. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS and Russel DW. A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 1985; 228: 815-22.
  26. Brown MS and Goldstein JL. A receptor mediated pathway that controls the cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.
  27. Stanley KK, KOcher HP, Luzio JP, Jakson P and Tschopp J. The sequence and topology of human complement component C9. *EMBO J* 1985; 4: 375-82.
  28. Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RGW, Russel DW and Brown MS. Acid- dependent ligand association and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987; 326: 760-5.
  29. Sudhof TC, Russel DW, Goldstein JL, Brown MS Sanchez-Pescado RR and Bell GI. Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EFG precursor. *Science* 1985; 228: 893-5.
  30. Dolittle RF. The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends Biochem Sci* 1985; 10: 223-37.
  31. Amsellem S, Briffaut D, Carrie A, Rabes JP, Girardet JP, Fredenrich A, Moulin P, Krempf M, Reznik B, Vialettes B, De Gennes JL, Bruckert E, Benlian P. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 2002; 111: 501-10.
  32. Horsthemke B, Beisiegel U, Dunning A, Havinga JR, Williamson R, Humphries S. Unequal crossing-over between two alu-repetitive DNA sequences in the low density-lipoprotein-receptor gene. A possible mechanism for the defect in a patient with familial hypercholesterolemia. *Eur J Biochem* 1987; 164: 77-81.
  33. Lehrman MA, Goldstein JL, Russel DW and Brown MS. Duplications of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell* 1987; 48: 827-35.
  34. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione



- A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: E41-52.
35. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(7):1162-1167. doi:10.1161/01.ATV.0000021150.63480.
  36. Civeira F. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2004; 173: 55-68.
  37. Jarauta E, Junyent M, Gilabert R, Plana N, Mateo-Gallego R, de GE, Cenarro A, Nunez I, Coll B, Masana L, Ros E, Civeira F. Sonographic evaluation of Achilles tendons and carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2009; 204: 345-347.
  38. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J*. 2011; 32: 1345-1361.
  39. Civeira F, Ros E, Jarauta E, Plana N, Zambon D, Puzo J, Martinez de Esteban JP, Ferrando J, Zabala S, Almagro F, Gimeno JA, Masana L, Pocovi M. Comparison of genetic versus clinical diagnosis in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2008; 102: 1187-1193.
  40. Palacios L, Grandoso L, Cuevas N, OlanoMartin E, Martinez A, Tejedor D, Stef M. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis*. 2012; 221: 137-142.
  41. Perk J, De BG, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren WM, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syvanne M, Scholte Op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Atherosclerosis*. 2012; 223: 1-68.
  42. Watts GF, Sullivan DR, Poplawski N, van BF, Hamilton-Craig I, Clifton PM, O'Brien R, Bishop W, George P, Barter PJ, Bates T, Burnett JR, Coakley J, Davidson P,

- Emery J, Martin A, Farid W, Freeman L, Geelhoed E, Juniper A, Kidd A, Kostner K, Krass I, Livingston M, Maxwell S, O'Leary P, Owaimrin A, Redgrave TG, Reid N, Southwell L, Suthers G, Tonkin A, Towler S, Trent R. Familial hypercholesterolaemia: a model of care for Australasia. *Atheroscler Suppl.* 2011; 12: 221-263.
43. Huijgen R, Hutten BA, Kindt I, Vissers MN, Kastelein JJ. Discriminative ability of LDLcholesterol to identify patients with familial hypercholesterolemia: a cross-sectional study in 26,406 individuals tested for genetic FH. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012; 5: 354-359.
44. Wiklund O, Angelin B, Olofsson SO, Eriksson M, Fager G, Berglund L, Bondjers G. Apolipoprotein(a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterolaemia. *Lancet.* 1990; 335: 1360-1363.
45. Kraft HG, Lingenhel A, Raal FJ, Hohenegger M, Utermann G. Lipoprotein(a) in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 522-528.
46. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA.* 2009; 301: 2331-2339.
47. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Boren J, Andreotti F, Watts GF, Ginsberg H, Amarenco P, Catapano A, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgozoglul L, Tybjaerg-Hansen A. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J.* 2010; 31: 2844-2853.
48. Jansen AC, van Aalst-Cohen ES, Tanck MW, Trip MD, Lansberg PJ, Liem AH, van Lennep HW, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. The contribution of classical risk factors to cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: data in 2400 patients. *J Intern Med.* 2004; 256: 482-490.
49. Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Ž, Riccardi G, Taskinen MR, Tokgozoglul L, Verschuren WMM, Vlachopoulos C, Wood DA, Zamorano JL, Cooney MT; ESC Scientific Document Group. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J.* 2016 Oct 14;37(39):2999-3058. doi: 10.1093/eurheartj/ehw272. Epub 2016 Aug 27.
50. Andersen LH, Miserez AR, Ahmad Z, Andersen RL. Familial defective apolipoprotein B-100: A review. *J Clin Lipidol.* 2016;10(6):1297-1302. doi:10.1016/j.jacl.2016.09.009

