



SOCIETÀ ITALIANA DI CARDIOLOGIA



# Metabolismo dei lipidi ed inquadramento nosografico delle **DISLIPIDEMIE**

*Pasquale Perrone Filardi*  
*Ciro Indolfi*

Maurizio Averna  
Francesco Barillà  
Cristina Basso  
Alberico L. Catapano  
Marco Matteo Ciccone  
Alberto Corsini  
Antonio Curcio  
Martino Deidda  
Francesco Fioretti  
Gaetano Idone

Ciro Indolfi  
Dalgisio Lecis  
Massimo Mancone  
Jawahar L Mehta  
Giuseppe Mercurio  
Saverio Muscoli  
Savina Nodari  
Stefania Paolillo  
Roberto Pedrinelli  
Pasquale Perrone Filardi

Angela Pirillo  
Francesca Romana Prandi  
Stefania Rizzo  
Francesco Romeo  
Maddalena Rossi  
Massimiliano Ruscica  
Pietro Scicchitano  
Gianfranco Sinagra  
Carmen Spaccarotella



# Metabolismo dei lipidi ed inquadramento nosografico delle **DISLIPIDEMIE**

---

*Coordinamento Scientifico ed Editoriale*

*Ciro Indolfi*

*Pasquale Perrone Filardi*

*Stefania Paolillo*

---



# AUTORI

## *Maurizio Averna*

Professore Ordinario di Medicina Interna  
Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e  
Specialistica di Eccellenza “G. D’Alessandro”, Università degli Studi  
di Palermo, Palermo, Italia

## *Francesco Barillà*

Professore Associato di Malattie dell’Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor  
Vergata, Roma, Italia

## *Cristina Basso*

Professore Ordinario di Anatomia Patologica  
UOC di Patologia Cardiovascolare, Azienda Ospedaliera-  
Dipartimento di Scienze Cardio-toraco-vascolari e di Sanità  
Pubblica, Università di Padova, Padova, Italia

## *Alberico L. Catapano*

Professore Ordinario di Farmacologia, Farmacologia Clinica e  
Farmacognosia  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,  
Università degli Studi di Milano, e IRCCS Multimedica, Sesto S.  
Giovanni, Milano, Italia

## *Marco Matteo Ciccone*

Professore Associato di Malattie dell’Apparato Cardiovascolare  
Sezione di Cardiologia, Dipartimento Cardio-Toracico, Università  
degli Studi “A. Moro” di Bari, Bari, Italia

## *Alberto Corsini*

Professore Ordinario di Farmacologia, Farmacologia Clinica e  
Farmacognosia  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,  
Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

## *Antonio Curcio*

Professore Associato di Malattie dell’Apparato Cardiovascolare  
Università Magna Graecia di Catanzaro, Catanzaro, Italia

## *Martino Deidda*

Ricercatore in Malattie dell’Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli  
Studi di Cagliari, Cagliari, Italia

### ***Francesco Fioretti***

Medico Specializzando in Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze  
Radiologiche e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Brescia,  
Brescia, Italia

### ***Gaetano Idone***

Cardiologo  
UOC di Cardiologia, Fondazione Policlinico Tor Vergata, Roma, Italia

### ***Ciro Indolfi***

Professore Ordinario di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Direttore UO di Cardiologia, Università Magna Graecia di  
Catanzaro, Catanzaro, Italia

### ***Dalgisio Lecis***

Cardiologo  
UOC di Cardiologia, Fondazione Policlinico Tor Vergata, Roma, Italia

### ***Massimo Mancone***

Professore Associato di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento di Scienze Cliniche Internistiche, Anestesiologiche e  
Cardiovascolari, "Sapienza" Università di Roma, Roma, Italia

### ***Jawahar L Mehta***

Distinguished Professor of Medicine, and Physiology and Biophysics  
Department of Internal Medicine, Division of Cardiology, University  
of Arkansas for Medical Sciences and the Central Arkansas  
Veterans Healthcare System, Little Rock, AR, USA

### ***Giuseppe Mercurio***

Professore Ordinario di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento Scienze Mediche e Sanità Pubblica, Università degli  
Studi di Cagliari, Cagliari, Italia

### ***Saverio Muscoli***

Dirigente Medico  
UOC di Cardiologia, Fondazione Policlinico Tor Vergata, Roma, Italia

### ***Savina Nodari***

Professore Associato di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche  
e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Brescia, Brescia, Italia

### ***Stefania Paolillo***

Ricercatrice in Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

### ***Roberto Pedrinelli***

Professore Associato di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e  
dell'Area Critica, Università di Pisa, Pisa, Italia

### ***Pasquale Perrone Filardi***

Professore Ordinario di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università degli  
Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

### ***Angela Pirillo***

Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Centro SISA, Ospedale  
E. Bassini, Cinisello B., Milano e IRCCS Multimedica, Sesto S.  
Giovanni, Milano, Italia

### ***Francesca Romana Prandi***

Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
UOC Cardiologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata",  
Roma, Italia

### ***Stefania Rizzo***

Professore Associato di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
UOC. Patologia Cardiovascolare, Azienda Ospedaliera-  
Dipartimento di Scienze Cardio-toraco-vascolari e di Sanità  
Pubblica, Università di Padova, Padova, Italia

### ***Francesco Romeo***

Professore Ordinario di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
UOC Cardiologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata",  
Roma, Italia  
UniCamillus International Medical University, Roma, Italia

### ***Maddalena Rossi***

Medico Specializzando in Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento Cardioracovascolare, Università degli Studi di  
Trieste, Trieste, Italia

### ***Massimiliano Ruscica***

Professore Associato di Patologia Generale e Patologia Clinica  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,  
Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

### ***Pietro Scicchitano***

Dirigente Medico di I livello  
UOC UTIC Cardiologia, P.O. "F. Perinei" Altamura, Bari, Italia

### ***Gianfranco Sinagra***

Professore Ordinario di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Direttore Dipartimento Cardiotoracovascolare ASUGI, Università  
degli Studi di Trieste, Trieste, Italia

### ***Carmen Spaccarotella***

Ricercatore in Malattie dell'Apparato Cardiovascolare  
Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università degli  
Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia



# Metabolismo dei lipidi ed inquadramento nosografico delle **DISLIPIDEMIE**

## CAPITOLO 1

### **Metabolismo dei lipidi ed inquadramento nosografico delle dislipidemie**

*Massimiliano Ruscica, Maurizio Averna, Alberto Corsini*

pag 11

## CAPITOLO 2

### **Il ruolo patogenetico dei lipidi nella malattia cardiovascolare**

*Angela Pirillo, Alberico L. Catapano*

pag 25

## CAPITOLO 3

### **Genetica delle dislipidemie**

*Maurizio Averna*

pag 35

## CAPITOLO 4

### **Il ruolo del recettore LOX-1 nella patogenesi dell'aterosclerosi**

*Francesco Romeo, Francesca Romana Prandi,  
Jawahar L. Mehta*

pag 49

## CAPITOLO 5

### **Dislipidemia e danno vascolare**

*Marco Matteo Ciccone, Pietro Scicchitano,  
Stefania Rizzo, Cristina Basso*

pag 59

## CAPITOLO 6

### **Statine, inibitori del riassorbimento del colesterolo e terapia di combinazione**

*Fancesco Barillà, Dalgisio Lecis,  
Gaetano Idone, Saverio Muscoli*

pag 63

## CAPITOLO 7

### **Acidi grassi e fibrati**

*Savina Nodari, Francesco Fioretti,  
Martino Deidda, Giuseppe Mercurio*

pag 79

## CAPITOLO 8

### **Il ruolo dell'acido bempedoico, un inibitore dell'ATP citrato liasi, nella pratica clinica**

*Roberto Pedrinelli, Pasquale Perrone Filardi*

pag 99

## CAPITOLO 9

### **Opzioni terapeutiche nell'ipercolesterolemia familiare omozigote: il ruolo di lomitapide**

*Maurizio Averna, Alberico L. Catapano*

pag 109

## CAPITOLO 10

### **Anticorpi monoclonali: inibitori di PCSK9 ed evinacumab**

*Gianfranco Sinagra, Maddalena Rossi, Massimo Mancone*

pag 117

## CAPITOLO 11

### **Oligonucleotidi antisense e RNA interfering**

*Ciro Indolfi, Carmen Spaccarotella, Antonio Curcio*

pag 131

## ABBREVIAZIONI

pag 141

## BIBLIOGRAFIA

pag 145

# Metabolismo dei lipidi ed inquadramento nosografico delle dislipidemie

C1

Massimiliano Ruscica, Maurizio Averna, Alberto Corsini

## Metabolismo dei lipidi

### Introduzione

Deputate al trasporto nel plasma dei lipidi, le lipoproteine sono particelle quasi sferiche associate a proteine idrofiliche chiamate apolipoproteine (apo). Le lipoproteine sono aggregati macromolecolari circolanti costituiti da lipidi neutri, quali esteri del colesterolo (*cholesteryl ester*, CE) e trigliceridi (TG), lipidi polari, quali fosfatidilcolina, sfingomielina e colesterolo libero, e proteine (apo-proteine). La parte più interna delle lipoproteine è idrofobica e costituita da CE e TG, mentre la parte più esterna è più polare e costituita da fosfolipidi e colesterolo libero.

Le lipoproteine sono classificate in base alla loro densità: chilomicroni, a bassissima densità (*very low density lipoproteins*, VLDL), a bassa densità (*low density lipoproteins*, LDL), a densità intermedia (*intermediate density lipoproteins*, IDL) ed alta (*high density lipoproteins*, HDL).

A queste si aggiungono la lipoproteina(a) [Lp(a)] che ha una struttura complessa costituita da una componente simile alle LDL a cui è unita in modo covalente l'apolipoproteina(a).

Come riportato in Tabella 1<sup>(1)</sup>, le dimensioni e le densità delle lipoproteine rispecchiano il contenuto di lipidi neutri, con i chilomicroni e le VLDL che hanno le dimensioni più grandi, ma sono le meno dense e viceversa le HDL che hanno le dimensioni più piccole e sono le più dense.

### Chilomicroni

I grassi di origine alimentare vengono assorbiti dagli enterociti del piccolo intestino ed assemblati nei chilomicroni che rappresentano le lipoproteine più ricche in TG. Sono costituiti da un nucleo lipidico e da uno strato periferico di fosfolipidi, colesterolo libero e apolipoproteine.

Gli enterociti del piccolo intestino assorbono colesterolo e acidi grassi tramite diffusione passiva o per trasporto attivo.

I chilomicroni, sintetizzati durante la fase postprandiale, richiedono un processo multistep che inizia nel reticolo endoplasmatico con l'assemblaggio che avviene tramite un processo sinergico mediato da apoB48 e la proteina di trasferimento microsomiale di TG (*microsomal triglyceride transfer protein*, MTP).

**Tabella 1.** Proprietà chimico-fisiche delle lipoproteine

Lipoproteina	Dimensione (nm)	Densità (g/mL)	Principali lipidi	Apolipoproteine
Chilomicroni	80-100	< 0.93	Trigliceridi (90-95%) CE (2-4%) Fosfolipidi (2-6%) Colesterolo (1%)	Principale: ApoB-48 Altre: ApoA-I, A-II, A-IV, A-V
VLDL	30-80	0,95-1,006	Trigliceridi (50-60%) CE (8-14%) Fosfolipidi (12-16%) Colesterolo (4-7%)	Principale: ApoB-100 Altre: ApoA-I, C-II, C-III, E, A-V
IDL	25-30	1,006-1,019	Trigliceridi (25-40%) CE (20-35%) Fosfolipidi (16-24%) Colesterolo (7-11%)	Principale: Apo-B100 Altre: ApoC-II, C-III, E
LDL	20-25	1,019-1,063	Trigliceridi (4-6%) CE (34-35%) Fosfolipidi (22-26%) Colesterolo (6-15%)	Principale: Apo-B100
HDL	8-13	1,063-1,210	Trigliceridi (7%) CE (10-20%) Fosfolipidi (55%) Colesterolo (5%)	Principale: ApoA-I Altre: ApoA-II, C-III, E, M
Lipoproteina(a)	25-30	1,006-1,125	Trigliceridi (4-8%) CE (35-36%) Fosfolipidi (17-24%) Colesterolo (6-9%)	Principale: Apo(a) Altre: ApoB-100

**CE:** colesterolo esterificato, **Apo:** apolipoproteina, **VLDL:** very low density lipoproteins, **IDL:** intermediate density lipoproteins, **LDL:** low density lipoproteins, **HDL:** high density lipoproteins

Nello specifico, è stato proposto che l'assemblaggio coinvolga tre eventi indipendenti <sup>(2,3)</sup>:

- 1) incorporazione dei fosfolipidi preformati e formazione di lipoproteine primordiali;
- 2) sintesi di goccioline lipidiche ricche in TG di varie dimensioni;
- 3) "espansione del *core*" cioè fusione delle lipoproteine primordiali con le goccioline lipidiche ricche in TG. La proteina MTP favorisce l'iniziale incorporazione dei lipidi neutri nei chilomicroni neoformati nel reticolo endoplasmatico.

