

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

XXVI Ciclo



INFLUENZA DEI VALORI DI COLESTEROLO-LDL SULLA SCLEROSI VALVOLARE AORTICA ED ATEROSCLEROSI CAROTIDEA IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI CON IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE E MUTAZIONI DEL GENE DEL RECETTORE DELLE LDL

Dott.ssa Coppola Maria Gabriella

Tutore: Prof. P. Rubba

Anno Accademico 2012-2013

## INTRODUZIONE

L'Ipercolesterolemia familiare (IF) è una patologia autosomica, codominante, prevalentemente causata da mutazioni del gene del recettore delle LDL (LDLR)<sup>1</sup>. E' caratterizzata da elevati valori di colesterolo LDL (Col-LDL), presenza di xantomi tendinei e precoce insorgenza di malattia coronarica<sup>1,2</sup>. Tali caratteristiche sono più evidenti e l'età di insorgenza più bassa nei pazienti ipercolesterolemici familiari omozigoti che ereditano due alleli mutati del gene LDLR.<sup>3</sup> La prevalenza della ipercolesterolemia familiare omozigote è di 1:1000000, mentre quella della forma eterozigote è stimata di circa 1 :500 persone<sup>4</sup>. Il gene LDLR è localizzato sul cromosoma 19. Negli ultimi anni sono state descritte più di 1000 mutazioni del gene LDL-R. Sono state correlate al fenotipo clinico dell'ipercolesterolemia familiare mutazioni coinvolgenti altri due geni: il gene che codifica per l'apolipoproteina B-100 (APOB) e il gene che codifica per la proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). Il gene che codifica per l'APOB è localizzato sul cromosoma 2p23-24 e codifica per la componente proteica delle particelle di LDL. Solo un piccolo numero di mutazioni funzionali sono state identificate in APOB. Il gene di PCSK9 è stato identificato recentemente sul cromosoma 1p32<sup>5</sup>. L'eterogenità delle mutazioni dell'ipercolesterolemia familiare spiega la variabilità del fenotipo clinico della patologia. Mentre per i pazienti ipercolesterolemici familiari omozigoti è stata trovata una forte correlazione tra l'attività recettoriale residua e la severità clinica della malattia, una simile correlazione genotipo-fenotipo è meno chiara nei pazienti ipercolesterolemici familiari eterozigoti. In questi pazienti l'espressione clinica della malattia è altamente variabile in termini di severità dell'ipercolesterolemia e della malattia cardiovascolare, così come la risposta alla terapia dietetica e ipolipemizzante<sup>6</sup>. Un'espressione clinica più o meno severa della patologia è stata correlata ai livelli plasmatici di colesterolo LDL (Col-LDL), che a loro volta sono legati alla percentuale di attività residua dell'LDLR; tuttavia, altri ricercatori non hanno mostrato una relazione tra la presenza di mutazioni con allele nullo e la mortalità per malattia cardiovascolare (CVD)<sup>7</sup>. Lo scopo di questo studio è di valutare il ruolo dei valori di Col-LDL sul profilo di rischio cardiovascolare in una popolazione di pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare.

## MATERIALI E METODI

### Pazienti

66 pazienti (56,1% donne; età media  $42 \pm 14$  anni), con le caratteristiche cliniche di IF sono stati arruolati presso l'Ambulatorio per la Cura e la diagnosi delle dislipidemie del Dipartimento di

Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. La diagnosi "definitiva" di IF è stata posta quando il paziente soddisfaceva i criteri di Simon Brome Register . La diagnosi è stata considerata come "possibile" se i livelli di colesterolo plasmatici basali erano superiori a 289 mg/dl o il Col-LDL superiore a 190 mg/dl nel probando e almeno in un parente di primo grado, con valori di trigliceridi plasmatici inferiori a 199 mg/dl in tutti i membri della famiglia <sup>8</sup>. Sono stati considerati come livelli basali di Colesterolo totale, Col-HDL, Trigliceridi, Col-LDL, i valori prima dell'inizio della terapia dietetica o farmacologica. Dopo una notte di digiuno (almeno 12 ore) sono stati prelevati campioni di sangue da accesso venoso periferico da tutti i pazienti. Sono stati determinati con dosaggi sierici: colesterolo totale, trigliceridi e lipoproteine ad alta densità (HDL). Il Col-LDL è stato calcolato con la formula di Friedewald. Tutti i pazienti avevano normale funzione epatica, renale, tiroidea, nonché valori di omocisteina e fibrinogeno. Nessun paziente era diabetico.

#### Screening delle mutazioni

Lo screening per la ricerca della mutazione del LDLR è stato effettuato presso il Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, and CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia, mediante il sequenziamento diretto del promotore e dei 18 esoni del gene del LDLR e valutando la presenza di grandi riarrangiamenti con l'analisi MLPA(multiplex ligation-dependent probe amplification). Per ogni paziente sono state isolate, da un campione di sangue, cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs). Sono state generate linee cellulari EBV-trasformate esponendo PBMCs per liberare le particelle EBV prodotte da linee cellulari di marmoset (B95.8) infettate da EBV. E' stata inoltre valutata l'attività funzionale residua del LDLR (LDLRa) misurando la regione codificante il recettore mediante l'assorbimento di LDL marcate fluorescenti. L'intensità di fluorescenza è stata misurata con un citofluorimetro FACS Canto (Becton Dickinson).I risultati sono stati espressi come rapporto tra l'intensità media di fluorescenza delle cellule dei pazienti IF e la media dell'intensità di fluorescenza delle cellule dei controlli <sup>9-10</sup>. Tale rapporto rappresenta l'attività funzionale residua del LDLR ed è stata identificata in 41 pazienti.

#### Ecocolordoppler carotideo

In tutti i pazienti è stato effettuato un EcocolorDoppler dei tronchi sovra aortici per esaminare le arterie carotidi bilateralmente. E' stata valutata la presenza di ispessimento medio-intimale (IMT) e la presenza di placche a livello di 2 segmenti standardizzati: al centimetro distale della arteria carotide comune e alla biforcazione carotidea <sup>11</sup> . Inoltre, è stata valutata la presenza di placche e

calcolato il grado di stenosi a livello dell'arteria carotide interna bilateralmente. Il grado di stenosi carotidea è stato espresso come risultato della misurazione di sette parametri: velocità massima (V.max) all'interno della stenosi (mediante onda pulsata [PW]), grado e indice di turbolenza spettrale (STI) all'uscita dalla stenosi (mediante PW e onda continua [CW]), il rapporto di velocità tra la carotide interna e la carotide comune (IC/CC) mediante PW, e rapporto tra la sezione trasversale del vaso e l'area del lume residuo (% Color) all'interno della stenosi (color Doppler). Il grado di stenosi determinato secondo la scala dei grigi e il doppler US è stato stratificato in categorie: normale (assenza di stenosi), stenosi <50%, stenosi compresa tra 50%-69%, stenosi  $\geq$  70% e occlusione totale (The Society of Radiologists in Ultrasound)<sup>12</sup>. Nel nostro studio abbiamo diviso i pazienti con stenosi carotidea in due gruppi: pazienti con stenosi carotidea  $\leq$  50% e pazienti con stenosi carotidea  $\geq$  50%.