51. Tsouli SG, Kiortsis DN, Argyropoulou MI, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Pathogenesis, detection and treatment of Achilles tendon xanthomas. *Eur J Clin Invest.* 2005;35(4):236-244. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01484.x
52. Vermeer BJ, Mateysen AAE, van Gent CM, van Sabben RM, Emeis JJ. The Lipid Composition and Localization of Free and Esterified Cholesterol in Different Types of Xanthomas. *J Invest Dermatol.* 1982;78(4):305-308. doi:10.1111/1523-1747.ep12507376
53. Wang B, Zhang Q, Lin L, et al. Association of Achilles tendon thickness and LDL-cholesterol levels in patients with hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):1-7. doi:10.1186/s12944-018-0765-x
54. Wang B, Zhang Q, Lin L, et al. Association of Achilles tendon thickness and LDL-cholesterol levels in patients with hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):1-7. doi:10.1186/s12944-018-0765-x
55. Harada-Shiba M, Arai H, Ishigaki Y, et al. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Familial Hypercholesterolemia 2017. *J Atheroscler Thromb.* 2018:1-20. doi:10.5551/jat.CR003
56. De Sá A, Hart DA, Khan K, Scott A. Achilles tendon structure is negatively correlated with body mass index, but not influenced by statin use: A cross-sectional study using ultrasound tissue characterization. *PLoS One.* 2018;13(6):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0199645
57. Aljenedil S, Ruel I, Watters K, Genest J. Severe xanthomatosis in heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2018;12(4):872-877. doi:10.1016/j.jacl.2018.03.087
58. Gidding SS, Champagne MA, de Ferranti SD, et al. The agenda for familial hypercholesterolemia: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2015;132:2167–92.
59. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolemia is under-diagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013;34: 3478–90a.
60. Khera AV, Won HH, Peloso GM, et al. Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:2578–89.
61. Tada H, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Mabuchi H, Yamagishi M. Impact of clinical signs and genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia on the prevalence of coronary artery disease in patients with severe hypercholesterolemia.

- Eur Heart J 2017;38:1573–9.
62. Abul-Husn NS, Manickam K, Jones LK, et al. Genetic identification of familial hypercholesterolemia within a single U.S. health care system. *Science* 2016;354.
  63. Perez de Isla L, Alonso R, Watts GF, et al. Attainment of LDL-cholesterol treatment goals in patients with familial hypercholesterolemia: 5-year SAFEHEART registry follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:1278–85.
  64. Sharifi M, Higginson E, Bos S, et al. Greater preclinical atherosclerosis in treated monogenic familial hypercholesterolemia vs. polygenic hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2017;263:405–11.
  65. Leren TP. Cascade genetic screening for familial hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2004;66: 483–7.
  66. Umans-Eckenhausen MA, Defesche JC, Sijbrands EJ, Scheerder RL, Kastelein JJ. Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Lancet* 2001; 357:165–8.
  67. Umans-Eckenhausen MA, Defesche JC, van Dam MJ, Kastelein JJ. Long-term compliance with lipid-lowering medication after genetic screening for familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* 2003;163:65–8.
  68. Leren TP, Manshaus T, Skovholt U, et al. Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program. *Semin Vasc Med* 2004;4:75–85.
  69. Averna M, Cefalù AB, Casula M, Noto D, Arca M, Bertolini S, Calandra S, Catapano AL, Tarugi P; LIPIGEN Group. Familial hypercholesterolemia: The Italian Atherosclerosis Society Network (LIPIGEN). *Atheroscler Suppl.* 2017 Oct; 29:11-16. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2017.07.001.
  70. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW, Eddleman KM, Jarrett NM, LaBresh K, Nevo L, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, De Mets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Smith SC Jr, Tomaselli GF. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014;129 (25 Suppl 2):S1 –S45.
  71. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Fulcher J, O'Connell R, Voysey M, Emberson J, Blackwell L, Mihaylova B, Simes J, Collins R, Kirby A, Colhoun H, Braunwald E, La Rosa J, Pedersen TR, Tonkin A, Davis B, Sleight P,