Inoltre, se apoB nascente non dovesse essere ripiegata correttamente verrebbe indirizzata e degradata nel proteasoma <sup>(4)</sup>. La secrezione dei chilomicroni in circolo dipende dalla concentrazione di fosfatidilcolina di origine alimentare presente nel lume intestinale e dalla quantità di grassi nella dieta. Una volta secreti, i chilomicroni sono trasportati tramite il sistema linfatico e, attraverso il dotto toracico, raggiungono il circolo ematico dove vengono metabolizzati dalla lipasi lipoproteica che idrolizza i triacilgliceroli <sup>(5)</sup>.

## VLDL - IDL - LDL

Le VLDL sono assemblate costitutivamente a livello epatico e rappresentano la principale lipoproteina secreta durante la fase di digiuno. Anche in questo caso, come per i chilomicroni, l'assemblaggio avviene tramite MTP che trasporta i lipidi verso i sistemi di sintesi della apoB-100. Nello specifico, sono stati indentificati due passaggi: (i) la lipidazione parziale di apoB con TG, CE e fosfolipidi durante la sua traduzione e traslocazione nel lume del reticolo endoplasmatico rugoso per mezzo di MTP formando una pre-VLDL; (ii) la pre-VLDL interagisce con una particella ricca in TG nel reticolo endoplasmatico liscio. Si generano quindi VLDL di diverse dimensioni: VLDL<sub>1</sub> (ricche in TG) e VLDL<sub>2</sub> (ricche in CE) <sup>(6)</sup>.

Una volta nel torrente circolatorio le VLDL sono idrolizzate principalmente dalla lipasi lipoproteica e convertite in IDL, a un più basso contenuto in TG.

Le IDL vengono quindi metabolizzate dalla lipasi lipoproteica e dalla lipasi epatica, che mostra una spiccata affinità per le IDL.

Si generano quindi le LDL, ricche in CE e con un minore contenuto di TG rispetto alle VLDL. Le LDL possono andare incontro a cambiamenti legati principalmente all'attività della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (*cholesteryl ester transfer protein*, CETP), che media il trasferimento di TG e CE tra lipoproteine<sup>(7)</sup>.

In particolare, i TG delle VLDL sono trasferite alle LDL e alle HDL in cambio di esteri del colesterolo. Nei pazienti con diabete di tipo 2, non solo nello stato di digiuno, ma anche nel periodo postprandiale si assiste ad un fenotipo di ipertrigliceridemia dovuto sia a un'aumentata produzione di VLDL sia ad un loro ridotto catabolismo. Contemporaneamente vi è una ridotta attività della lipasi lipoproteica (dovuta ad un ridotto effetto inibitorio dell'insulina), processo che prolunga la permanenza in circolo delle lipoproteine ricche in TG a causa del loro ridotto catabolismo<sup>(8)</sup>.

I termini “colesterolo LDL” e “colesterolo LDL” sono spesso confusi o utilizzati in modo intercambiabile, generando potenziali incomprensioni. Il colesterolo è una componente essenziale delle membrane cellulari e un precursore di acidi biliari e ormoni steroidi. Nella maggior parte delle condizioni, le particelle LDL costituiscono circa il 90% delle lipoproteine circolanti contenenti apoB in condizioni di digiuno. In base a studi epidemiologici, studi osservazionali e studi randomizzati, il ruolo delle LDL come evento causale nello sviluppo dell'aterosclerosi è ormai inconfutabile<sup>(9)</sup>. Le ultime Linee Guida per la gestione delle dislipidemie<sup>(10)</sup>, elaborate congiuntamente dall'*European Society of Cardiology* (ESC) e dall'*European Atherosclerosis Society* (EAS), confermano l'approccio al paziente, a partire dalla caratterizzazione del rischio cardiovascolare (CV) globale e dalla stratificazione in classi di rischio, a ciascuna delle quali viene assegnato un obiettivo terapeutico in termini di livelli di colesterolo LDL: questi obiettivi rispettano l'approccio secondo cui più basso è il livello di LDL, più efficace sarà la prevenzione di eventi CV.

Brevemente, durante la progressione morfologica delle lesioni aterosclerotiche, vi è un'aumentata permeabilità endoteliale che consente una maggiore infiltrazione e la successiva ritenzione delle LDL nell'intima con conseguente formazione di lesioni aterosclerotiche precoci. Le successive modificazioni delle LDL, attraverso processi ossidativi ed enzimatici che hanno luogo nell'intima, portano al rilascio di fosfolipidi capaci di favorire e mantenere le modificazioni endoteliali nelle zone emodinamicamente predisposte. Le LDL ossidate sono riconosciute attraverso gli *scavenger receptors* e fagocitate da parte dei macrofagi che si trasformano in cellule schiumose<sup>(11,12)</sup>.

Da un punto di vista clinico un'altra condizione patologica da non sottovalutare è quella che si determina nel fenotipo con sindrome metabolica, diabete e ipertrigliceridemia. Le concentrazioni plasmatiche di colesterolo LDL e di LDL possono diventare discordanti a causa della predominanza di LDL piccole e dense, povere in colesterolo. In questi casi, il colesterolo LDL non riflette accuratamente la concentrazione di particelle LDL o il suo effetto sul rischio CV. Quindi, la misura diretta del numero di particelle LDL o della concentrazione di apoB (riconoscendo che ogni particella LDL contiene una singola molecola apoB) può riflettere più accuratamente l'effetto causale delle LDL sul rischio aterosclerotico<sup>(13)</sup>.

L'importanza della valutazione dei livelli di apoB è stato rafforzato in studi di randomizzati che forniscono dati su relazioni causali putative tra fattori di rischio modificabili ed esiti clinici, usando le varianti genetiche per ricreare lo schema di randomizzazione in un contesto osservazionale<sup>(14)</sup>.

Uno studio che ha valutato l'associazione di due *score* genetici, costruiti sulla base di varianti inerenti geni che regolano il metabolismo dei TG e delle LDL ha dimostrato che la riduzione del rischio CV era paragonabile alla riduzione di ogni unità di lipoproteine contenenti apoB. La riduzione del rischio CV sembra indipendente, additiva e proporzionale alla variazione assoluta dei livelli di apoB. Il beneficio clinico derivante dall'abbassamento dei livelli di TG è simile a quello ottenibile dalla riduzione dei livelli di LDL per ogni variazione unitaria nei livelli di apoB<sup>(15)</sup>.

## Remnant del colesterolo

Le lipoproteinlipasi circolanti e tissutali idrolizzano i TG delle VLDL e dei chilomicroni trasformandoli rispettivamente in VLDL/IDL *remnants* e chilomicroni *remnants*. L'insieme del colesterolo contenuto in queste lipoproteine ricche in TG costituisce i *remnants* del colesterolo. In ambito epidemiologico e solo in condizioni di digiuno, possiamo considerare il colesterolo *remnant* come tutto il colesterolo plasmatico meno il colesterolo HDL ed il colesterolo LDL, ossia, tutto il colesterolo presente nelle VLDL, nei chilomicroni e nei loro *remnants*, definite globalmente lipoproteine ricche in TG. Nello specifico, diversamente dai chilomicroni e dalle VLDL che per le ampie dimensioni non penetrano la parete dei vasi, e analogamente alle LDL, i *remnant* delle lipoproteine ricche in trigliceridi passano facilmente la parete delle arterie e vengono trattenuti al loro interno, dove si legano alla matrice connettivale.

La loro presenza stimola la progressione delle cellule muscolari lisce, la proliferazione dei macrofagi residenti, l'attivazione delle piastrine e la progressione della placca<sup>(16)</sup> (Figura 1).

## Lipoproteine contenenti apoB

ApoB è un'apolipoproteina necessaria per la sintesi epatica (apoB100) e intestinale (apoB48) delle lipoproteine ricche in trigliceridi. Va ricordato che sia apoB100 (4536 aminoacidi) che apoB48 (2152 aminoacidi) derivano da un singolo gene, con la forma da 48 che si forma a livello intestinale attraverso un meccanismo di *editing* dell'RNA messaggero che contiene un codone di stop prematuro (UAA)<sup>(17)</sup>.

L'apoB100, che è necessaria per l'assemblaggio delle VLDL, funge anche da ligando per la *clearance* delle LDL. Per ogni particella di LDL esiste una sola molecola di apoB100. ApoB è una componente di tutte le particelle aterogeniche o potenzialmente aterogeniche, incluse le VLDL, le IDL, le LDL e la lipoproteina(a), nelle quali ogni particella lipoproteica contiene una molecola di apoB.

ApoB, quindi, fornisce una misura diretta del numero di lipoproteine aterogeniche in circolo. Anche nei pazienti ipertrigliceridemicici, la maggior parte dell'apo B plasmatica è associata alle LDL, rendendo così questa apolipoproteina un buon surrogato della concentrazione delle LDL. Le lipoproteine contenenti apoB più grandi possono essere meno aterogeniche delle lipoproteine LDL che hanno dimensioni minori, suggerendo così che la misura specifica dell'apo B contenuta nelle LDL potrebbe essere un predittore migliore rispetto alla misura dell'apo B totale, sebbene questo non sia stato ancora dimostrato in modo conclusivo