### Ecocardiogramma

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un ecocardiogramma trans toracico standard. L'esame ecocardiografico è stato effettuato con il paziente in posizione di parziale decubito sinistro, in accordo con le procedure standard del nostro laboratorio di ecocardiografia, utilizzando macchine disponibili in commercio con trasduttori di 2-4-MHz, collegate a registratori S-VHS. Quando l'orientamento del fascio di ultrasuoni non ha permesso di acquisire tracciati ottimali M-mode secondo le raccomandazioni della Società Americana di Ecocardiografia (ASE), sono state prese misurazioni primarie della parete interna posteriore e dello spessore del setto interventricolare off-line utilizzando come finestra M-mode o parasternale asse lungo 2D<sup>13</sup>. La dimensione in diastole del ventricolo sinistro è stata normalizzata per l'altezza. La massa del ventricolo sinistro (LVM) è stata calcolata usando una formula necroscopica validata (REF) ed è stata normalizzata in metri alla potenza di 2,7. L'ipertrofia del ventricolo sinistro è stata definita come LVM index  $>$  49.2g/m<sup>2.7</sup> negli uomini e LVM index  $>$  46.7 g/m<sup>2.7</sup> nelle donne<sup>14-15</sup>. Il volume atriale è stato stimato dalla misurazione dei tre diametri ortogonali, in accordo con le raccomandazioni dell'ASE. La radice aortica è stata valutata sia in asse lungo che in asse corto alla fine della diastole<sup>13-16</sup>. Per una descrizione ottimale della radice aortica e dell'anatomia della valvola, abbiamo effettuato una classificazione semi-quantitativa della gravità della calcificazione della valvola, come normale, lieve (presenza di poche aree localizzate o nodulari di ecogenicità densa con poca ombra acustica), moderata (ispessimento diffuso coinvolgente più cuspidi), o grave (marcato ispessimento, ecogenicità aumentata con un'ombra acustica prominente e mobilità ridotta della valvola). Nel nostro studio abbiamo preso in considerazione due gruppi: pazienti con valvola aortica normale o sclerosi aortica lieve e pazienti con sclerosi aortica moderata o grave. La gravità della stenosi

aortica (AS) è stata valutata misurando la velocità del getto della stenosi aortica mediante il gradiente medio transaortico ( con CW-Doppler), e l'area valvolare (mediante equazione di continuità) <sup>16</sup>. In questi pazienti abbiamo descritto anche la presenza di ispessimento dei lembi valvolari mitralici e di calcificazioni dell'annulus mitralico (MAC). Abbiamo considerato due gruppi: pazienti con valvola mitrale normale o lieve coinvolgimento solo dei lembi valvolari mitralici e pazienti con ispessimento dei lembi valvolari mitralici marcato e presenza di calcificazione dell'annulus mitralico. Il pattern di riempimento del ventricolo sinistro è stato calcolato misurando la velocità della E e della A trans mitralica, il tempo di decelerazione della velocità della E e calcolando il rapporto E/A trans mitralico. Il Tissue-Doppler imaging (TDI) è stato ottenuto misurando nella finestra apicale la velocità E' e A' a livello dell'annulus <sup>17</sup>. La pressione sanguigna è stata misurata a riposo, con il paziente in posizione supina, subito dopo l'esame ecocardiografico. Per definire la pressione sistolica e diastolica sono stati utilizzati i suoni di Korotkoff di fase 1 e fase 5, rispettivamente. La pressione sanguigna è stata misurata con un normale bracciale da braccio per adulto, utilizzando un normale sfigmomanometro aneroide.

#### ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati utilizzando il software SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL) ed espressi come media  $\pm$  una deviazione standard. Il confronto tra gruppi è stato effettuato utilizzando il t-test per le variabili continue e chi-quadro per quelle categoriche. Per valutare se le differenze tra i gruppi erano indipendenti dai principali fattori confondenti, abbiamo utilizzato l'analisi ANCOVA e la regressione logistica rispettivamente. In particolare, il confronto dei parametri antropometrici ed ecocardiografici tra i gruppi è stato effettuato utilizzando il test t, mentre il confronto dei parametri ecocardiografici è stato corretto per la presenza di fattori confondenti quali l'età avanzata ed eventi cardiovascolari mediante analisi ANCOVA. E' stato utilizzato un modello di regressione logistica uni variata e multivariata utilizzando variabili basali: spessore intima media, placca carotidea, il grado di stenosi carotidea, l'ispessimento di lembi mitralici e calcificazione mitralica anulare, sclerosi aortica e stenosi aortica come predittori di interesse corretti per la prevalenza di età avanzata, il sesso, la storia di ipertensione e di eventi cardiovascolari. La significatività statistica è stata definita per valori di  $p < 0,050$ .

#### RISULTATI

Le caratteristiche cliniche e dei parametri lipidici della popolazione esaminata son riportati nella Tabella 1. Nessuna differenza significativa è stata trovata tra donne e uomini per i tradizionali fattori di rischio cardiovascolare, ma la prevalenza di eventi cardiovascolari è risultata essere più alta nel

gruppo degli uomini rispetto al gruppo delle donne ( $p = 0,05$ ) (Tabella 2). Nessun paziente è risultato essere diabetico ed i valori di funzionalità renale (creatininemia e azotemia) sono risultati nella norma in tutti i pazienti, così come l'omocisteinemia e il fibrinogeno.

#### Screening delle mutazioni del gene dell'LDLR

Tutti i 66 pazienti della nostra popolazione, affetti da Ipercolesterolemia familiare, presentavano mutazioni nel gene LDLR. Sono state identificate 22 differenti mutazioni della regione che codifica LDLr in eterozigosi e 6 differenti mutazioni in doppia eterozigosi. Il sequenziamento diretto del promotore del gene dell'LDLR ha rivelato una mutazione in omozigosi di un paziente. L'attività funzionale residua del recettore delle LDL è stata valutata in un sottogruppo di 41 pazienti come riportato in Tabella 3-4. Abbiamo osservato che l'attività funzionale residua del recettore delle LDL-Colesterolo (LDLRa) è risultata inversamente correlata ai valori di Col-LDL pretrattamento ( $r = 0,455$ ) (Figura 1). LDLRa è stata quindi esaminata in relazione ai livelli basali (pretrattamento) di trigliceridi, Col-HDL e Col-LDL utilizzando l'analisi della regressione lineare. L'unico predittore di bassa LDLRa è stato confermato essere Col-LDL elevato, mentre nessuna associazione statisticamente significativa è risultata essere con i livelli di trigliceridi e Col-HDL (Tabella 5). La mediana di Col-LDL (303 mg/dL) è stata utilizzata come un surrogato di LDLRa per analizzare il profilo cardiovascolare dell'intera popolazione dei 66 pazienti esaminati nel nostro studio (Tabella 5). Sulla base dell'attività funzionale residua del recettore delle LDL-Colesterolo (LDLRa) abbiamo suddiviso questo sottogruppo di pazienti in 2 sottogruppi: recettore-difettivo (con  $LDLRa > 55\%$ ) e recettore-negativo ( $LDLRa < 55\%$ ), e abbiamo messo in evidenza una correlazione inversa dei livelli di Col-LDL pretrattamento tra il gruppo di pazienti con mutazione recettore-negativo ( $356,72 \pm 101$ ) e quello recettore-difettivo ( $292,77 \pm 71$ ) ( $p = 0,25$ ) confermando un ruolo importante della genetica nel determinare il fenotipo clinico della malattia.

#### Ecocolordoppler carotideo

La valutazione con ecocolordoppler carotideo ha evidenziato che l'età media dei pazienti con Col-LDL più alto del valore della mediana è risultata essere  $46,35 \pm 14,75$  anni, mentre quella del gruppo con Col-LDL più basso della mediana  $38,41 \pm 13,75$  anni ( $p = 0,027$ ). La prevalenza di storia di eventi cardiovascolari è del 35,3% dei pazienti del gruppo con Col-LDL più alto della mediana, e del 12,5% nei pazienti con Col-LDL più basso del valore della mediana ( $P = 0,029$ ). L'analisi condotta nei due gruppi ha evidenziato un'augmentata prevalenza di aumentato spessore medio-intimale e presenza di placche carotidee nei pazienti con Col-LDL maggiore del valore della mediana rispetto a quelli con Col-LDL minore ( $p = 0,001$ ). Dopo aver corretto per età, sesso, storia

di ipertensione arteriosa ed eventi cardiovascolari, tali differenze sono rimaste statisticamente significative (rispettivamente  $p=0,011$  e  $p=0,002$ ) (Figura 2,3). I pazienti del gruppo con Col-LDL maggiore del valore della mediana presentavano un'augmentata prevalenza di stenosi carotidee di grado maggiore (stenosi carotidee  $>50\%$ ), indipendentemente dall'età, dal sesso, dalla storia di ipertensione arteriosa ed eventi cardiovascolari ( $p=0,042$ ; OR=4,81; 95% C.I. 1,10-21,01) (Figura 4, Tabella 6).