- Franzosi MG, Baigent C, Keech A. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. *Lancet* 2015;385:1397–1405.
72. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, Barnes EH, Voysey M, Gray A, Collins R, Baigent C. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet* 2012;380:581–590.
73. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N, Peto R, Barnes EH, Keech A, Simes J, Collins R. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010; 376: 1670-1681.
74. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res*. 2009; (50 Suppl): S172S177.
75. Broekhuizen K, Jelsma GJ, van Poppel NM, Koppes LL, Brug J, van MW. Is the process of delivery of an individually tailored lifestyle intervention associated with improvements in LDL cholesterol and multiple lifestyle behaviours in people with Familial Hypercholesterolemia? *BMC Public Health*. 2012; 12: 348
76. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Smith SC Jr, Blum C, Schwartz JS; 2013 ACC/AHA Cholesterol Guideline Panel. Treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: synopsis of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association cholesterol guideline. *Ann Intern Med*. 2014 Mar 4;160(5):339-43. doi: 10.7326/M14-0126.
77. Boekholdt SM, Hovingh GK, Mora S, Arsenault BJ, Amarencu P, Pedersen TR, LaRosa JC, Waters DD, DeMicco DA, Simes RJ, Keech AC, Colquhoun D, Hitman GA, Betteridge DJ, Clearfield MB, Downs JR, Colhoun HM, Gotto AM Jr, Ridker PM, Grundy SM, Kastelein JJ. Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of statin trials. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:485–494.
78. Chasman DI, Giulianini F, MacFadyen J, Barratt BJ, Nyberg F, Ridker PM. Genetic determinants of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol reduction: the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:257–264.
79. Reiner Z. Resistance and intolerance to statins. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24: 1057–1066.

80. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1999;282:2340–2346.
81. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III-39 –III-43.
82. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. Basic research and clinical perspectives. *Circulation J* 2010;74:818–826.
83. Pedersen TR. Pleiotropic effects of statins: evidence against benefits beyond LDL-cholesterol lowering. *Am J Cardiovasc Drugs* 2010;10(Suppl 1):10–17.
84. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, Vladutiu GD, Raal FJ, Ray KK, Roden M, Stein E, Tokgozoglu L, Nordestgaard BG, Bruckert E, De Backer G, Krauss RM, Laufs U, Santos RD, Hegele RA, Hovingh GK, Leiter LA, Mach F, März W, Newman CB, Wiklund O, Jacobson TA, Catapano AL, Chapman MJ, Ginsberg HN; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy—European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J* 2015;36:1012–1022.
85. Law M, Rudnicka AR. Statin safety: a systematic review. *Am J Cardiol* 2006;97(8A):52C–60C.
86. Finegold JA, Francis DP. What proportion of symptomatic side-effects in patients taking statins are genuinely caused by the drug? A response to letters. *Eur J Prev Cardiol* 2015;22:1328–1330.
87. Naci H, Brugts J, Ades T. Comparative tolerability and harms of individual statins: a study-level network meta-analysis of 246 955 participants from 135 randomized, controlled trials. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2013;6:390–399.
88. Marcum ZA, Vande Griend JP, Linnebur SA. FDA drug safety communications: a narrative review and clinical considerations for older adults. *Am J Geriatr Pharmacother* 2012;10:264–271.
89. Chalasani N, Aljadhey H, Kesterson J, Murray MD, Hall SD. Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004;126:1287-1292.
90. Vuppalanchi R, Teal E, Chalasani N. Patients with elevated baseline liver enzymes do not have higher frequency of hepatotoxicity from lovastatin than those with normal baseline liver enzymes. *Am J Med Sci* 2005;329:62 –65.
91. Dongiovanni P, Petta S, Mannisto V, Mancina RM, Pipitone R, Karja V, Maggioni M, Kakela P, Wiklund O, Mozzi E, Grimaudo S, Kaminska D, Rametta R, Craxi A, Fargion S, Nobili V, Romeo S, Pihlajamaki J, Valenti L. Statin use and non-alcoholic steatohepatitis in at risk individuals. *J Hepatol* 2015;63:705–712.