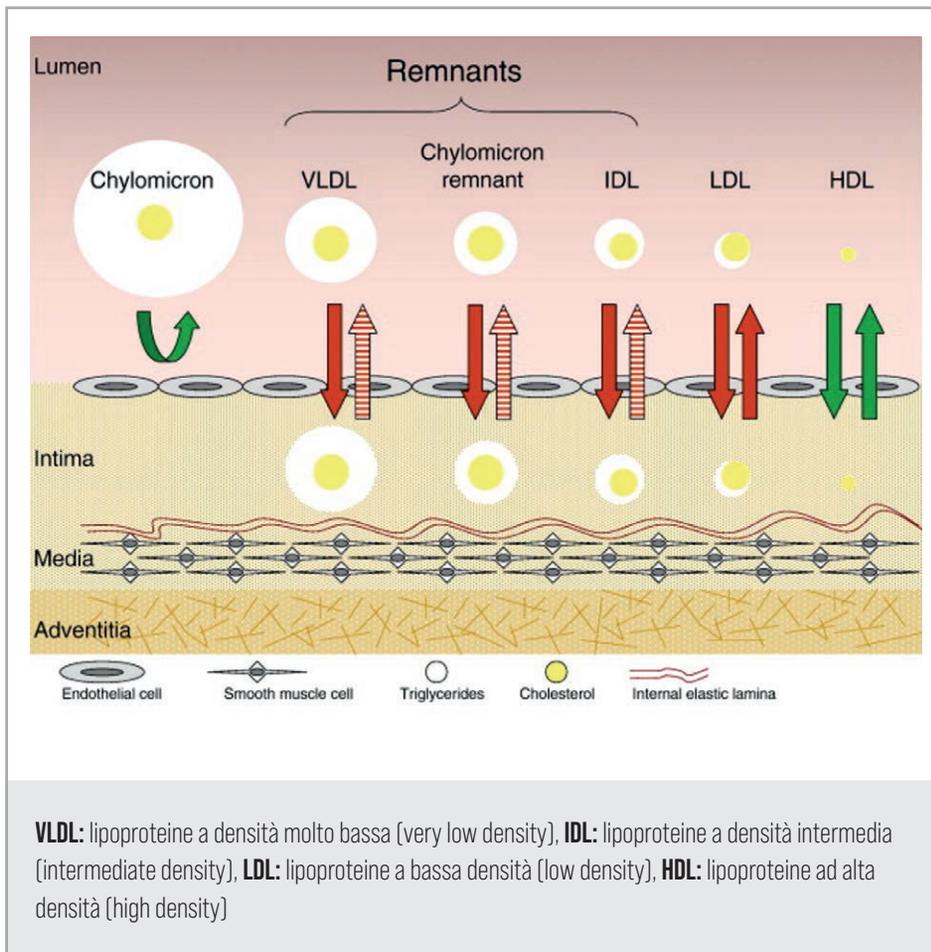


Figura 1. Remnants del colesterolo

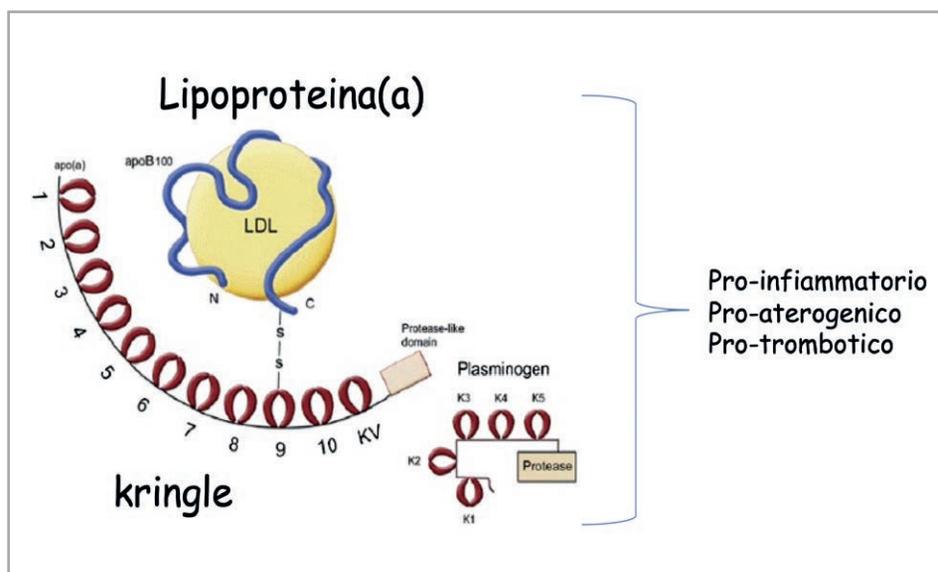
## Lipoproteina(a)

Identificata da Kare Berg all'inizio degli anni '60, la Lp(a) è una glicoproteina simile al plasminogeno e sintetizzata dal fegato. È costituita dal legame tra apoB e la glicoproteina apo(a) ed ha una bassa densità simile a quella della lipoproteina LDL, dalla quale si differenzia appunto per la presenza di apo(a) (Figura 2). L'assemblaggio dovrebbe avvenire al di fuori degli epatociti (non si può escludere un processo intracellulare) e coinvolgere interazioni non covalenti lisina-dipendenti tra apo(a) e apoB100, evento che precede la formazione del legame disolfuro tra le due molecole.

Un'altra sua peculiarità risiede nella regolazione genetica dei livelli circolanti che sono inversamente correlati alle dimensioni delle isoforme di apo(a): più la molecola di apo(a) è piccola, più la concentrazione plasmatica di Lp(a) è elevata.

L'apo(a) contiene un numero di copie ripetute di una sequenza che è molto simile al "kringle" IV del plasminogeno. Tra i 10 tipi di KIV presenti nell'apo(a), il tipo 1 e i tipi 3-10 sono presenti in singola copia, a eccezione del tipo 2 che è presente in numero variabile di copie ripetute. L'intervallo di concentrazione nella popolazione varia da valori molto bassi, < 0,2 mg/dL a livelli molto elevati > 200 mg/dL, ovvero più di 1.000 volte e sono per il 90% geneticamente determinati.

Infatti le dimensioni del gene LPA riflettono le dimensioni del dominio KIV<sub>2</sub> ripetuto contribuendo approssimativamente al 60% della variazione.



**Figura 2.** Struttura della lipoproteina(a)

Vi sono infatti da considerare anche polimorfismi del gene LPA che influenzano i valori di Lp(a).

Per quanto riguarda il catabolismo rimane in gran parte sconosciuto e la sintesi viene considerato il principale regolatore dei livelli circolanti. Tuttavia è giusto riportare alcuni dati inerenti il possibile ruolo del recettore delle LDL. I pazienti con ipercolesterolemia familiare dovuta a deficit del recettore delle LDL presentano valori più elevati di Lp(a) rispetto ai parenti non affetti, suggerendo un ruolo del recettore delle LDL nel catabolismo della Lp(a)<sup>(18)</sup>, anche se altri recettori putativi sono stati identificati<sup>(19)</sup>.

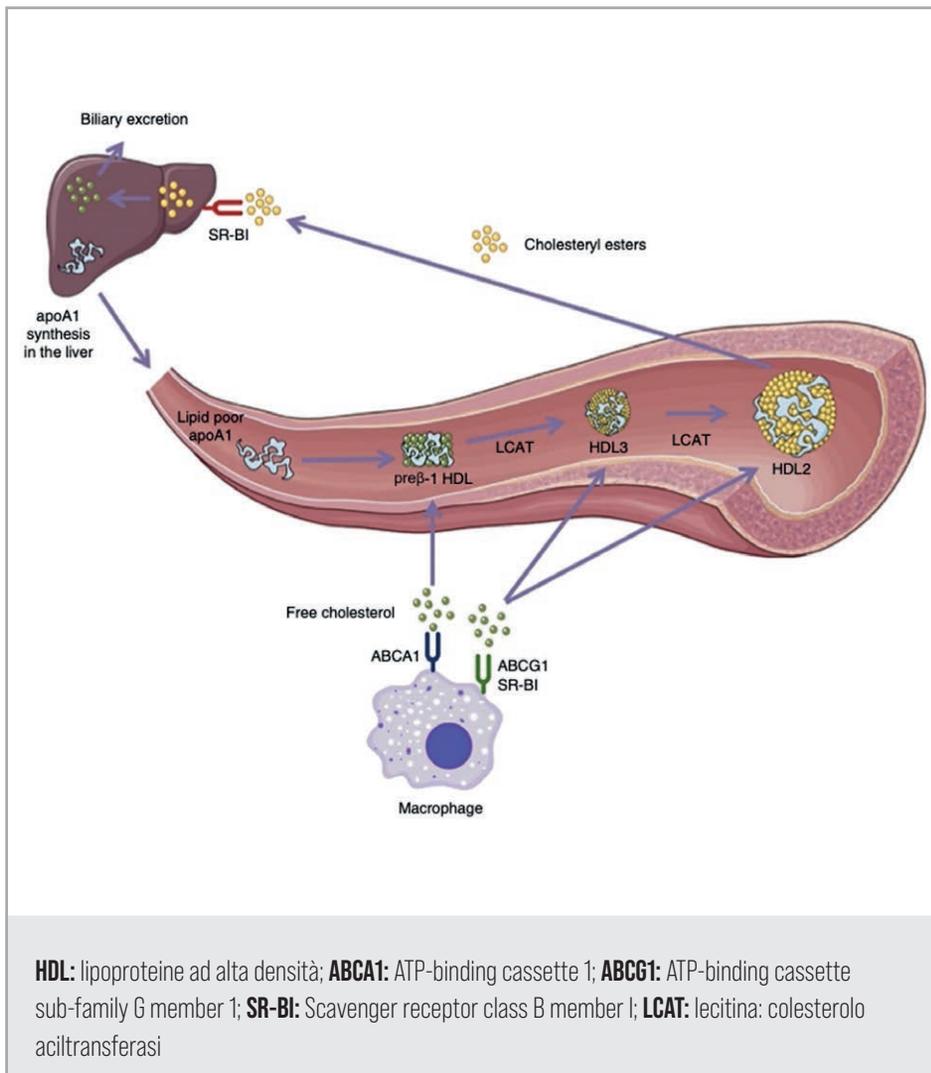
## HDL

Le HDL rappresentano un gruppo eterogeneo di particelle di piccole dimensioni con diametro compreso tra 7 e 12 nm. In base alla densità le HDL possono essere distinte in HDL2 (1,063-1,125 g/ml), più grandi e leggere, e HDL3 (1,125-1,21 g/ml), più piccole e dense<sup>(20)</sup>. Le HDL sono sottoposte a un costante rimodellamento nel plasma, grazie all'azione di numerosi enzimi e proteine di trasferimento dei lipidi. Il metabolismo delle HDL inizia con la secrezione nel plasma di piccole particelle discoidali (pre-beta-1) che hanno un basso contenuto in colesterolo non esterificato.

Le particelle si arricchiscono in colesterolo libero di provenienza cellulare, il colesterolo viene esterificato per opera di LCAT (lecitina: colesterolo aciltransferasi) e durante questo processo le particelle assumono la forma sferica<sup>(21)</sup>.

Le HDL trasferiscono poi gli esteri del colesterolo alle LDL e VLDL per mezzo della proteina CETP e al fegato tramite il recettore epatico SR-B1. Si rigenerano così HDL discoidali che ricominciano il ciclo. La funzione principale delle HDL è il trasporto inverso del colesterolo al fegato per l'escrezione.

L'effetto di questo processo è di opporsi all'accumulo di colesterolo nel vaso arterioso e stabilizzare le placche ateromasiche, prevenendo così lo sviluppo di eventi cardio- e cerebro-vascolari. Il primo *step* del trasporto inverso del colesterolo è caratterizzato dalla rimozione del colesterolo non esterificato dalle cellule, mediante processi attivi o passivi<sup>(22,23)</sup>.



**Figura 3.** Metabolismo delle HDL e trasporto inverso del colesterolo

Il trasporto attivo è mediato dal trasportatore ABCA1 (ATP-binding cassettes) in grado di promuovere l'efflusso unidirezionale di fosfolipidi e colesterolo verso apolipoproteine povere in lipidi e pre-beta-HDL. Per quanto riguarda i processi passivi, il rilascio di colesterolo per diffusione acquosa avviene in tutti i tipi di cellule e risulta facilitato quando sulla membrana cellulare viene espresso il recettore scavenger BI (SR-BI). Sia la diffusione acquosa che l'efflusso SR-BI-mediato vengono promossi da HDL mature e di grandi dimensioni (Figura 3).

Le HDL svolgono anche una funzione importante nell'omeostasi endoteliale attraverso l'inibizione della produzione di molecole pro-infiammatorie e di adesione cellulare, con conseguente rilassamento della parete vasale ed il mantenimento dell'integrità della barriera endoteliale. Le HDL stimolano la produzione ed il rilascio di molecole vasoattive quali ossido nitrico (NO) e prostaglandina I2 (PGI2) da parte delle cellule endoteliali. Infine, le HDL hanno proprietà antiossidanti che contribuiscono a proteggere la parete vasale dal danno ossidativo<sup>(24,25)</sup>.

Per quanto riguarda l'attività ateroprotettiva, alcune di esse sono legate a proprietà di specifiche sottoclassi di HDL, la cui concentrazione nel plasma può non essere associata ai livelli di HDL. Quindi la funzionalità delle HDL, più che la loro numerosità

nel plasma, potrebbe essere un miglior predittore del rischio CV. Infatti sebbene studi epidemiologici hanno dimostrato come aumentate concentrazioni plasmatiche e/o di funzionalità delle HDL potrebbero rappresentare una strategia terapeutica per ridurre il rischio CV residuo, studi di intervento con farmaci che aumentavano i livelli plasmatici di HDL non hanno confermato tale ipotesi<sup>(26)</sup>.

## Inquadramento nosografico delle dislipidemie

Le dislipidemie consistono nell'aumento del colesterolo plasmatico, dei TG, o di entrambi, o in un basso livello di colesterolo HDL che contribuisce allo sviluppo di aterosclerosi. Le cause possono essere primitive (genetiche) o secondarie con la premessa che non c'è una soglia naturale tra valori normali e alterati di lipidi e non esiste alcuna definizione numerica di dislipidemia. Nello specifico non c'è una soglia naturale tra valori normali e alterati di lipidi, perché i loro livelli sono rappresentati da una scala continua. Esiste probabilmente un rapporto lineare tra i livelli di lipidi e il rischio CV, cosicché molti soggetti con colesterolemia normale traggono benefici dal raggiungimento di livelli ancora più bassi. Di conseguenza, non esiste alcuna definizione numerica di dislipidemia<sup>(10)</sup>.

La predisposizione genetica rappresenta la principale causa responsabile delle dislipidemie. 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<sup>(27)</sup>. Le dislipidemie più gravi hanno eziologia monogenica e un'analisi genetica può essere utile per completare la diagnosi. Nei pazienti geneticamente suscettibili, fattori secondari quali lo stile di vita, il quadro clinico e la terapia medica, possono amplificare il rischio d'insorgenza di una dislipidemia. Un'anamnesi accurata oltre all'esame obiettivo e ad analisi chimico-cliniche sono fondamentali per una diagnosi corretta e per impostare una strategia terapeutica appropriata.