#### Ecocardiogramma

La nostra analisi ha evidenziato l'associazione fra prevalenza di sclerosi della valvola aortica moderata o severa nel gruppo di pazienti con Col-LDL maggiore della mediana, indipendentemente dall'età, sesso e storia di ipertensione arteriosa ( $p=0,048$ ; OR=5,73; 95% I.C. 1,01-32,35) (Figura 5). La stessa analisi risulta ai limiti della significatività statistica quando corretta per eventi cardiovascolari ( $p=0,06$ ). Nel nostro studio abbiamo diagnosticato stenosi lieve della valvola aortica in 1 paziente eterozigote, stenosi moderata con basso gradiente aortico in 2 pazienti doppi-eterozigoti e stenosi aortica severa in un paziente omozigote. Abbiamo osservato una differenza statisticamente significativa per la presenza di stenosi aortica nei pazienti appartenenti al gruppo con Col-LDL maggiore della mediana rispetto a quelli del gruppo inferiore della mediana, indipendentemente dall'età, genere e storia di ipertensione arteriosa ( $p=0,036$ ). La stessa analisi statistica è stata effettuata prendendo in considerazione la gravità dell'ispessimento dei lembi della valvola mitralica e la presenza di calcio a livello dell'annulus. In particolare nei pazienti con Col-LDL maggiore della mediana la prevalenza di ispessimento dei lembi valvolari mitralici e di calcificazioni dell'annulus era del 35,3% mentre nei pazienti con Col-LDL inferiore alla mediana era del 9,4% ( $p=0,012$ ). Dopo aver corretto per età, sesso e storia di ipertensione arteriosa, tale associazione statistica non è stata confermata. Le dimensioni della radice aortica, le dimensioni dell'atrio sinistro, il diametro diastolico del ventricolo sinistro (LV), la massa dell' LV, sono risultate significativamente maggiori nei pazienti con Col-LDL più alto rispetto ai pazienti con Col-LDL più basso ( $p<0,05$ ). Dopo correzione per età, sesso, storia di ipertensione e di eventi cardiovascolari l'associazione statistica tra i più elevati livelli di Col-LDL e questi parametri ecocardiografici non è stata confermata nonostante i due gruppi fossero simili per i livelli di pressione arteriosa ed i valori di Indice di massa corporea.

## DISCUSSIONE

Il presente studio ha valutato la correlazione tra i livelli di colesterolo LDL ed alcune mutazioni del gene dell'LDLR, nonché gli effetti dei livelli plasmatici di Col-LDL sui parametri ecocardiografici e sull'aterosclerosi carotidea in una popolazione di pazienti affetta da ipercolesterolemia familiare. I risultati indicano che i livelli di Col-LDL, così come il genere, fumo, ipertensione, diabete, obesità ed i livelli di colesterolo HDL, sono importanti predittori di aterosclerosi e di malattia cardiovascolare. Inoltre, i livelli plasmatici di Col-LDL sono influenzati dal tipo di mutazione del LDLR. La nostra analisi mostra un debole associazione tra i livelli plasmatici di Col-LDL e l'attività funzionale residua del recettore delle LDL (LDLRa). L'attività dell'LDLR è correlata negativamente al Col-LDL, mentre non è stata trovata nessuna significatività statistica con i livelli di trigliceridi e col-HDL. Studi precedenti in pazienti con IF omozigoti hanno mostrato che livelli più bassi di attività funzionale residua dell'LDLR sono correlati a valori plasmatici più alti di Col-LDL e a una più rapida progressione dell'aterosclerosi. Questi studi hanno mostrato che differenti tipi di mutazioni presentano LDLRa che varia dal 2% al 30% e che esiste una forte correlazione tra l'attività funzionale residua del recettore in cellule in coltura e la severità della patologia. Una correlazione genotipo-fenotipo simile è meno chiara in pazienti IF eterozigoti (con mutazioni documentate nel gene dell'LDL-R), perché c'è solo una debole correlazione tra l'LDLRa in cellule in coltura e la concentrazione plasmatica di Col-LDL<sup>6,20</sup>. Nel nostro studio con 66 pazienti IF sono state identificate 22 mutazioni (20 in eterozigosi, 6 in doppia eterozigosi e 1 in omozigosi), un indicatore di eterogeneità della nostra popolazione. Nell'ambito della nostra popolazione abbiamo valutato l'attività funzionale residua del gene del recettore delle LDL (LDLRa) per un sottogruppo di 41 pazienti e lo abbiamo suddiviso, sulla base di dati in letteratura, in due sottogruppi: recettore negativo (LDLRa<55%) e recettore-difettivo (LDLRa>55%) mettendo in evidenza una correlazione inversa tra livelli di Col-LDL e attività funzionale residua del recettore ed evidenziando così un sottogruppo di pazienti a più alto rischio cardiovascolare<sup>6, 18,19</sup>. Tuttavia soggetti che presentano la stessa mutazione presentano ampie variazioni dei livelli plasmatici di Col-LDL è necessario, perciò effettuare nuovi studi con una numerosità di pazienti maggiore al fine di valutare sia gli effetti dell'LDLRa sui livelli plasmatici di Col-LDL di pazienti ipercolesterolemici familiari eterozigoti sia il ruolo di altri fattori di rischio genetici o ambientali che contribuiscono a determinare il fenotipo dell'ipercolesterolemia familiare. Gli effetti di mutazioni specifiche possono essere più facilmente comparate con popolazioni fondatrici nelle quali un piccolo numero di alleli è responsabile del fenotipo clinico IF (popolazioni africane, franco-canadesi)<sup>20-23</sup>. Tuttavia, a causa della loro origine comune, gli eterozigoti IF in queste popolazioni possono condividere altri fattori genetici o ambientali, e potenziali fattori di confondimento che possono aumentare falsamente la stima