92. Preiss D, Seshasai SR, Welsh P, Murphy SA, Ho JE, Waters DD, DeMicco DA, Barter P, Cannon CP, Sabatine MS, Braunwald E, Kastelein JJ, de Lemos JA, Blazing MA, Pedersen TR, Tikkanen MJ, Sattar N, Ray KK. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis. *JAMA* 2011;305:2556–2564.
93. Waters DD, Ho JE, Boekholdt SM, DeMicco DA, Kastelein JJ, Messig M, Breazna A, Pedersen TR. Cardiovascular event reduction versus new-onset diabetes during atorvastatin therapy: effect of baseline risk factors for diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:148–152.
94. Vidt DG. Statins and proteinuria. *Curr Atheroscler Rep* 2005;7:351–357.
95. Davidson MH. Rosuvastatin safety: lessons from the FDA review and postapproval surveillance. *Expert Opin Drug Saf* 2004;3:547–557.
96. Reiner Z, Catapano AL, De BG, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011;32: 1769-1818
97. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994; 344: 1383-1389.
98. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebocontrolled trial. *Lancet*. 2002; 360: 7-22.
99. Averna M, Brignoli O, Bucci M, Calandra S, Fellin R, Filippi A, Sessa A, Uguccioni M. Linee guida cliniche per la prevenzione della cardiopatia ischemica nell'Ipercolesterolemia Familiare. *Giornale Italiano dell'Aterosclerosi, Suppl.I*; 2013; 1-31.
100. Thompson GR. Recommendations for the use of LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 2008; 198: 247-255.
101. Yusuf S, Islam S, Chow CK, et al.. Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) Study Investigators. Use of secondary prevention drugs for cardiovascular disease in the community in high-income, middle-income, and low-income countries (the PURE Study): a prospective epidemiological survey. *Lancet* 2011; 378:1231-43.
102. Kotseva K, Wood D, De Backer G. De Bacquer D, Pyorala K, Keil U; EUROASPIRE Study Group. EUROASPIRE III: a survey on the lifestyle, risk factors and use of cardioprotective drug therapies in coronary patients from 22 European countries. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009;16:121-37.

103. Perrone-Filardi P, Poli A, Ambrosio G, Proto C, Chimini C, Chiariello M. Implementation of cardiovascular secondary prevention guidelines in clinical practice: a nationwide survey in Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:149-53.
104. Colivicchi F, Abrignani MG, Santini M. Aderenza terapeutica: il fattore di rischio occulto. *G Ital Cardiol* 2010;11(5 Suppl 3):124S-7.
105. Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 2007;370:1781-90.
106. Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, Bégaud B. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients - the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19:403-14.
107. Filardi PP, Paolillo S, Trimarco B. Lipid control in high-risk patients: focus on PCSK9 inhibitors. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2015 Jan;16(1):44-51. Doi: 10.1714/1776.19250.
108. Maxwell KN, Breslow JL. 2004. Adenoviral-mediated expression of PCSK9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:7100–5
109. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. 2005. Horton decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5374–79
110. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, et al. 2006. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 354:1264–72
111. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, et al. 2006. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Invest.* 116:2995–3005
112. Chan JC, Piper DE, Cao Q, et al. 2009. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:9820–25
113. Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, et al. 2012. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 366:1108–18
114. Benjannet, S., Rhoads, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D.J., Boileau, C., Brissette, L., Chrétien, M., Prat, A., Seidah, N.G., 2004. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.* 279 (47), 48865–48875.



115. McNutt, M.C., Lagace, T.A., Horton, J.D., 2007. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 20 (282), 20799–20803.
116. Lo Surdo, P.L., Bottomley, M.J., Calzetta, A., Settembre, E.C., Cirillo, A., Pandit, S., Ni, Y.G., Hubbard, B., Sitlani, A., Carfi, A., 2011. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* 12 (12), 1300–1305.
117. Lagace, T.A., Curtis, D.E., Garuti, R., McNutt, M.C., Park, S.W., Prather, H.B., Anderson, N.N., Ho, Y.K., Hammer, R.E., Horton, J.D., 2006. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Investig.* 116 (11), 2995–3005, Nov.
118. Lambert, G., Sjouke, B., Choque, B., Kastelein, J.J., Hovingh, G.K., 2012. The PCSK9 decade. *J. Lipid Res.* 53 (12), 2515–2524, Dec.
119. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:3330-7.
120. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:431-8.
121. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006;354:1264-72.
122. Robinson JG, Nedergaard BS, Rogers WJ, Fialkow J, Neutel JM, Ramstad D, Somaratne R, Legg JC, Nelson P, Scott R, Wasserman SM, Weiss R; LAPLACE-2 Investigators. Effect of evolocumab or ezetimibe added to moderate- or high-intensity statin therapy on LDL-C lowering in patients with hypercholesterolemia: the LAPLACE-2 randomized clinical trial. *JAMA.* 2014 May 14;311(18):1870-82. doi: 10.1001/jama.2014.4030.
123. Koren MJ, Scott R, Kim JB, Knusel B, Liu T, Lei L, Bolognese M, Wasserman S. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as monotherapy in patients with hypercholesterolemia (MENDEL): randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *The Lancet.* Volume 380, Issue 9858, 8–14 December 2012, Pages 1995-2006.
124. Stoes E, Colquhoun D, Sullivan D, Civeira F, Rosenson RS, Watts GF, Bruckert E, Cho L, Dent R, Knusel B, Xue A, Scott R, Wasserman SM, Rocco M0; GAUSS-2 Investigators. Anti-PCSK9 antibody effectively lowers cholesterol in patients with statin intolerance: the GAUSS-2 randomized, placebo-controlled phase 3 clinical trial