La classificazione classica delle iperlipoproteinemie in 5 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. La classificazione delle dislipidemie si basa su cause genetiche e secondarie che contribuiscono all'alterato profilo lipidico del paziente<sup>(28)</sup>. La maggior parte delle dislipidemie è causata dalla combinazione di fattori genetici e non genetici. L'identificazione di fattori secondari è rilevante al fine di una corretta diagnosi, prognosi e trattamento. In tutti i pazienti con dislipidemia si devono prendere in considerazione le cause primarie o genetiche e si devono escludere le cause secondarie<sup>(29)</sup>.

Un sistema più pragmatico classifica le dislipidemie come primarie o secondarie e le caratterizza per:

- Incrementi solo del colesterolo (ipercolesterolemia pura o isolata)
- Incrementi solo dei TG (ipertrigliceridemia pura o isolata),
- Incrementi sia del colesterolo che dei TG (iperlipidemie miste o combinate)

I pazienti possono presentare una combinazione di queste alterazioni lipidiche.

Attualmente la dislipidemia viene accertata e classificata in base al profilo lipidico alterato che risulta dalla combinazione di fattori genetici e secondari. Per variazioni lievi o moderati dei parametri lipidici rispetto ai valori normali, l'eziologia è la risultante della combinazione di una base poligenica associata ad uno o più

fattori secondari. Per alterazioni lipidiche più severe, la probabilità di un'etiologia monogenica risulta plausibile e deve essere circondata da alcune caratteristiche cliniche<sup>(30)</sup> (Tabella 2).

**Tabella 2.** Caratteristiche cliniche delle dislipidemie monogeniche

Segni e sintomi	Principale alterazione lipidica estrema (archetipo di malattia monogenica)			
	↑ (FH)	↑ (FLPLD)	↑ TG (FDBL)	↓ HDL (TD, LCATD)
<b>Generali</b>				
Ritardo di crescita	--	++	-	-
<b>Sistema cardiovascolare</b>				
Aterosclerosi precoce				
Coronarico, angina Sindrome coronarica acuta, infarto del miocardio	++	+/-	++	+/-
Cerebrovascolare: ictus, ischemico transitorio, amaurosi fugace, ictus	+	+/-	+	+/-
Vascolare periferico: claudicatio	+	+/-	++	+/-
Soffi arteriosi	+	-	+	-
Malattia valvolare aortica	+	-	-	-
<b>Sistema cardiovascolare</b>				
Xantelasma	++	-	-	-
Arco corneale	++	-	-	-
Lipemia retinalis	-	++	-	-
Opacità corneali	-	-	-	++
<b>Sistema gastrointestinale</b>				
Dolore addominale, nausea, vomito	-	++	-	-
Epatosplenomegalia, steatoepatite	-	++	-	-
Pancreatite	-	++	-	++
<b>Renale</b>				
Proteinuria	-	-	-	+
Insufficienza renale	-	-	-	+
<b>Sistema muscoloscheletrico</b>				
Xantomi tendinei	++	-	-	+
<b>Sangue</b>				
Emazie a bersaglio	-	-	-	++
<b>Xantomi</b>				
Tendini estensori	++	-	-	+
Tuberosi	+/-	-	++	-
Plantari	+/-	-	++	-
Palmar	+/-	-	++	-
Periostali	+	-	-	-
Perirotulei	+	-	-	-
Intracranici	+	-	-	-
Eruttivi	-	++	-	-
Piaghe interdigitali	+/-	-	-	+

**FH:** ipercolesterolemia familiare; **FLPLD:** deficit familiare di lipasi lipoproteica; **FDBL:** disbetalipoproteinemia familiare; **LCATD:** deficit di lecitina-colesterolo aciltransferasi; **TD:** malattia di Tangier; **TG:** trigliceridi.

**++:** la caratteristica è tipica della dislipidemia non si osserva costantemente nei soggetti con dislipidemia; **++:** la caratteristica è nettamente e costantemente presente nei soggetti con dislipidemia; **-:** la caratteristica non fa parte della presentazione clinica della dislipidemia; **+/-:** la caratteristica si osserva talvolta nei soggetti con dislipidemia, ma non è considerata tipica della sindrome.

Non sempre in una dislipidemia severa si risale ad una causa monogenica ed il fenotipo risulta dall'associazione di un quadro poligenico con fattori secondari<sup>(31)</sup>. Sulla base di queste premesse, è opportuno escludere forme secondarie sia da un punto di vista clinico, sia mediante indagini di laboratorio (Tabelle 3 e 4).

## Dislipidemie secondarie

### *Cause secondarie di dislipidemia*

Le cause secondarie di dislipidemia sono attribuibili a specifici stili di vita e ambientali (Tabella 3), a diverse condizioni cliniche e ad alcune terapie mediche (Tabella 4). Queste cause devono essere considerate per una corretta diagnosi e per un'appropriatezza strategica terapeutica<sup>(10)</sup>.

In generale, una dislipidemia associata a cause secondarie migliora anche se non potrebbe risolversi dopo il trattamento o l'eliminazione dei fattori associati e la

**Tabella 3.** Fattori secondari dello stile di vita e condizioni mediche associate a dislipidemia

Fattori di stile di vita e condizioni mediche	Principale alterazione lipidica associata		
	LDL	TG	HDL
<b>Stile di vita</b>			
Obesità			
Inattività fisica	X	X	X
Eccessiva assunzione di alcol	X	X	X
Fumo		X	X
Malattia valvolare aortica			
<b>Alimentazione</b>			
Alto contenuto di grassi trans	X		
Alto contenuto di grassi saturi	X		
Alto contenuto di carboidrati		X	X
<b>Condizioni mediche</b>			
Epatopatia ostruttiva	X		
Ipotiroidismo	X		
Sindrome nefrosica	X		
Anoressia	X		
Sindrome metabolica		X	X
Insulino-resistenza		X	X
Diabete mellito		X	X
Steatosi epatica non alcolica		X	X
Insufficienza renale cronica		X	X
Sindrome di Cushing		X	X
Infezione da HIV		X	X
Lupus eritematoso sistemico		X	X

TG: trigliceridi

**Tabella 4.** Farmaci associati a dislipidemia

Farmaci	Aumento del colesterolo LDL	Aumento dei trigliceridi	Diminuzione del colesterolo HDL
Ciclosporina	X		
Amiodarone	X		
Clortalidone ad alto dosaggio	X		
Idroclorotiazide	X		
Rosiglitazone	X		
Fibrati	X		
Estrogeni orali		X	
Tamoxifene		X	
Corticosteroidi		X	X
$\beta$ -bloccanti		X	X
Retinoidi		X	X
Inibitori delle proteasi ( <i>soprattutto ritonavir</i> )		X	X
Resine leganti gli acidi biliari		X	X
Sirolimus		X	X
L-asparaginasi		X	X
Agenti antipsicotici atipici		X	X
Insufficienza renale cronica		X	X
Sindrome di Cushing		X	X
Infezione da HIV		X	X
Lupus eritematoso sistemico		X	X

dislipidemia residua richiederà una terapia ipolipidemizzante. La maggior parte delle cause secondarie può essere scoperta da un'approfondita anamnesi medica ed esame obiettivo. Dovranno essere eseguiti esami di laboratorio aggiuntivi quali la funzionalità epatica per la steatosi epatica e l'epatopatia ostruttiva, la glicemia a digiuno o l'intolleranza al glucosio per il diabete, i test di funzionalità tiroidea per le anomalie tiroidee ed un'analisi delle urine compresi i livelli ematici di creatinina e di azoto ureico per le nefropatie (Tabella 5).

Errati stili di vita sono cause secondarie comuni nei pazienti dislipidemici <sup>(10,32)</sup>. La modificazione dello stile di vita e il cardine del trattamento e comprende:

1) modificazioni della dieta per ridurre i grassi saturi trans e i carboidrati semplici.

La più importante causa secondaria della dislipidemia nei Paesi sviluppati è uno stile di vita sedentario associato a un eccessivo apporto dietetico di calorie totali, grassi saturi, colesterolo e grassi trans. I grassi trans sono acidi grassi polinsaturi o monoinsaturi cui sono stati aggiunti atomi d'idrogeno; sono utilizzati in alcuni cibi processati e sono aterogeni come i grassi saturi e sono associati ad un aumento del colesterolo LDL. Altrettanto negative le diete ad elevato contenuto di carboidrati (>60% di energia), ed in particolare di carboidrati semplici ad alto indice glicemico

2) raggiungimento e mantenimento del peso corporeo ideale attraverso opportune modifiche della dieta ed attività fisica.

**Tabella 5.** Indagini per le cause secondarie di dislipidemia

Causa secondaria	Indagini
Insufficienza renale cronica	Creatinina
	Urea
Diabete e insulino-resistenza	Glicemia a digiuno
	Emoglobina A1c
	Considerare l'insulina sierica o il peptide C
Ipotiroidismo	TSH
Sindrome nefrosica	Analisi delle urine
Epatopatia ostruttiva	Aspartato aminotransferasi
	Alanina aminotransferasi
	Bilirubina totale
	Fosfatasi alcalina

3) riduzione o eliminazione del consumo di alcoolici;

4) modificazione dei fattori di rischio CV compreso la cessazione del fumo, il controllo della glicemia e della pressione arteriosa.

Tra le condizioni mediche (Tabella 3) è importante ricordare che nei pazienti obesi la dislipidemia è associata sia ad un aumentati livelli di colesterolo LDL ma anche ad elevati livelli di TG e bassi livelli di HDL una volta che il paziente sviluppa insulino resistenza.

Elevati livelli di colesterolo sono presenti nei pazienti con ipotiroidismo, sindrome nefrosica, epatopatia ostruttiva e anoressia nervosa. Al contrario, elevati livelli di TG e ridotti livelli di HDL sono tipici della sindrome metabolica, dell'insulino resistenza e del diabete di tipo 2.

La steatosi epatica e la steatoepatite sono spesso associate ad elevati livelli di TG e bassi livelli di HDL. Infine nella sindrome di Cushing e nella sindrome dell'ovaio policistico si osservano elevati livelli di TG e bassi livelli di HDL<sup>(33)</sup>.

Il diabete è una causa secondaria particolarmente rilevante, perché i soggetti affetti tendono ad avere un'associazione aterogena di TG elevati, alti livelli di frazioni di LDL piccole e dense e bassi livelli di HDL (dislipidemia diabetica, ipertrigliceridemia, iperapob). I pazienti affetti da diabete di tipo 2 sono particolarmente a rischio. Tale associazione può essere una conseguenza dell'obesità, dello scarso controllo del diabete, o di entrambi, che possono aumentare gli acidi grassi circolanti, portando all'aumento della produzione epatica VLDL.

Le VLDL ricche in TG cedono successivamente TG e colesterolo alle LDL e alle HDL, promuovendo la formazione delle LDL piccole, dense e ricche in trigliceridi e l'eliminazione delle HDL ricche in TG. La dislipidemia diabetica è spesso peggiorata dall'elevato apporto calorico e dall'inattività fisica che caratterizzano le abitudini di vita di numerosi pazienti con diabete di tipo 2.

Le donne affette da diabete possono avere un rischio aumentato di cardiopatia come risultato di questa forma di dislipidemia<sup>(34)</sup>.

Indipendentemente dalla causa e dal grado di deficit della funzione renale, i pazienti con malattia renale cronica presentano significative ed importanti alterazioni del metabolismo lipidico. La dislipidemia osservata in questi pazienti infatti, fino dagli

stadi iniziali della malattia ed in misura sempre maggiore quanto più elevata è la proteinuria e maggiore la riduzione della filtrazione glomerulare, si caratterizza per alterazioni quantitative e qualitative delle lipoproteine, degli enzimi lipolitici e dei recettori delle lipoproteine.