dell'associazione osservata. Ulteriori studi sperimentali dovranno essere effettuati con un maggior numero di pazienti, per valutare gli effetti di mutazioni dell'LDLR nei pazienti IF eterozigoti <sup>24</sup>. L'aterosclerosi è ora riconosciuta come una reazione infiammatoria / immunomodulatoria mediata dalle lipoproteine a bassa densità ossidate presenti all'interno della parete delle arterie, che spesso compare in un quadro di fattori di rischio come la storia familiare, l'ipercolesterolemia, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito e il fumo. La progressione di lesioni ad alto rischio, come ad esempio gli ateromi thin-fibrous cap determina un aumentato del rischio di morte improvvisa, di infarto acuto del miocardio e di ictus ischemico. Nei fenotipi ad alto rischio, l'interazione dei macrofagi, linfociti T e mastociti svolgono un ruolo centrale sia nello sviluppo, ma soprattutto nella progressione della malattia coronarica e carotidea <sup>25-26</sup>. Il nostro studio mostra come nei pazienti IF con alto Col-LDL vi sia una più alta prevalenza di progressione di aterosclerosi a livello dell'arteria carotide. Due grandi studi che hanno utilizzato l'ecografia con ultrasuoni (B-mode) per le misurazioni dell'IMT al fine di indagare le determinanti della malattia aterosclerotica in una popolazione generale sono il Rotterdam Study e l'Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study <sup>27-28</sup>. Questi studi forniscono una solida evidenza che le misurazioni dell'IMT possono essere utilizzate come indicatore di aterosclerosi generalizzata. In studi precedenti è stato riportato uno spessore maggiore del complesso intima-media nella carotide comune in pazienti con IF rispetto ad un gruppo di controllo pari per sesso ed età <sup>29</sup>. Nella nostra popolazione i pazienti IF con Col-LDL maggiore del valore mediano, hanno mostrato una più alta prevalenza di IMT aumentato, di placche carotidiche e di grado di stenosi carotidea, rispetto ai pazienti IF con Col-LDL inferiore al valore mediano, indipendentemente dall'età, sesso, ipertensione ed eventi cardiovascolari. Questi dati sottolineano l'importanza dei livelli di Col-LDL come fattore di rischio per la progressione dell'aterosclerosi carotidea e hanno identificato, in pazienti IF, un sottogruppo a più alto rischio. Nel nostro campione di pazienti IF abbiamo analizzato anche gli effetti dei livelli di Col-LDL sulla valvola aortica e mitralica. Il coinvolgimento ateromatoso della valvola aortica e della radice è quasi sempre presente nei pazienti omozigoti. La stenosi della valvola aortica è una complicanza non comune negli eterozigoti, e spesso è associata a fattori di rischio aggiuntivi, come la pressione alta, il fumo, e / o diabete mellito che contribuiscono tutti ad aggravare disfunzioni valvolari aortiche. Beppu et al. hanno messo in evidenza, dopo valutazione con esame ecocardiografico, che tutti i pazienti IF omozigoti riportavano gravi lesioni della radice aortica in Giappone <sup>30</sup>. Nella nostra popolazione, abbiamo diagnosticato quattro stenosi della valvola aortica, due in eterozigoti, uno in doppio-eterozigote e uno in un omozigote. I quattro pazienti appartengono al gruppo con Col-LDL maggiore del valore mediano. Nella popolazione generale superiore ai 65 anni di età, la prevalenza di sclerosi della valvola aortica, calcificazione, o

ispessimento risulta essere del 21-31%. In soggetti con calcificazione della valvola aortica, anche in assenza di malattia rilevante della valvola stessa, vi è un aumentato rischio di morte per cause cardiovascolari<sup>31</sup>. Nella nostra popolazione di IF sia la stenosi aortica di grado moderato sia la sclerosi aortica grave è legato a livelli di Col-LDL maggiori della mediana, indipendentemente da età, sesso ed ipertensione, ma non dagli eventi cardiovascolari. Studi recenti hanno dimostrato un'associazione tra la sclerosi della valvola aortica e lesioni coronariche all'angiografia<sup>32-33</sup>. La sclerosi della valvola aortica include una vasta gamma di alterazioni valvolari che vanno dalla sclerosi delle cuspidi alla grave stenosi aortica calcifica, e rappresenta un processo progressivo e attivo di modifica della valvola, mediato dall' infiammazione cronica e da caratteristiche biologiche. Le valvole aortiche che presentano sclerosi aortica contengono una maggiore quantità di colesterolo LDL ossidato e mostrano aumentata espressione di metalloproteinasi. Studi recenti sostengono l'ipotesi di un "modello infiammatorio" associato alla sclerosi aortica e suggeriscono la persistenza di una infiammazione cronica in pazienti che hanno avuto eventi coronarici<sup>34</sup>. Il nostro studio dimostra, inoltre, che l'ispessimento maggiore dei lembi mitralici e le calcificazioni dell'annulus mitralico (MAC), sono associate ad un maggiore Col-LDL, definendo un gruppo di pazienti con una maggiore prevalenza di malattia aterosclerotica. In aggiunta i pazienti IF con valori di Col-LDL più alti mostravano dimensioni maggiori del diametro diastolico e della massa del ventricolo sinistro, delle dimensioni e del volume dell'atrio sinistro, e di tutte le caratteristiche potenzialmente associate alla maggiore probabilità di sviluppare scompenso cardiaco. Anche se l'associazione tra i livelli di Col-LDL e questi parametri ecocardiografici è risultata essere significativa nell'analisi univariata, non si è confermata la significatività statistica dopo correzione per eventi cardiovascolari ed età nell'analisi multivariata. Questi risultati suggeriscono che i cambiamenti strutturali ecocardiografici sono dovuti alla malattia coronarica e non sono correlati primitivamente ai livelli di Col-LDL. Nella nostra analisi il gruppo con livelli di Col-LDL superiori al valore mediano è stato correlato sia alla prevalenza di infarto del miocardio, sia alla storia di intervento di bypass coronarico e angioplastica coronarica. Probabilmente questi risultati sono influenzati dalla numerosità del campione. Ulteriori studi sperimentali saranno necessari per valutare l'impatto di un maggiore livello di Col-LDL sui parametri ecocardiografici.

## CONCLUSIONI

Questo studio ha identificato un sottogruppo tra i pazienti affetti da Ipercolesterolemia familiare ad alto rischio cardiovascolare, confermando il ruolo dei livelli di Col-LDL come marker di aterosclerosi diffusa e severa. Inoltre abbiamo osservato una forte associazione tra i livelli di Col-LDL e l'aterosclerosi carotidea, indipendentemente dai principali fattori di rischio; un' associazione

tra i livelli di Col-LDL e sia della stenosi aortica di grado moderato sia della sclerosi aortica grave, indipendentemente da età, sesso ed ipertensione, ma non dagli eventi cardiovascolari. Nel nostro studio l'associazione tra i valori di Col-LDL più elevati e le alterazioni ecocardiografiche non è risultato essere indipendente dall'età, dal sesso, dalla storia di ipertensione arteriosa e dalla coesistenza di eventi cardiovascolari. Ulteriori studi con un maggior numero di partecipanti dovrebbero essere condotti per valutare la relazione, il tipo di mutazione del LDLR, l'attività funzionale residua ed i parametri ecocardiografici, nei pazienti affetti da Ipercolesterolemia eterozigote.

Tabella 1

Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio

	Media $\pm$ DS
Età (anni)	42,5 $\pm$ 14,7
Sesso (% femminile)	56,10
Indice di massa corporea (kg/m <sup>2</sup> )	25,10 $\pm$ 3,12
Colesterolo basale (mg/dl)	398,51 $\pm$ 101,86
Trigliceridi (mg/dl)	111,47 $\pm$ 43,44
Colesterolo HDL (mg/dl)	51,69 $\pm$ 13,67
Colesterolo LDL (mg/dl)	323,43 $\pm$ 102,36
Creatinina (mg/dl)	0,87 $\pm$ 0,149

Tabella 2

Fattori di rischio cardiovascolare

	Donne	Uomini	P
Fumo (%)	8,3	24,1	0,079
Ipertensione (%)	18,9	27,6	0,40
Storia familiare di eventi cardiovascolari (%)	54,1	55,2	0,92
Eventi cardiovascolari (%)	13,5	37,9	0,02

Tabella 3

Mutazioni del gene dell'LDLR in eterozigosi nella popolazione dello studio

Eterozigosi	Attività recettoriale residua
G571E	89%
G352D	non nota
G528D	62%
C18X	55%
C304Y	97%
C346T	97%
C358R	74 %
G266C	non nota
del 11-12	40%
Del 13-15	non nota
IVS10+1 G>A	non nota
IVS15-3 C>A	52%
IVS8-10 G>A	non nota
P160R	non nota
R612H	non nota
S102P	non nota
S559F	74%
T383I	non nota

P664L	non nota
C356F	non nota
V502M	non nota

Tabella 4

Mutazioni del gene dell'LDLR in doppia eterozigosi e in omozigosi nella popolazione dello studio

Doppia- eterozigosi	Attività recettoriale residua
S102P + del CT	32%
G571E + P664L	non nota
C358R + IVS10-5G>A	non nota
S559F + G528D	47%
C356F + P826T	non nota

Omozigote	Attività recettoriale residua
Promoter	non nota

Tabella 5

Caratteristiche dei pazienti IF con Col-LDL minore o maggiore del valore mediano (303 mg/dl).