- of evolocumab. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jun 17;63(23):2541-2548. doi: 10.1016/j.jacc.2014.03.019. Epub 2014 Mar 30.
125. Blom DJ, Hala T, Bolognese M, Lillestol MJ, Toth PD, Burgess L, Ceska R, Roth E, Koren MJ, Ballantyne CM, Monsalvo ML, Tsirtsonis K, Kim JB, Scott R, Wasserman SM, Stein EA; DESCARTES Investigators. A 52-week placebo-controlled trial of evolocumab in hyperlipidemia. *N Engl J Med*. 2014 May 8;370(19):1809-19. doi: 10.1056/NEJMoa1316222. Epub 2014 Mar 29.
126. Raal FJ, Stein EA, Dufour R, Turner T, Civeira F, Burgess L, Langslet G, Scott R, Olsson AG, Sullivan D, Hovingh GK, Cariou B, Gouni-Berthold I, Somaratne R, Bridges I, Scott R, Wasserman SM, Gaudet D; RUTHERFORD-2 Investigators. PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolaemia (RUTHERFORD-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015 Jan 24;385(9965):331-40. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61399-4. Epub 2014 Oct 1.
127. Raal FJ, Honarpour N, Blom DJ, Hovingh GK, Xu F, Scott R, Wasserman SM, Stein EA; TESLA Investigators. Inhibition of PCSK9 with evolocumab in homozygous familial hypercholesterolaemia (TESLA Part B): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015 Jan 24;385(9965):341-50. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61374-X. Epub 2014 Oct 1.
128. Verbeek R1, Stoekenbroek RM2, Hovingh GK3. PCSK9 inhibitors: Novel therapeutic agents for the treatment of hypercholesterolemia. *Eur J Pharmacol*. 2015 Sep 15;763(Pt A):38-47. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.099. Epub 2015 May 16.
129. Kastelein J, Ginsberg H, Langslet G, Hovingh G, Ceska R, Dufour R, Blom D, Civeira F, Krempf M, Lorenzato C, Zhao J, Pordy R, Baccara-Dinet MT, Gipe DA, Geiger MJ, Farnier M. ODYSSEY FH I and FH II: 78 week results with alirocumab treatment in 735 patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. 2015 Nov 14;36(43):2996-3003. doi: 10.1093/eurheartj/ehv370. Epub 2015 Sep 1.
130. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, Kuder JF, Wang H, Liu T, Wasserman SM, Sever PS, Pedersen TR; FOURIER Steering Committee and Investigators. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017 May 4;376(18):1713-1722. doi: 10.1056/NEJMoa1615664. Epub 2017 Mar 17.
131. Sabatine MS, Leiter LA, Wiviott SD, Giugliano RP, Deedwania P, De Ferrari GM, Murphy SA, Kuder JF, Gouni-Berthold I, Lewis BS, Handelsman Y, Pineda AL, Honarpour N, Keech AC, Sever PS, Pedersen TR. Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the

- effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Dec;5(12):941-950. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30313-3. Epub 2017 Sep 15.
132. Bonaca MP, Nault P, Giugliano RP, Keech AC, Pineda AL, Kanevsky E, Kuder J, Murphy SA, Jukema JW, Lewis BS, Tokgozoglu L, Somaratne R, Sever PS, Pedersen TR, Sabatine MS. Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering With Evolocumab and Outcomes in Patients With Peripheral Artery Disease: Insights From the FOURIER Trial (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk). *Circulation.* 2018 Jan 23;137(4):338-350. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032235. Epub 2017 Nov 13.
133. Gregory G. Schwartz, Michael Szarek, Deepak L. Bhatt, Vera Bittner, Rafael Diaz, Jay Edelberg, Shaun G. Goodman, Corinne Hanotin, Robert Harrington, J. Wouter Jukema, Guillaume Lecorps, Angèle Moryusef, Robert Pordy, Matthew Roe, Harvey D. White, Andreas Zeiher, Ph. Gabriel Steg On behalf of the ODYSSEY OUTCOMES Investigators and Committees. The ODYSSEY OUTCOMES Trial: Topline Results Alirocumab in Patients After Acute Coronary Syndrome. American College of Cardiology – 67th Scientific Sessions March 10, 2018
134. U. Landmesser et al. 2017 Update of ESC/EAS Task Force on practical clinical guidance for proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition in patients with atherosclerotic cardiovascular disease or in familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal* (2017) 00, 1-13; doi 10.1093/eurheartj/ehx549.
135. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corra` U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FD, Løchen ML, Løllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, van der Worp HB, van Dis I, Verschuren WM. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other
136. AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO. *Gazzetta* n. 31 del 7 febbraio 2017
137. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Friedrickson: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972; 18(6): 499-502.
138. Simoni F, Merkel C, Previato L. Tesi di specializzazione in Medicina Interna: Utilità della valutazione ecografica dei tendini achillei nell'ipercolesterolemia familiare: Aspetti fisiopatologici, diagnostici e prognostici, 2012.

139. Evaluation of cholesterol lowering treatment of patients with familial hypercholesterolemia: a large cross-sectional study in The Netherlands. *Atherosclerosis* 2010; 209: 189-194.
140. Yuzawa IS, Yamakawa K, Tohno E, et al. An ultrasonographic method for detection of achilles tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1989; 75:211-218.
141. Ebeling T, Farin P, Pyörälä K. Ultrasonography in the detection of achilles tendon xanthomata in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1992; 97:217-228.
142. Junyent M, Gilabert R, Zambon D, et al. The use of achilles tendon sonography to distinguish familial hypercholesterolemia from other genetic dyslipidemias. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25:2203-2208.
143. Descamps OS, Leysen X, Van Leuven F, Heller FR. The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2001 Aug; 157(2):514-8.
144. Jarauta E, Junyent M, Gilabert R, et al. Sonographic evaluation of achilles tendons and carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2009; 204:345-347.
145. Civeira F, Castillo S, Alonso R, et al. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with cardiovascular risk independently of the low-density lipoprotein receptor gene mutation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25:1960-1965.
146. Kiortsis DN, Argyropoulou MI, Xydis V, Tsouli SG, Elisaf MS. Correlation of achilles tendon thickness evaluated by ultrasonography with carotid intima-media thickness in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2006;186:228-229.
147. Paiker JE, Raal FJ, Waisberg R, Buthelezi EP. Quantity versus quality of LDL cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia--which is more important? *Clin Chim Acta*. 2001 Dec;314(1-2):167-73.
148. Mach F, Ray KK, Wiklund O, Corsini A, Catapano AL, Bruckert E, De Backer G, Hegele RA, Hovingh GK, Jacobson TA, Krauss RM, Laufs U, Leiter LA, März W, Nordestgaard BG, Raal FJ, Roden M, Santos RD, Stein EA, Stroes ES, Thompson PD, Tokgözoğlu L, Vladutiu GD, Gencer B, Stock JK, Ginsberg HN, Chapman MJ; European Atherosclerosis Society Consensus Panel Adverse effects of statin therapy: perception vs. the evidence - focus on glucose homeostasis, cognitive, renal and

hepatic function, haemorrhagic stroke and cataract. *Eur Heart J*. 2018 Apr 27. doi: 10.1093/eurheartj/ehy182

149. Giugliano RP, Mach F, Zavitz K, Kurtz C, Im K, Kanevsky E, Schneider J, Wang H, Keech A, Pedersen TR, Sabatine MS, Sever PS, Robinson JG, Honarpour N, Wasserman SM, Ott BR; EBBINGHAUS Investigators. Cognitive Function in a Randomized Trial of Evolocumab. *N Engl J Med*. 2017 Aug 17;377(7):633-643. doi: 10.1056/NEJMoa1701131.