Con il progredire della disfunzione renale, si osserva invariabilmente un aumento dei TG ed una riduzione delle HDL, mentre le LDL non manifestano modificazioni quantitative rilevanti, con la eccezione di quanto osservato nelle nefropatie intensamente proteinuriche e nella sindrome nefrosica. Tuttavia, anche in presenza di LDL normali o ridotte, si assiste ad una progressiva modificazione qualitativa di queste con aumento delle LDL aterogene “piccole e dense” e delle LDL ossidate. Negli stadi più evoluti della malattia renale si osserva una riduzione delle lipoproteine contenenti ApoA ed un aumento delle lipoproteine ApoB ricche in trigliceridi. Il profilo lipidico della malattia renale cronica ha in definitiva caratteristiche molto simili, e condivide un analogo profilo di rischio aterosclerotico, a quello osservato nel diabete mellito di tipo 2, nella sindrome metabolica e nella obesità, condizioni queste tutte associate ad insulino resistenza e responsabili di una elevata predisposizione a sviluppare un danno renale<sup>(35)</sup>.

La dislipidemia rappresenta una parte integrante del quadro laboratoristico della sindrome nefrosica, anche se non è intuitivamente chiaro il meccanismo attraverso cui un'alterazione della barriera di filtrazione glomerulare e la conseguente proteinuria influiscano così profondamente sul metabolismo lipidico. Il profilo lipidico dei pazienti nefrosici è caratterizzato da un aumento di colesterolo totale, TG e fosfolipidi, con valori immodificati di colesterolo HDL. Per quanto riguarda il quadro lipoproteico, si riscontra un aumento di LDL, VLDL e IDL, senza variazioni o con una riduzione di HDL; si viene quindi a creare un aumento del rapporto colesterolo LDL/HDL ad impronta spiccatamente aterogena. Accanto alle variazioni quantitative appena menzionate, se ne osservano anche di qualitative. La quantità di colesterolo, esteri del colesterolo e FL, rispetto al contenuto in TG e proteine, risulta aumentata in ciascuna frazione lipoproteica. Le apolipoproteine B e CIII risultano aumentate, mentre non varia la concentrazione di apoAI, AII e CII. Per quanto riguarda gli enzimi che intervengono nella regolazione del metabolismo lipidico, è pressoché unanimemente descritta una riduzione di lipoproteinlipasi (LPL) del 30-60% e LCAT. Quest'ultima, infatti, viene eliminata nelle urine.

Elevati livelli di TG e bassi livelli di colesterolo HDL sono una caratteristica dei pazienti affetti da HIV che può amplificarsi in corso di terapia con antiretrovirali inibitori della proteasi, in particolare ritonavir. Anche l'infiammazione cronica causata da condizioni autoimmunitarie sistemiche e le paraproteinemie sono associate ad elevati livelli di TG e basse HDL.

Il trattamento della condizione medica alla base della dislipidemia secondaria può avere un effetto positivo sulla dislipidemia<sup>(32,36)</sup>.

Numerosi sono i farmaci che possono causare una dislipidemia (Tabella 4). L'effetto sulla dislipidemia potrebbe essere marcato nel caso di predisposizione genetica del paziente.

Tra i farmaci responsabili di una dislipidemia iatrogena vanno ricordati gli immunosoppressori per la terapia antirigetto del trapianto, i beta-bloccanti, gli ormoni steroidei, farmaci biologici quali antagonisti dell'interleukina 6 (tocilizumab).

In Tabella 6 un algoritmo per l'identificazione delle dislipidemie secondarie.

**Tabella 6.** Algoritmo per l'identificazione delle dislipidemie secondarie

	<b>Causa secondaria</b>	<b>Indagini</b>
<b>1</b>	Definizione del fenotipo lipoproteico	Colesterolemia totale, colesterolemia LDL, colesterolemia HDL, trigliceridemia
<b>2</b>	Identificazione delle principali forme secondarie	Creatininemia, valutazione del profilo glicemico, valutazione funzionalità tiroidea, transaminasi, fosfatasi alcalina, $\gamma$ GT, bilirubinemia (Tabella 3), terapia farmacologica (Tabella 4)
<b>3</b>	Indagine familiare	Positività per eventi cardiovascolari precoci nei familiari di primo grado e valutazione della dislipidemia nei familiari affetti
<b>4</b>	Stratificazione del rischio cardiovascolare	Presenza di comorbidità

**LDL:** low density lipoproteins, **HDL:** high density lipoproteins



# Il ruolo patogenetico dei lipidi nella malattia cardiovascolare



Angela Pirillo, Alberico L. Catapano

## Introduzione

Nonostante i notevoli progressi nelle terapie farmacologiche, le malattie cardiovascolari (CV) rappresentano ancora la principale causa di morte nei paesi industrializzati e stanno diventando tra le principali cause di mortalità e morbilità anche nei paesi in via di sviluppo<sup>(37)</sup>. Le dislipidemie rappresentano uno dei principali fattori di rischio per la malattia coronarica e l'osservazione di Virchow più di 100 anni fa che l'ateroma conteneva una sostanza successivamente identificata come colesterolo suggeriva già un ruolo dei lipidi nella patogenesi dell'aterosclerosi.

La lesione aterosclerotica si sviluppa attraverso il processo di accumulo e ritenzione di lipoproteine aterogene contenenti apolipoproteina B (apoB) (soprattutto lipoproteine a bassa densità, o LDL) nell'intima della parete arteriosa. In seguito a ritenzione delle LDL, si innesca un processo infiammatorio a cascata con attivazione dell'endotelio, richiamo di monociti e di altre cellule immunitarie dal sangue, produzione di citochine pro-infiammatorie e di specie reattive dell'ossigeno in grado di modificare le LDL; i monociti si differenziano in macrofagi, accumulano LDL modificate grazie all'espressione di specifici recettori sulla superficie e producono, insieme ad altre cellule infiammatorie, sostanze in grado di richiamare cellule infiammatorie dal sangue e cellule muscolari lisce dalla tunica media, portando alla progressione della placca aterosclerotica. In tutte le fasi dell'aterosclerosi, dall'attivazione dell'endotelio alla formazione della placca aterosclerotica, i lipidi svolgono un ruolo fondamentale. Tuttavia, non solo le LDL, ma anche altre lipoproteine contenenti apoB, quali i *remnants* di lipoproteine a bassissima densità (*very low density lipoproteins*, VLDL) e chilomicroni, e lipoproteina(a) [Lp(a)] sembrano avere un ruolo causale nello sviluppo dell'aterosclerosi e della malattia CV ischemiche.

Infatti, nonostante il trattamento con un'ottimale terapia ipocolesterolemizzante riduca significativamente i livelli di LDL e il rischio CV, molti pazienti continuano a subire eventi CV, fenomeno definito "rischio residuo". L'evidenza clinica suggerisce che il rischio CV residuo osservato in pazienti con livelli ottimali di LDL può essere in parte spiegato da altri fattori di rischio lipidico, inclusi Lp(a) e i *remnants* derivanti dal metabolismo di lipoproteine ricche di trigliceridi (TG)<sup>(38)</sup>. In generale, i livelli di apoB, che danno una stima del numero di lipoproteine aterogene (ogni lipoproteina contiene una sola molecola di apoB) e di non-HDL colesterolo, che ricapitolano il contenuto di colesterolo di tutte le lipoproteine aterogeniche contenenti apoB, inclusi i *remnants*,

sono un predittore migliore del rischio CV rispetto ai livelli di LDL. A supporto di queste osservazioni, studi di randomizzazione mendeliana hanno suggerito che il beneficio clinico dell'abbassamento del colesterolo LDL può essere meglio spiegato dalla riduzione assoluta delle lipoproteine contenenti apoB<sup>(15)</sup>.

Obiettivo di questo capitolo è discutere il ruolo dei lipidi e delle lipoproteine nella patogenesi dell'aterosclerosi, nonché il ruolo nella valutazione del rischio e come bersagli della terapia.

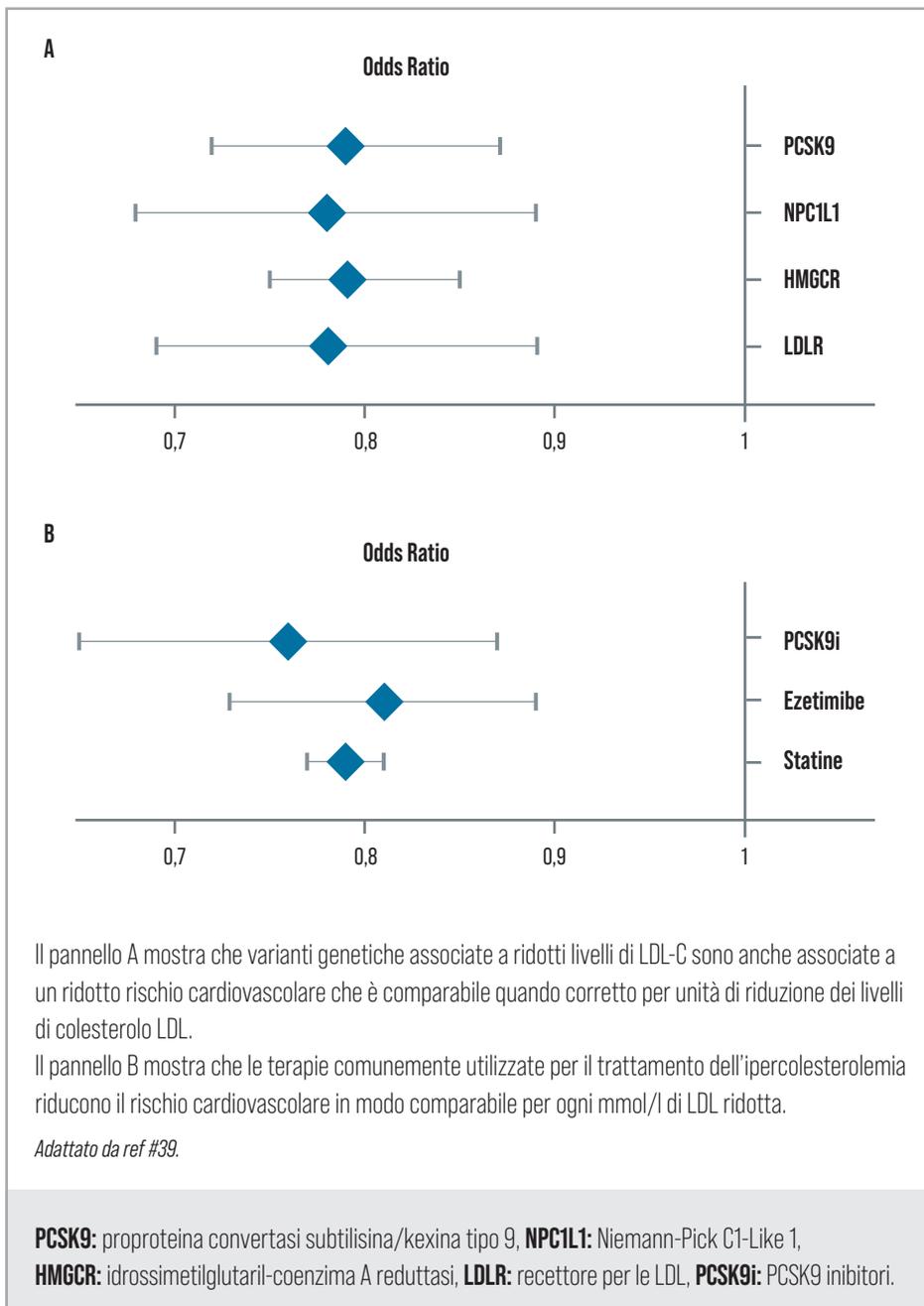
## LDL

Tra i fattori di rischio più rilevanti nella patogenesi delle malattie CV ischemiche (*atherosclerotic cardiovascular disease*, ASCVD), l'ipercolesterolemia è certamente quello più studiato. In particolare, elevati livelli di colesterolo LDL sono causalmente associati allo sviluppo di ASCVD. Questa relazione causale è determinata dalla capacità delle LDL (che sono le lipoproteine aterogene più abbondanti nel plasma) di penetrare attraverso il sottile strato endoteliale e infiltrarsi nell'intima della parete arteriosa. In presenza di elevate concentrazioni plasmatiche di colesterolo LDL, le LDL vengono ritenute più facilmente nell'intima, dove complessi meccanismi cellulari ed extracellulari innescano il processo di formazione e progressione della placca aterosclerotica. Le LDL non sono una classe omogenea di lipoproteine, ma possono essere suddivise in sottoclassi con caratteristiche fisico-chimiche, metaboliche e funzionali differenti. Molti fattori possono intervenire a modificare la distribuzione delle sottoclassi di LDL, e in particolari condizioni metaboliche alcune sottoclassi possono diventare rilevanti nell'innescare il processo aterosclerotico. Tra le sottoclassi di LDL, particolare interesse rivestono le LDL piccole e dense (*small dense LDL*, sdLDL): date le loro dimensioni possono penetrare lo strato endoteliale più facilmente rispetto alle sottoclassi di dimensioni maggiori, hanno un'affinità minore per il recettore per le LDL (LDLR, finemente regolato dal contenuto intracellulare di colesterolo), un'affinità maggiore per recettori non regolati, una maggiore affinità per i proteoglicani presenti nella parete arteriosa (che determina quindi un maggior tempo di ritenzione), una maggiore suscettibilità alla modificazione. Elevati livelli di sdLDL sono presenti in alcune condizioni quali il diabete, caratterizzato dalla cosiddetta dislipidemia aterogena che comprende anche elevati livelli plasmatici di TG e bassi livelli di HDL (mentre i livelli di LDL sono generalmente nella norma o addirittura ridotti).