	Col-LDL <303 mg/dl	Col-LDL >303 mg/dl	p
Età	38 ± 13,75	46 ± 14,75	0,027
Eventi cardiovascolari (%)	12,5	35,3	0,031
Indice di massa corporea (kg/m <sup>2</sup> )	24,87 ± 3,46	25,32 ± 2,81	0,566
Sesso (% femminile)	62,5	50	0,307
Fumo (%)	22,6	8,8	0,125
Ipertensione (%)	12,5	32,4	0,54
Colesterolo totale basale	317,62 ± 35,45	474,647 ± 83,31	< 0,001
Trigliceridi basali	105,56 ± 44,458	118 ± 42,236	0,248
HDL basale	53,21 ± 13,41	50,26 ± 13,96	0,385

Tabella 6

Relazione tra la mediana del Col-LDL e il grado di stenosi carotidea: analisi logistica multivariata

Variabili predittive	Variabile dipendente		
	Grado di stenosi carotidea*		
	P	OR	95.0% CI for OR inferiore –superiore
LDL-mediana	0,042	4,81	1,10 - 21,01
Età	<0,001	1,12	1,04 – 1,21
Sesso	0,39	0,53	0,12 – 2,24
Ipertensione arteriosa	0,64	0,66	0,11 – 3,75
Evento cardiovascolare	0,50	1,82	0,31 -10,55

\*stenosi carotidea >50%

Figura 1

Relazione tra l'attività funzionale residua del gene del recettore delle LDL (%) e i livelli di Col-LDL pretrattamento (mg/dl) ( $r=0,45$ )

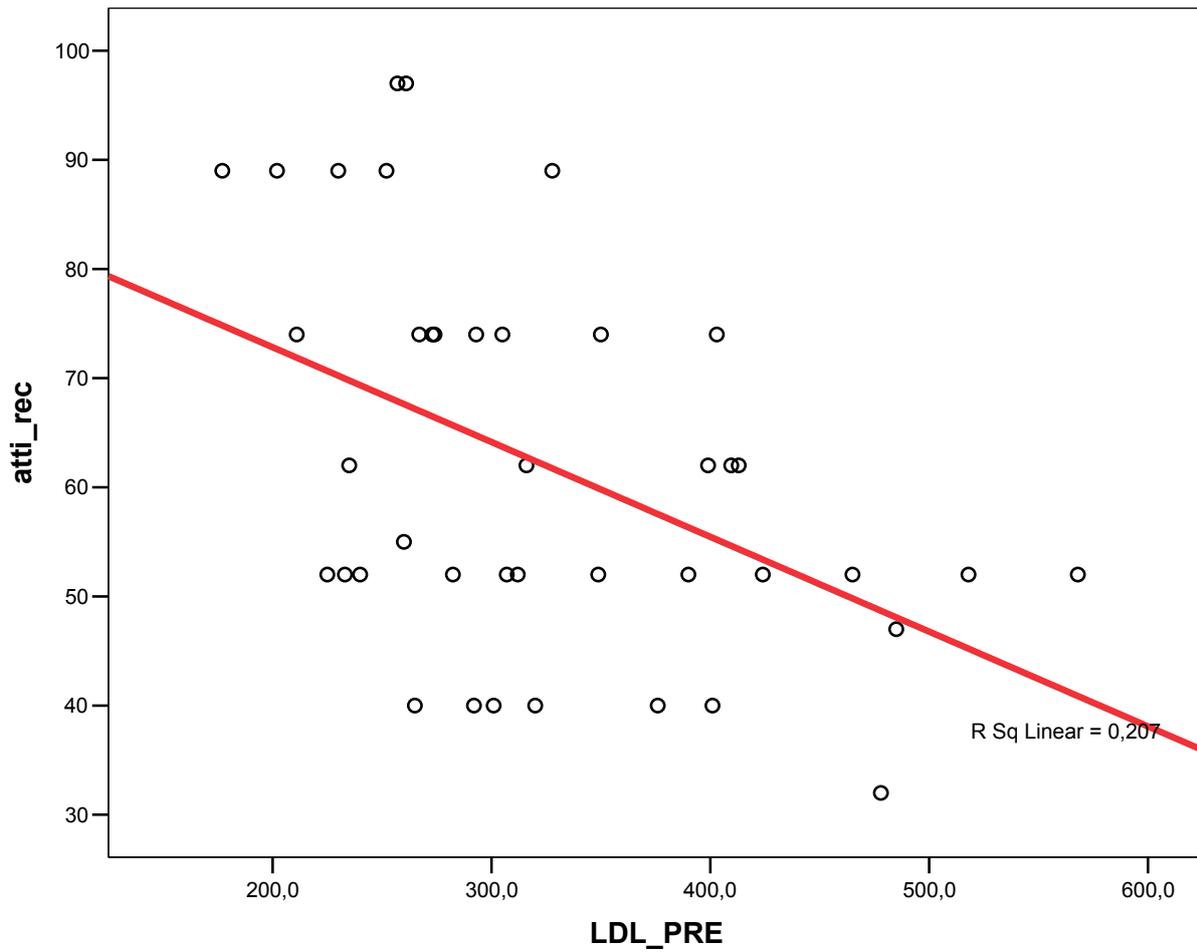


Figura 2

Prevalenza dell'aumento di IMT nei pazienti IF con Col-LDL minore o maggiore del valore mediano (303 mg/dl).  $p < 0,001$ ;  $p = 0,011$  corretto per Età, Sesso, Ipertensione arteriosa, Evento cardiovascolare.