Numerose evidenze genetiche, epidemiologiche e cliniche hanno inequivocabilmente stabilito il ruolo causale delle LDL nel processo aterosclerotico.

L'ipercolesterolemia familiare (*familial hypercholesterolemia*, FH) è una patologia genetica ereditaria causata da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo delle LDL (LDLR, APOB, PCSK9, LDLRAP1) che determinano elevati livelli di LDL fin dalla nascita, con conseguente aumento del rischio CV e comparsa di eventi CV anche in età molto precoce. La forma più comune di FH è quella eterozigote (~1:250), causata da una mutazione presente in uno solo degli alleli; la più rara forma omozigote (1:300.000), causata da mutazioni in entrambi gli alleli, presenta un fenotipo più severo, con livelli plasmatici di LDL molto elevati (>500 mg/dL) e la comparsa di eventi CV anche in giovanissima età. Accanto a queste mutazioni che si associano a variazioni molto significative dei livelli di LDL, esistono numerose altre varianti geniche che possono influenzare i livelli di colesterolo LDL. Studi di randomizzazione mendeliana

hanno dimostrato che varianti in oltre 50 geni associate a ridotti livelli di LDL sono anche associate a un ridotto rischio CV, proporzionale all'entità di riduzione dei livelli circolanti di LDL: varianti nei geni che codificano per l'enzima idrossimetilglutaril-coenzima A (HMGCoA, il *target* delle statine) reductasi, Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1, *target* di ezetimibe) o proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9, *target* dei PCSK9 inibitori) sono associate alla stessa entità di riduzione del rischio CV per unità di riduzione dei livelli di LDL (Figura 1). Questa osservazione, se da un lato conferma il ruolo causale delle LDL in ASCVD, dall'altra indica che la riduzione del rischio CV è essenzialmente mediata dalla riduzione dei livelli di LDL, indipendentemente dai meccanismi di riduzione<sup>(39)</sup>.



**Figura 1.** Effetto della riduzione dei livelli di LDL-C sulla malattia ischemica

Numerose metanalisi di studi epidemiologici, studi di randomizzazione mendeliana e studi clinici randomizzati hanno riportato in modo consistente un'associazione log-lineare tra i livelli plasmatici di colesterolo LDL e il rischio CV, fornendo un'ulteriore conferma all'evidenza che i livelli plasmatici di LDL si associano in modo dose-dipendente al rischio CV<sup>(39)</sup>. Infine, numerosissimi studi clinici randomizzati hanno dimostrato l'effetto favorevole di terapie ipocolesterolemizzanti, basate su differenti meccanismi di azione, sul rischio CV.

Grazie allo sviluppo di farmaci ipocolesterolemizzanti sempre più efficaci, molti pazienti trattati riescono a raggiungere livelli plasmatici di LDL molto bassi (<30 mg/dL), e l'evidenza suggerisce che riducendo i livelli di LDL anche a valori così ridotti il rischio CV continua a ridursi in modo lineare, senza una soglia al di sotto della quale il beneficio non sia più presente. Queste osservazioni hanno portato all'introduzione, nelle più recenti linee guida europee per il trattamento delle dislipidemie<sup>(10)</sup>, di raccomandazioni con livelli di LDL sempre più bassi, soprattutto per i pazienti a rischio molto alto, per i quali è raccomandato un goal di LDL <55 mg/dL (associato ad almeno il 50% di riduzione) e addirittura <40 mg/dL per quei pazienti ad altissimo rischio che hanno un secondo evento CV ischemico entro due anni dal primo. Ad oggi, non esistono evidenze di una associazione tra livelli molto bassi di LDL e effetti clinici avversi<sup>(40)</sup>, anche se rimane indispensabile continuare studi osservazionali a lungo termine per monitorare la sicurezza della riduzione del colesterolo a valori molto ridotti.

## HDL

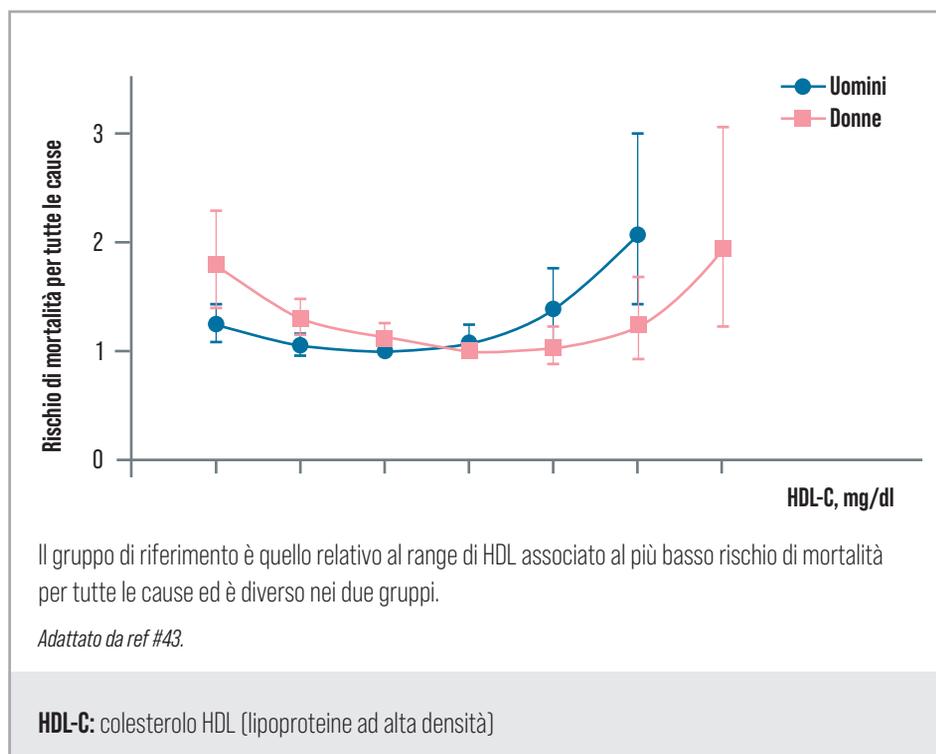
Le HDL sono una classe di lipoproteine altamente eterogenee per dimensioni, forma, carica e composizione lipidica e proteica. Le HDL, infatti, sono sottoposte a un continuo processo di rimodellamento grazie all'attività di numerosi fattori plasmatici. Alle HDL vengono attribuite una serie di proprietà potenzialmente protettive dal punto di vista CV. La più studiata è la capacità delle HDL di mediare il trasporto inverso del colesterolo in eccesso dai tessuti periferici (ed in particolare dai macrofagi presenti nell'intima della parete arteriosa) al fegato per l'escrezione; questo parametro è un predittore inverso del rischio CV, indipendentemente dai livelli di HDL e apoA-I<sup>(41)</sup>. Le HDL possiedono anche altre proprietà potenzialmente atero-protettive, tra cui attività anti-infiammatoria, anti-ossidante e anti-trombotica.

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato una relazione inversa tra i livelli di colesterolo HDL e il rischio CV facendo ipotizzare che trattamenti farmacologici in grado di aumentare i livelli circolanti di HDL avrebbero dovuto associarsi a una riduzione del rischio CV. Questa associazione inversa, tuttavia, non ha trovato riscontro negli studi clinici che hanno valutato l'efficacia di diversi farmaci in grado di aumentare anche in modo consistente i livelli di HDL: i CETP inibitori, che aumentano anche in modo sostanziale i livelli di HDL, non si sono mostrati efficaci nel ridurre gli eventi CV, con l'eccezione di uno studio in cui, tuttavia, l'effetto positivo è stato attribuito alla riduzione dei livelli di non-HDL (quindi alla riduzione dei livelli di lipoproteine aterogene contenenti apoB) più che all'aumento di HDL. Anche l'utilizzo di acido nicotinico non ha mostrato alcun effetto di riduzione del rischio CV, mettendo così in dubbio il ruolo protettivo delle HDL.

A supporto di questa evidenza, studi di randomizzazione mendeliana hanno dimostrato che varianti genetiche associate esclusivamente ad aumentati livelli plasmatici di

HDL (e che quindi non influenzano i livelli di LDL o di TG) non riducono il rischio di infarto del miocardio <sup>(42)</sup>. Più recentemente è stata riportata una relazione a “U” tra livelli di HDL e mortalità, che indica che soggetti con livelli estremamente bassi o estremamente elevati di HDL hanno un maggiore rischio di mortalità rispetto a soggetti con valori moderatamente elevati (Figura 2) <sup>(43)</sup>. La concentrazione di HDL-C associata al più basso rischio di mortalità è risultata di 73 mg/dL (54-77) negli uomini e 93 mg/dL (69-97) nelle donne <sup>(43)</sup>. Quali siano le ragioni di questa inattesa associazione tra livelli molto alti di HDL e mortalità non è ancora del tutto chiaro. È plausibile che, più che le concentrazioni plasmatiche di HDL, siano le caratteristiche funzionali delle particelle HDL a giocare un ruolo predominante: la presenza di elevati livelli plasmatici di colesterolo HDL in molti studi è risultata associata alla presenza di particelle HDL molto grandi che possono essere meno efficienti nel promuovere il trasporto inverso del colesterolo e addirittura possono avere un'attività pro-aterogena anziché protettiva. Inoltre, condizioni quali l'infiammazione cronica (tipica dell'aterosclerosi) o il diabete possono indurre modificazioni nella struttura e nella composizione delle HDL, influenzando in modo negativo la loro funzionalità.

Questa osservazione ha spostato l'attenzione da terapie in grado di aumentare i livelli di HDL (che si sono rivelate clinicamente inefficaci) a potenziali agenti in grado di aumentare la funzionalità delle HDL anziché i livelli di colesterolo HDL. Ad esempio CER-001 è un HDL-mimetico composto da apoA-I ricombinante e fosfolipidi che mima le pre-β HDL, le più piccole ed efficienti particelle HDL in termini di efflusso di colesterolo. Nonostante studi iniziali abbiano mostrato un'aumentata capacità del plasma di indurre efflusso di colesterolo in seguito a trattamento con CER-001, e studi di *imaging* abbiano mostrato un effetto benefico sul *burden* della placca e



**Figura 2.** Rischio di mortalità per tutte le cause in base ai livelli di colesterolo HDL in uomini e donne della popolazione generale

sull'infiammazione in pazienti con dislipidemia genetica, il trattamento con CER-001 per 10 settimane non ha prodotto alcuna regressione dell'aterosclerosi coronarica in pazienti con sindrome coronarica acuta e in terapia con statine. Una possibile spiegazione è legata al fatto che il trattamento con statine induce già una regressione della placca che non può essere ulteriormente ridotta dal trattamento con CER-001 <sup>(44)</sup>. Sulla base di tutte queste osservazioni, ad oggi non ci sono indicazioni per l'utilizzo di farmaci in grado di aumentare i livelli di HDL per ridurre il rischio CV.

## Lipoproteine ricche in trigliceridi

I TG sono per lo più trasportati in circolo nei chilomicroni (prodotti dall'intestino) e dalle VLDL, prodotte dal fegato. Una volta raggiunti i tessuti periferici (es. muscoli e tessuto adiposo), i TG vengono idrolizzati dalla lipoproteina lipasi (LPL) e rilasciano acidi grassi liberi che vengono utilizzati per produrre energia oppure conservati all'interno della cellula. Questo processo genera chilomicroni *remnants*, che vengono trasportati al fegato e degradati, e VLDL *remnants*, da cui si generano le LDL. Durante il processo di degradazione a *remnants*, sia chilomicroni che VLDL si arricchiscono in apoE, che svolge un ruolo importante nell'*uptake* epatico dei *remnants*. I *remnants* svolgono un ruolo importante nell'aterogenesi in quanto possono determinare disfunzione endoteliale, infiammazione vascolare e formazione di cellule schiumose nella parete arteriosa.

Storicamente, la relazione tra TG e malattia CV è stata controversa. Infatti, elevati livelli di TG spesso si associano a riduzione nei livelli di HDL e aumento dei livelli di colesterolo non-HDL, apoCIII e LDL piccole e dense (le più aterogene), generando confusione nel definire un'associazione causale. Più chiaro sembra invece il concetto che non tanto i TG in sé, quanto il contenuto di colesterolo delle lipoproteine ricche in TG possa contribuire al rischio CV. Infatti è stato dimostrato che elevati livelli di colesterolo *remnant* si associano a aumentato rischio di malattia CV ischemica <sup>(45)</sup>, infarto del miocardio <sup>(46)</sup>, ictus ischemico <sup>(47)</sup> e mortalità per tutte le cause <sup>(48)</sup> nella popolazione generale.

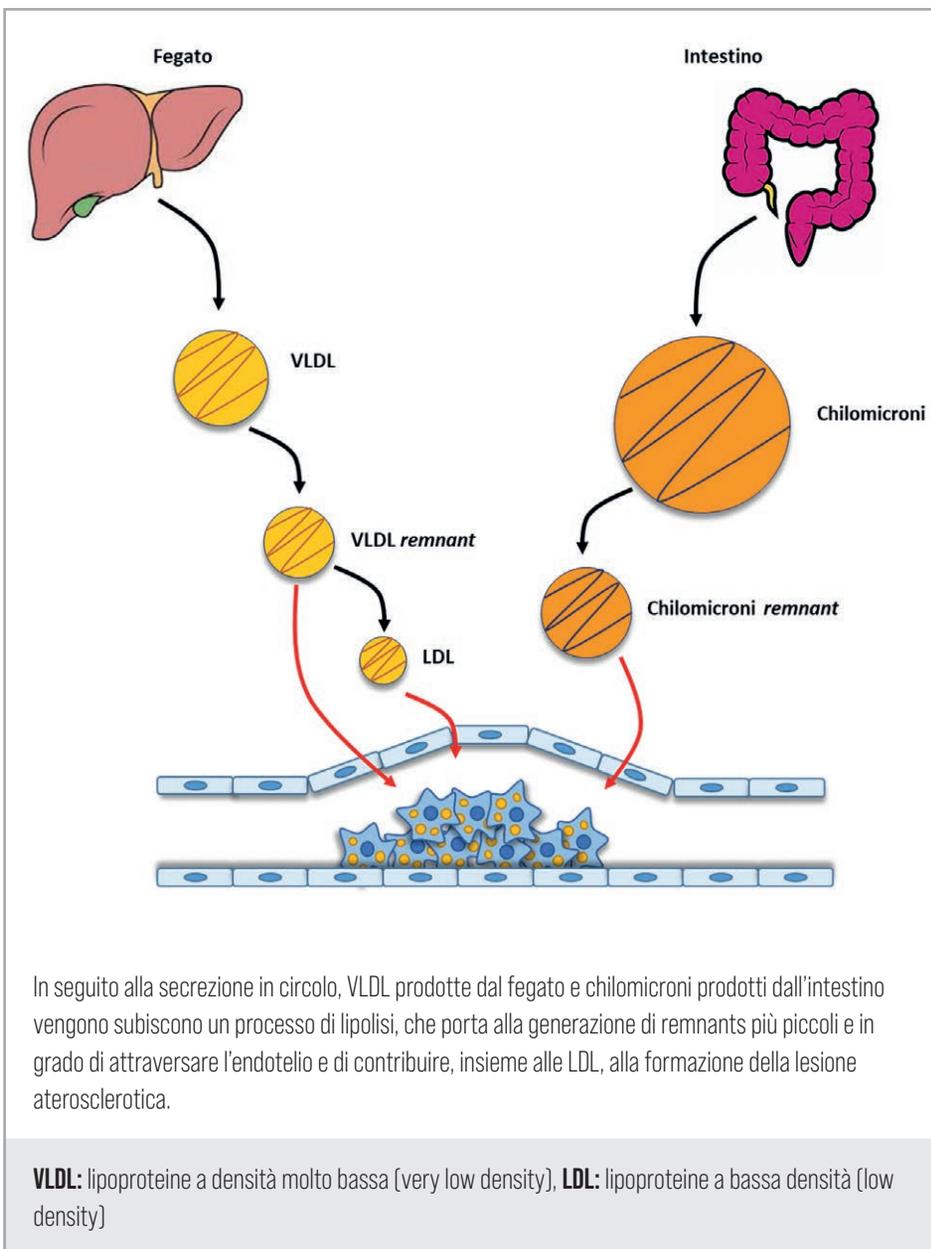
I livelli plasmatici di *remnants* sono in parte determinati geneticamente, in parte determinati da fattori modificabili quali dieta, obesità, assunzione di alcol e attività fisica. Varianti in diversi geni sono infatti in grado di influenzare i livelli di TG, e quindi di colesterolo *remnant*; tra questi geni, i più importanti sono LPL, APOC2, APOA5, LMF1 e GPIHBP1.

Molte varianti geniche associate ad elevati livelli di colesterolo *remnant* si associano anche a ridotti livelli di HDL, rendendo più difficile la determinazione di un nesso di causalità dei singoli fattori con la malattia CV ischemica. Uno studio di randomizzazione mendeliana, che ha valutato varianti che influenzano solo *remnants*, *remnants* e HDL, o solo HDL, ha mostrato che le varianti associate solo con riduzione di colesterolo HDL non sono causalmente associate al rischio di malattia ischemica cardiaca, che invece è risultato associato a varianti genetiche che modificano solo i livelli di colesterolo *remnant* o che influenzano sia i livelli di colesterolo *remnant* che quelli di HDL <sup>(45)</sup>. Questa osservazione indica che elevati livelli di colesterolo *remnant* causano malattia ischemica indipendentemente dai livelli di HDL.

La ragione di questo legame causale tra colesterolo *remnant* e malattia CV è da ricercarsi nelle caratteristiche delle lipoproteine *remnants*. Infatti, i *remnants* hanno maggior contenuto in colesterolo e dimensioni ridotte rispetto alle lipoproteine native

da cui originano, quindi sono in grado di attraversare la barriera endoteliale della parete arteriosa e si accumulano nell'intima (Figura 3). Una conferma di questo meccanismo è legata all'osservazione che pazienti con sindrome di chilomicronemia familiare, una rara malattia genetica recessiva caratterizzata da mancanza di funzionalità di LPL e causata da mutazioni in geni quali LPL, apoc2, apoa5, LMF1 e GPIHBP1, presentano elevati livelli di chilomicroni (le lipoproteine di dimensioni maggiori) associati ad un elevato rischio di pancreatite, ma non hanno aumentato rischio CV.

I livelli di colesterolo *remnant* possono essere facilmente calcolati come “colesterolo totale-LDL-HDL”; tuttavia, questo semplice calcolo non può essere applicato in alcune condizioni, quali la presenza di livelli elevati di TG (>400 mg/dL) o di livelli molto bassi di LDL (che possono essere raggiunti in alcuni soggetti trattati con i più recenti ed efficaci farmaci ipocolesterolemizzanti). Idealmente, la misurazione dei livelli di



**Figura 3.** Ruolo pro-aterogeno delle lipoproteine ricche in trigliceridi

colesterolo *remnant* sarebbe più indicata, ma ad oggi manca un metodo efficace e standardizzato per la misurazione e soprattutto manca ancora una chiara definizione di cosa debba essere inteso come *remnants*.

Per ovviare a questo problema, numerosi studi hanno dimostrato che la determinazione dei livelli di colesterolo non-HDL e ancor di più di apoB rappresenta un parametro di valutazione del rischio rilevante, poiché in grado di catturare l'insieme delle lipoproteine aterogene contenenti apoB. Questo permette di identificare un aumentato rischio CV residuo anche in soggetti che, pur essendo a *target* con i livelli di LDL grazie a terapie altamente efficaci, possono ancora avere dei livelli di apoB elevati. Per questo motivo, nelle attuali linee guida europee sono stati introdotti anche dei *goal* secondari per colesterolo non-HDL e apoB per alcune categorie di soggetti caratterizzati spesso da livelli di LDL nella norma ma che presentano un profilo lipidico alterato, quali soggetti con sindrome metabolica o diabete. La dislipidemia aterogena, caratterizzata da elevati livelli di TG, bassi livelli di HDL, elevati livelli di LDL piccole e dense (le più aterogene), ma con livelli di LDL nel range di normalità o addirittura molto bassi, può essere smascherata dalla valutazione dei livelli circolanti di apoB e colesterolo non-HDL.

## Lipoproteina(a)

Lp(a) è una lipoproteina formata da una LDL in cui l'apolipoproteina B100 (apo-B100) è legata covalentemente all'apolipoproteina(a) [apo(a)] attraverso un legame disolfuro. Apo(a) è una proteina di origine epatica, che ha omologia strutturale con il plasminogeno (ma non ha attività fibrinolitica) ed è costituita da domini chiamati *kringles*; il *kringle IV* è presente in 10 tipi con sequenze differenti (KIV1-KIV10), ciascuna presente in singola copia, ad eccezione di KIV2 che può essere presente in un numero altamente variabile di ripetizioni, determinando un numero elevato di isoforme (Figura 4). Il numero di ripetizioni KIV2 è geneticamente determinato e stabilisce i livelli circolanti di Lp(a): rispetto a soggetti con isoforme di dimensioni maggiori, soggetti con isoforme di apo(a) più piccole hanno livelli circolanti di Lp(a) più elevati che si riflette in un aumentato rischio di malattia CV ischemica e ictus ischemico.

Lp(a) ha attività pro-infiammatoria, pro-aterogena e pro-trombotica. Nell'intima arteriosa, Lp(a) può essere trattenuta più avidamente delle LDL poiché si lega alla matrice extracellulare non solo attraverso apo(a), ma anche attraverso la sua componente apoB. È stato dimostrato che, nella popolazione generale, i soggetti con i livelli più elevati di Lp(a) ( $\geq 120$  mg/dL) hanno un rischio  $>3$  volte superiore di avere infarto al miocardio rispetto a soggetti con i livelli più bassi. Inoltre, elevati livelli di Lp(a) sono comuni nei soggetti con FH e sono un predittore di malattia CV indipendentemente dai livelli di LDL.

Numerosi studi clinici hanno dimostrato che un'elevata concentrazione plasmatica di Lp(a) (50 mg/dL) è un fattore di rischio indipendente per le malattie CV<sup>(49)</sup>, sia attraverso meccanismi pro-aterogeni (deposizione nell'intima arteriosa) sia attraverso meccanismi pro-trombotici (mediante l'inibizione apo(a)-mediata della fibrinolisi). I livelli di Lp(a) mostrano elevata variabilità etnica; tipicamente la distribuzione dei livelli di Lp(a) nella popolazione caucasica è disomogenea, e solo il 20% della popolazione presenta livelli  $>50$  mg/dL. I livelli plasmatici di Lp(a) sono stati associati alla progressione dell'aterosclerosi carotidea in pazienti in terapia ipolipemizzante, e varianti geniche di Lp(a) si associano a eventi CV in pazienti in terapia con statine<sup>(50)</sup>, giocando quindi un

ruolo rilevante nel rischio residuo nei pazienti in terapia con statine. Nessuno studio di intervento con farmaci ipolipemizzanti in grado di ridurre i livelli di Lp(a) del 25-35% ha mostrato un effetto di riduzione del rischio CV oltre a quello determinato dalla riduzione di LDL. Studi di randomizzazione mendeliana hanno mostrato che una riduzione geneticamente determinata di 10 mg/dL dei livelli di Lp(a) si associa a una riduzione del rischio CV pari al 5.8%, mentre una riduzione geneticamente determinata di 10 mg/dL dei livelli di LDL si associa a una riduzione del rischio CV pari al 14.5%; inoltre una riduzione assoluta di 100 mg/dL di Lp(a) ha lo stesso effetto di riduzione di 1 mmole/l di LDL (pari a 38,67 mg/dL)<sup>(51)</sup>. Questa osservazione è stata confermata da un altro studio di randomizzazione mendeliana che ha mostrato la necessità di ridurre Lp(a) di 65,7 mg/dl per avere lo stesso effetto di riduzione del rischio CV indotto dalla riduzione di 1 mmole/l di LDL<sup>(52)</sup>. Queste osservazioni spiegano il motivo per cui interventi farmacologici in grado di ridurre Lp(a) solo del 25-35% non si traducono in un beneficio clinico, e suggeriscono la necessità di sviluppare terapie in grado di ottenere una riduzione clinicamente più consistente dei livelli di Lp(a). Metodi di *gene silencing* hanno mostrato la capacità di inibire in modo selettivo la produzione di proteine *target*; a questo scopo, è stato sviluppato un oligonucleotide antisense in grado di inibire specificamente la sintesi epatica di apo(a) riducendo drasticamente i livelli circolanti di Lp(a) fino all'80% in pazienti con malattia aterosclerotica e livelli basali di Lp(a)  $\geq 60$  mg/dL ( $\geq 150$  nmol/l)<sup>(53)</sup>.