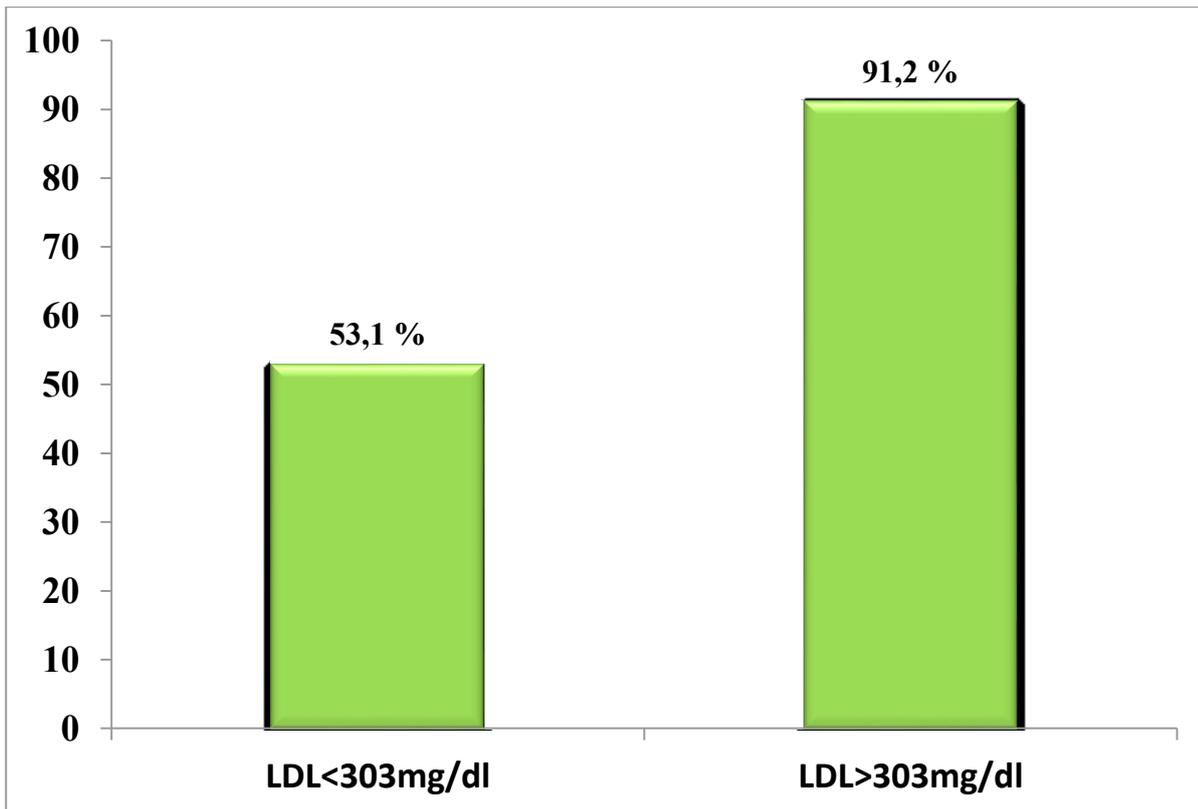


Figura 3

Prevalenza di placche carotidee in pazienti IF con LDL minore o maggiore del valore mediano (303mg/dl) .  $p < 0,001$ ;  $p = 0,002$  corretto per Età, Sesso, Ipertensione arteriosa, Evento cardiovascolare.

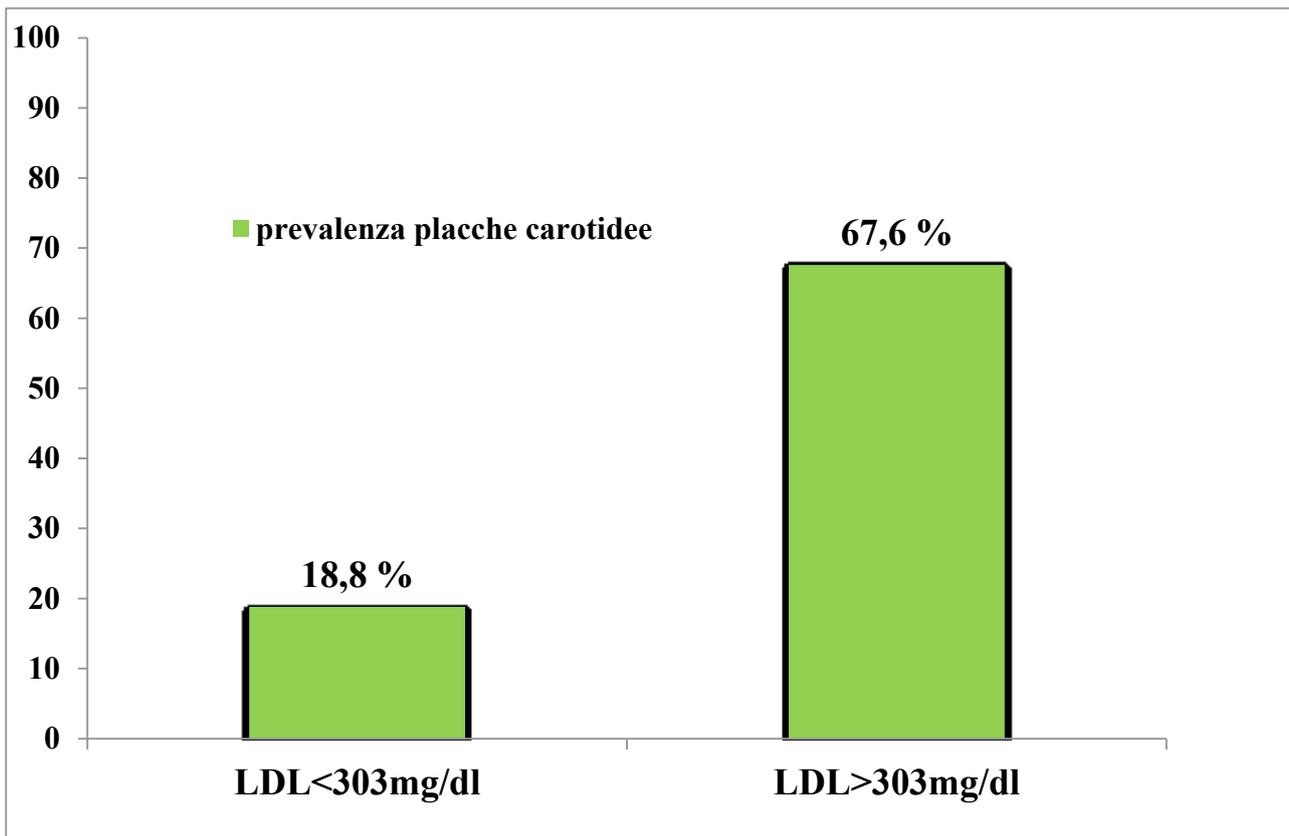


Figura 4

Prevalenza di grado di stenosi carotidea <50% e grado di stenosi carotidea>50% in pazienti in pazienti IF con LDL minore o maggiore del valore mediano (303 mg/dl). p =0,042 corretto per Età, Sesso, Ipertensione arteriosa, Evento cardiovascolare.

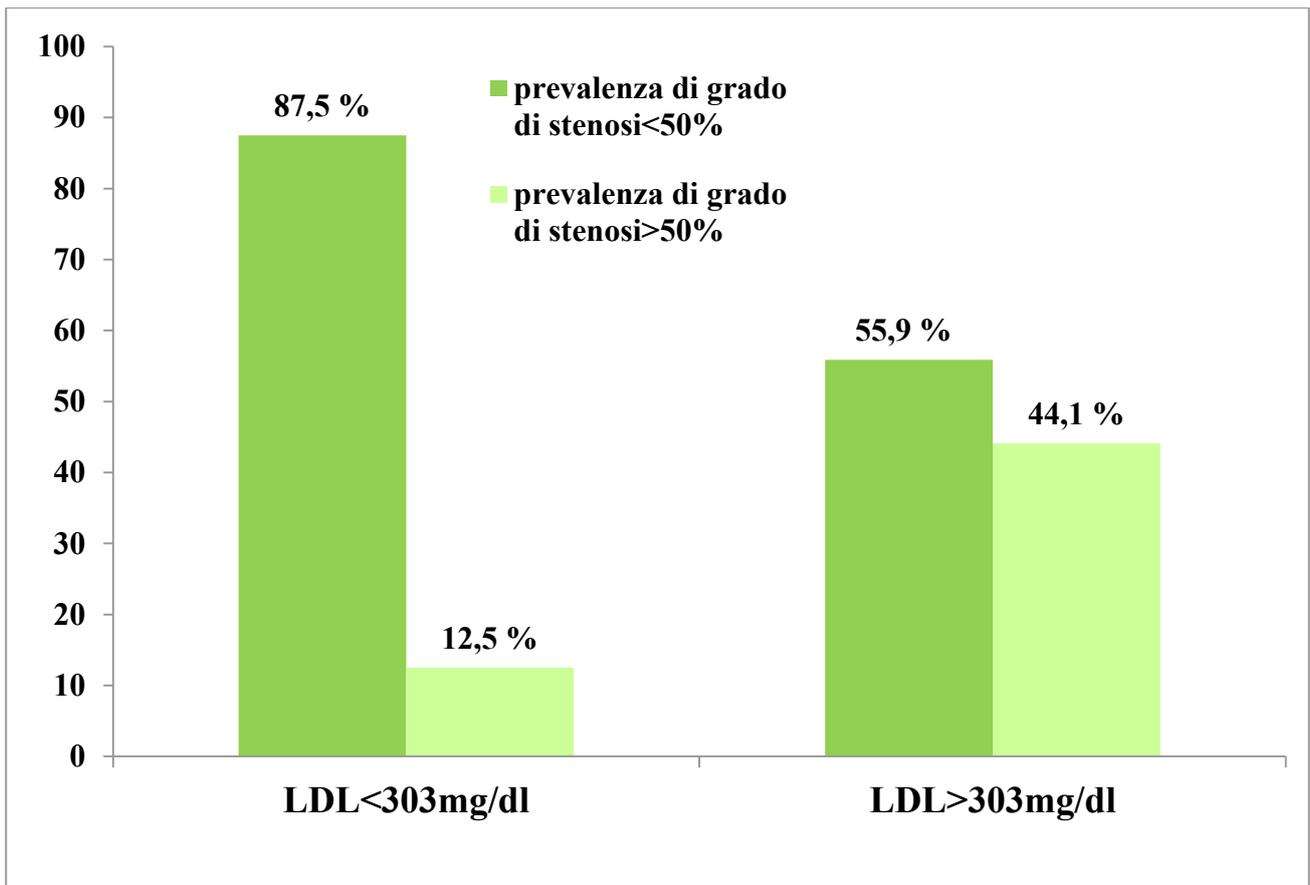


Figura 5

Prevalenza dell' assenza o presenza di sclerosi aortica lieve della valvola aortica e moderata o severa in pazienti IF con LDL minore o maggiore del valore mediano (303 mg/dl).  $p=0,007$ ;  $p=0,048$  corretto per Età, Sesso, Ipertensione arteriosa.

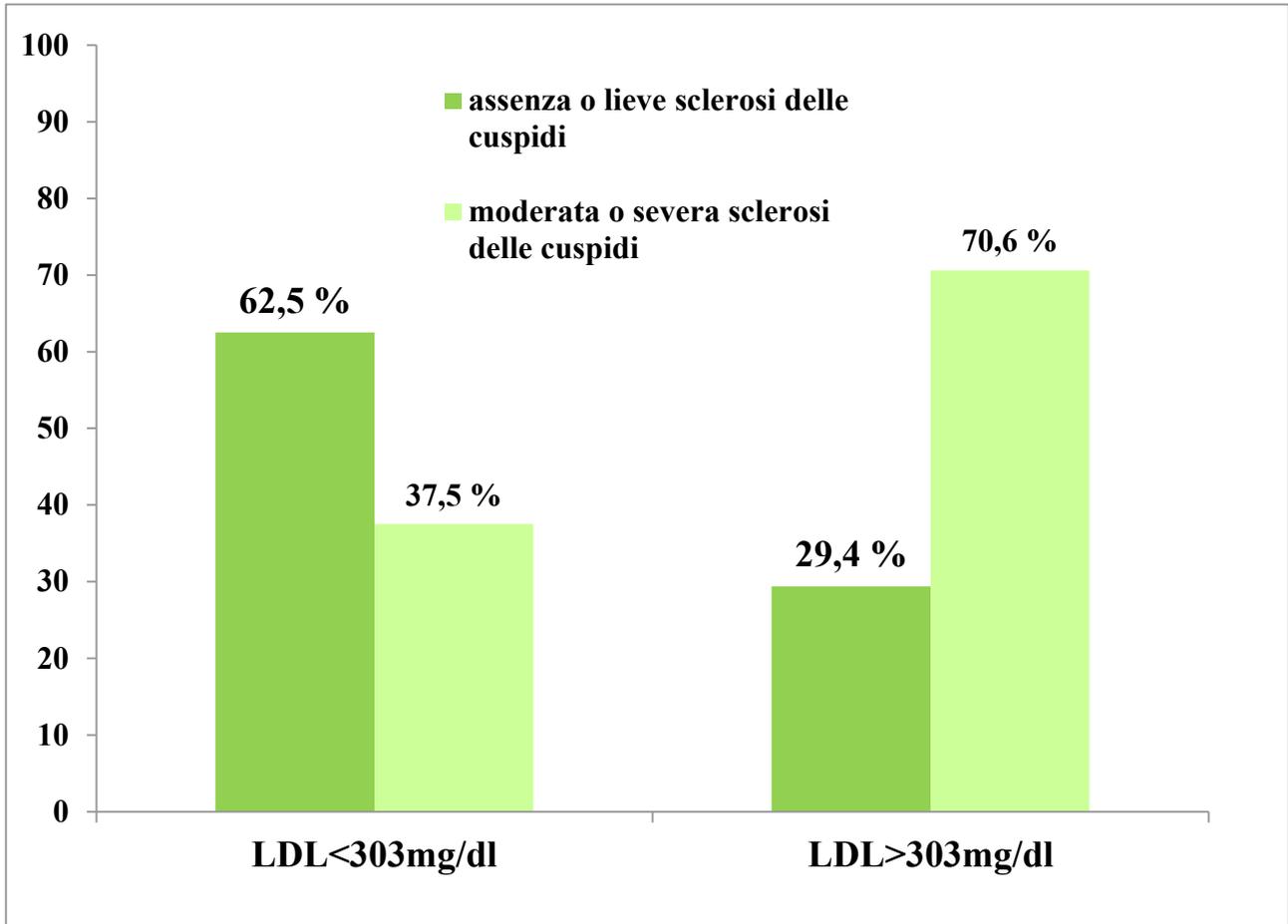


Tabella 7

Comparazione dei parametri ecocardiografici tra i pazienti IF con LDL minore o maggiore del valore mediano (303 mg/dl) (p non corretta).

	Col-LDL <303 mg/dl	Col-LDL >303 mg/dl	Valore di P
Età	38 ± 13,75	46 ± 14,75	0,027
Eventi cardiovascolari (%)	12,5	35,3	0,029
Indice di massa corporea (kg/m <sup>2</sup> )	24,87 ± 3,46	25,32 ± 2,81	NS
Radice aortica (cm)	2,98 ± 0,32	3,18 ± 0,41	0,03
Dimensione dell'atrio sinistro (cm)	3,64 ± 0,52	4,01 ± 0,84	0,035
volume dell'atrio sinistro (ml)	40,96 ± 8,3	49,25 ± 23,58	NS
RWT	0,26±0,05	0,27 ± 0,04	NS
LVEDD (cm)	4,94 ± 0,42	5,36 ± 0,66	0,004
LVEDD/ altezza (cm)	2,87 ± 0,54	3,22 ± 0,44	0,006
LVM/ altezza <sup>2,7</sup>	29,87 ± 8,1	39,57 ± 14,23	0,001
Frazione di eiezione	63 ± 5,29	60,13 ± 9,65	NS
wall motion index score	1,02 ± 0,11	1,15 ± 0,41	NS
E	82 ± 18,19	81 ± 19,56	NS
A	65,28 ± 15,87	61,15 ± 16,04	NS
E'	16,31 ± 5,6	15,5 ± 4,03	NS
Pressione sistolica (mmHg)	119,65 ± 12,5	127,85 ± 16,1	0,02
Pressione diastolica (mmHg)	73,34 ± 7,16	76,94 ± 7,82	NS

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill;2001.p2863-2913.
- 2) Sprecher DL, Hoeg JM, Schaefer EJ, Zech LA, Gregg RE, Lakatos E, Brewer HB Jr. The association of LDL receptor activity, LDL cholesterol level, and clinical course in homozygous familial hypercholesterolemia . *Metabolism* 1985; 34:294-299
- 3) L. Rallidis, R P Naoumova, G R Thompson, P Nihoyannopoulos Extent of severity of atherosclerotic involvement of aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia *Heart* 1998; 80:583-590
- 4) Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-6.
- 5) Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rollerli M, Langheim S, Ghisellini M, Rabbone I, Calandra S 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.
- 6) Vohl MC, Gaudet D, Moorjani S, Tremblay G, Perron P, Gagne C, Depres JP. Comparison of the effect of two low-density lipoprotein receptor class mutations on coronary heart disease among French-Canadian patients heterozygous for familial hypercholesterolaemia. *Eur. J Clin Invest* 1997;27:366-273
- 7) Pauciullo P., Giannino A., De Michele M., Gentile M., Liguori R., Argiriou A., Carlotto A., Faccenda F., Mancini M, Bond M. Gene, De Simone V., Rubba P. Increased carotid artery intima-media thickness is associated with a novel mutation of low-density lipoprotein receptor independently of major cardiovascular risk factor *Metabolism*, Vol 52, No 11, 2003:pp 1433-1438
- 8) Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *BMJ.* 1991 October 12; 303(6807): 893–896
- 9) Maria Romano, Maria Donata Di Taranto, Peppino Mirabelli, Maria Nicoletta D'Agostino, Arcangelo Iannuzzi, Gennaro Marotta, Marco Gentile, Maddalena Raia, Rosa Di Noto, Luigi

- Del Vecchio, Paolo Rubba, and Giuliana Fortunato An improved method on stimulated T-lymphocytes to functionally characterize novel and known LDL-mutations *J Lipid Res.* Nov 2011; 52(11): 2095–2100.
- 10) Romano M, Di Taranto MD, D'Agostino MN, Marotta G, Gentile M, Abate G, Mirabelli P, Di Noto. Identification and functional characterization of LDLR mutations in familial hypercholesterolemia patients from Southern Italy. *R, Del Vecchio L, Rubba P, Fortunato G.* 2010; 210:493-6.
  - 11) Joseph F. Polak, M.D., M.P.H., Michael J. Pencina, Ph.D, and Ralph B. D'Agostino, Sr., Ph.D. Carotid-Wall Intima–Media Thickness and Cardiovascular Events *N Engl J Med.* 2011 July 21; 365(3): 213–221
  - 12) Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katanick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler RE. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis--Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference *Radiology.* 2003;229:340-6.
  - 13) Roberto M. Lang, MD, FASE, Michelle Bierig, MPH, RDCS, FASE, Richard B. Devereux, MD, Frank A. Flachskampf, MD, Elyse Foster, MD, Patricia A. Pellikka, MD, Michael H. Picard, MD, Mary J. Roman, MD, James Seward, MD, Jack S. Shanewise, MD, FASE, Scott D. Solomon, MD, Kirk T. Spencer, MD, FASE, Martin St John Sutton, MD, FASE, and William J. Stewart, MD Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology *Journal of the American Society of Echocardiography* 2005 Dec;18(12):1440-63. Volume 18 Number 12
  - 14) Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989;2:358-67.
  - 15) Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol.* 1986 15;57:450-8.
  - 16) Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Iung B, Otto CM, Pellikka PA, Quiñones M; American Society of Echocardiography; European

- Association of Echocardiography. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr.* 2009;22:1-23.
- 17) Sherif F. Nagueh, Christopher P. Appleton, Thierry C. Gillebert, Paolo N. Marino, Jae K. Oh, Otto A. Smiseth, Alan D. Waggoner, Frank A. Flachskampf, Patricia A. Pellikka, Arturo Evangelista Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography *Journal of the American Society of Echocardiography* 2009 Volume 22, Issue 2, Pages 107-133
  - 18) Bertolini S, Cassanelli R., Garuti M., Ghisellini M., Simone ML, Roller M, Mastruzo P., Calandra S. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 1999; 19; 408-418
  - 19) Graham CA, McClean E, Ward AJM, Beattie ED, Martin S, O’Kane M, Young IS, Nicholls DP. Mutation screening and genotype:phenotype correlation in familial hypercholesterolemia *Atherosclerosis* . 1999;147:309-316
  - 20) Bertolini S, Pisciotta L, Rabacchi C, Cefalù AB, Noto D, Fasano T, Signori A, Fresa R, Averna M, Calandra S Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis.* 2013 Apr;227(2):342-8.
  - 21) Wang J, Huff E, Janecka L, Hegele RA. Low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in Canadian subjects with familial hypercholesterolemia, but not of French descent. *Hum Mutat.* 2001 Oct;18(4):359
  - 22) Marina A.W. Umans –Eckenhausen, Eric J.G. Sijbrands, John J.P. Kastelein and Joep C. Defesche Low –density Lipoprotein Receptor Gene Mutations and Cardiovascular Risk in a Large Genetic Cascade Screening Population *Circulation* 2002; 106; 3031-3036
  - 23) MJ Kotze, WJ De Villiers, K Steyn, JA Kriek, AD Marias, E Langenhoven, JS Hebert, JF Graadt Van Roggen, DR Van der Westhuyzen and GA Coetzee Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two African founder LDL receptor mutations *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1993;13;1460-1468
  - 24) Souverein OW, Defesche JC, Zwinderman AH, Kastelein JJ, Tanck MW. Influence of LDL-receptor mutation type on age at first cardiovascular event in patients with familial hypercholesterolemia. *Eur Heart J.* 2007;28:299-304.
  - 25) Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986 28;256:2823-8.

- 26) Parrinello G, Barbagallo CM, Pinto A, Amato P, Cecala MG, Noto D, Cefalù AB, Scalisi G, Notarbartolo A, Aversa MR, Licata G. Carotid atherosclerosis in hypercholesterolemic patients: relationship with cardiovascular events *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2001;11:96-103.
- 27) Ten Kate GL, ten Kate GJ, van den Oord SC, Dedic A, Dharampal AS, Nieman K, de Feyter PJ, Sijbrands EJ, van der Steen AF, Schinkel AF. Carotid plaque burden as a measure of subclinical coronary artery disease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2013 May 1;111(9):1305-10.
- 28) Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, Volcik K, Boerwinkle E, Ballantyne CM. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Apr 13;55(15):1600-7
- 29) Sanne A E Peters, Hester M den Ruijter, Michiel L Bots, Karel G M Moons Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review *Heart* 2012;98:177-18
- 30) Beppu S, Minura Y, Sakakibara H, Nagata S, Park YD, Nambu S, Yamamoto A. Supravalvular aortic stenosis and coronary ostial stenosis in familial hypercholesterolemia: two-dimensional echocardiographic assessment. *Circulation.* 1983 Apr;67(4):878-84
- 31) Jan Stritzke, Patrick Linsel-Nitschke, Marcello Ricardo Paulista Markus, Bjoörn Mayer, Wolfgang Lieb, Andreas Luchner, Angela Döring, Wolfgang Koenig, Ulrich Keil, Hans-Werner Hense, and Heribert Schunkert for the MONICA/KORA Investigators Association between degenerative aortic valve disease and long-term exposure to cardiovascular risk factors: results of the longitudinal population based KORA/MONICA survey. *European Heart Journal* 2009;30, 2044–2053.
- 32) Rossi A, Gaibazzi N, Dandale R, Agricola E, Moreo A, Berlinghieri N, Sartorio D, Loffi M, De Chiara B, Rigo F, Vassanelli C, Faggiano P. Aortic valve sclerosis as a marker of coronary artery atherosclerosis; a multicenter study of a large population with a low prevalence of coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2014 Mar 15;172(2):364-7
- 33) Prasad Y, Bhalodkar NC. Aortic sclerosis--a marker of coronary atherosclerosis. *Clin Cardiol.* 2004;27:671-3.
- 34) Aaron L Sverdlov, Doan TM Ngo, [...], and John D Horowitz Pathogenesis of aortic stenosis: not just a matter of wear and tear *Am J Cardiovasc Dis* 2011;1(2): 185-199