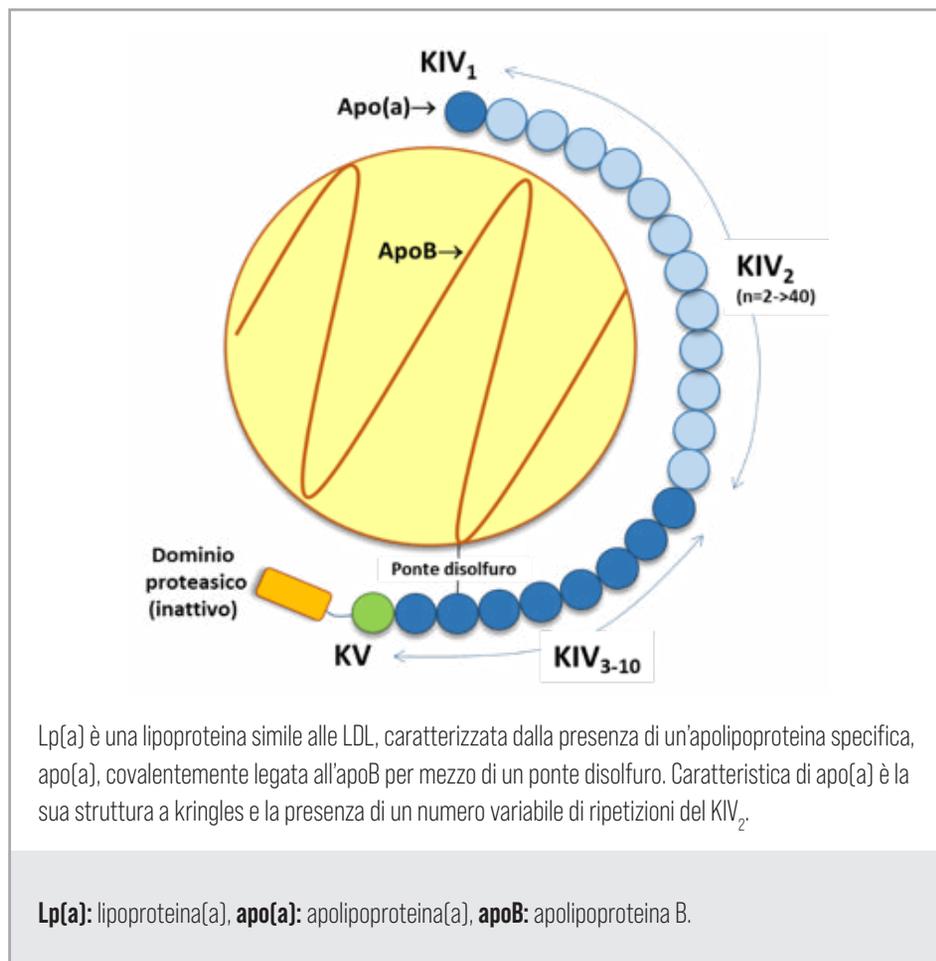


Figura 4 . Struttura della lipoproteina[a]

Uno studio di fase III attualmente in corso chiarirà se la riduzione dei livelli di Lp(a) attraverso terapia di silenziamento genico riduce gli eventi CV maggiori in pazienti ad alto rischio CV.

## Conclusioni

Un elevato numero di studi epidemiologici, genetici e clinici ha inequivocabilmente stabilito la causalità delle LDL nella malattia CV, dimostrando che la riduzione del rischio (sia relativo che assoluto) è correlata all'entità di riduzione dei livelli di colesterolo LDL, e più in generale, alla riduzione dei livelli di apoB. Questi ultimi identificano, infatti, la totalità delle lipoproteine aterogene, incluse le lipoproteine ricche in TG (*remnants*) e Lp(a), che, come le LDL, sono in grado di penetrare la barriera endoteliale dei vasi arteriosi e contribuire al processo aterosclerotico. Per quanto riguarda le HDL, nonostante siano state a lungo indicate come protettive nell'ambito dell'aterosclerosi, ad oggi non esistono indicazioni supportate da risultati di studi clinici randomizzati o genetici, suggerendo che il loro ruolo debba essere ricercato in ambiti diversi, come ad esempio nell'immunità.



# Genetica delle dislipidemie



Maurizio Averna

## Introduzione

Le modalità di trasmissione del *trait* genetico delle dislipidemie nelle famiglie sono varie; alcune dislipidemie come l'ipercolesterolemia familiare (*familial hypercholesterolemia*, FH) hanno una trasmissione co-dominante: un solo allele mutato è in grado di determinare il fenotipo clinico e biochimico; in tali famiglie la malattia è presente in ogni generazione con genitori e figli affetti in accordo con i principi della ereditarietà mendeliana. Quando, come nella sindrome chilomicronemica familiare (*familial chylomicronemia syndrome*, FCS) la modalità di trasmissione è recessiva, per l'espressione del fenotipo sarà necessaria la presenza nell'individuo affetto di entrambi gli alleli mutati ed in questo caso i genitori saranno normolipidemici. Negli ultimi anni gli studi di associazione tra varianti geniche e fenotipi lipidici, estesi a tutto il genoma (*genome-wide association study*, GWAS) e le nuove tecnologie di sequenziamento genico massivo (*next generation sequencing*, NGS) hanno fatto luce su quella che veniva definita la “*missing heritability*” cioè quella proporzione di pazienti con un fenotipo molto suggestivo di dislipidemia primaria nei quali non si riusciva ad identificare alcuna mutazione nei geni candidati. Oggi la “*missing heritability*” viene spiegata in parte da alterazioni epigenetiche ed in parte dalla eredità poligenica e cioè dal fatto che il fenotipo è determinato dal contributo di varianti di più geni, ciascuno dei quali aggiunge una piccola variazione quantitativa: più è alto il cosiddetto “*burden poligenico*” (numero di varianti geniche nello stesso individuo) maggiore sarà l'effetto quantitativo sul fenotipo (livelli di colesterolo LDL). Esistono quindi dislipidemie primarie monogeniche e poligeniche come l'ipercolesterolemia familiare poligenica e la chilomicronemia familiare multifattoriale (Tabella 1). L'evoluzione e la diffusione delle tecnologie di diagnostica molecolare ha reso la diagnosi genetica più accessibile e sempre maggiore sarà il numero di pazienti nei quali verranno identificate le mutazioni geniche responsabili del fenotipo clinico e biochimico.

## Dislipidemie monogeniche

Il sospetto di una dislipidemia ad eziologia monogenica risulta da una serie di fattori: 1) la severità dell'alterazione del quadro lipidico/lipoproteico; 2) la storia familiare di dislipidemia e di eventi cardiovascolari (CV) precoci; 3) la precocità nella comparsa di una dislipidemia; 4) caratteristiche cliniche quali segni e sintomi specifici; 5) l'assenza o la mancata identificazione di fattori secondari.

**Tabella 1.** Dislipidemie monogeniche e poligeniche

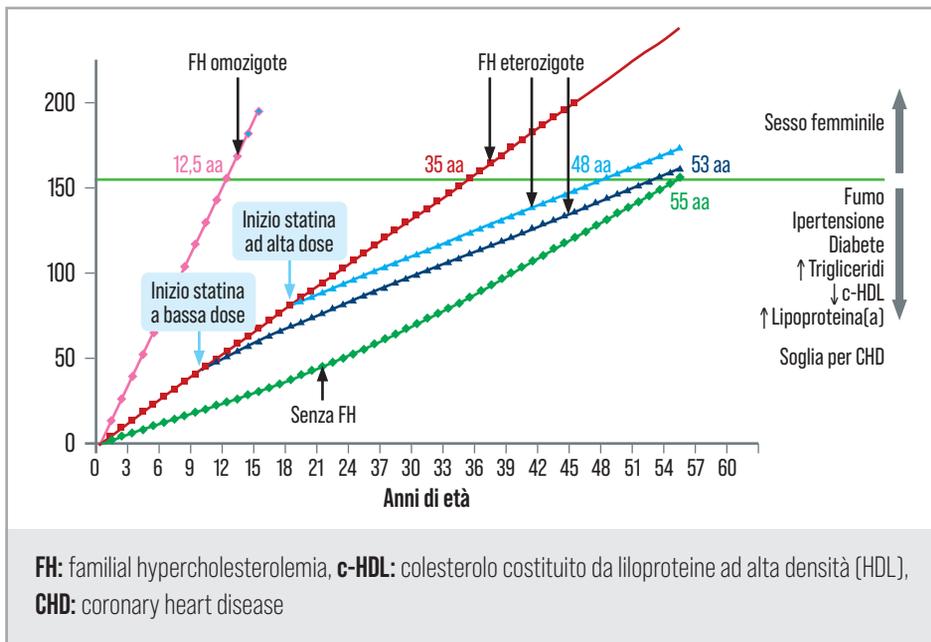
Dislipidemie monogeniche	
Aumento isolato di LDL	Ipercolesterolemia Familiare dominante (ADH) Ipercolesterolemia Familiare recessiva (ARH)
Aumento isolato di Trigliceridi	Chilomicronemia Familiare (FCS)
Aumento di Colesterolo e Trigliceridi	Disbetalipoproteinemia (FD)
Aumento isolato di Lp(a)	IperLp(a)
Dislipidemie poligeniche	
Aumento isolato di LDL	Ipercolesterolemia severa poligenica
Aumento isolato di Trigliceridi	Chilomicronemia multifattoriale (MCS) Ipertrigliceridemia familiare
Aumento di Colesterolo e Trigliceridi	Iperlipidemia familiare combinata (CHL)

L'effetto della mutazione a carico di un singolo gene risulta particolarmente penetrante per la fenotipizzazione del profilo lipidico rendendo meno rilevante il contributo di fattori secondari nelle dislipidemie monogeniche. Tuttavia, la presenza di fattori secondari può influenzare ed esacerbare il quadro clinico del paziente ed è importante la loro identificazione e controllo. Sono circa una ventina le mutazioni di singoli geni che si traducono in alterazioni a carico di specifiche proteine quali enzimi, recettori, apoproteine con conseguenti variazioni del quadro lipidico molto significative e critiche da un punto di vista clinico. Queste dislipidemie monogeniche si trasmettono secondo un carattere mendeliano autosomico dominante, codominante o recessivo. Tali sindromi sono caratterizzate sia da un profilo lipidico severamente alterato e da una serie di sintomi e segni specifici.

## Dislipidemie monogeniche con aumenti isolati di colesterolo LDL

### *Ipercolesterolemia familiare (Familial Hypercholesterolemia, FH)*

La FH è stata la prima dislipidemia ad essere stata caratterizzata dal punto di vista genetico. La familiarità della FH è stata dimostrata nel 1964 da Khachadurian *et al.*<sup>(54)</sup> e la presenza di mutazioni nel gene che codifica per il recettore delle lipoproteine a bassa densità (*low density lipoproteins*, LDL) da Goldstein e Brown nel 1976<sup>(55)</sup>. Negli anni l'architettura genetica della FH è cambiata; oggi esistono tre forme di FH: 1) ipercolesterolemia autosomica dominante (*autosomal dominant hypercholesterolemia*, ADH); 2) ipercolesterolemia autosomica recessiva (*autosomal recessive hypercholesterolemia*, ARH) e 3) ipercolesterolemia poligenica<sup>(56)</sup>. La FH è insieme alla fibrosi cistica è una delle malattie genetiche più frequenti con una prevalenza nella popolazione tra 1:200 e 1:500. La FH può essere considerata una delle cause genetiche di malattia CV aterosclerotica per due motivi: livelli molto alti di LDL (>190 mg/dL nell'adulto e >160 mg/dL nel bambino), fattore causale di aterosclerosi, ed esposizione a tali livelli dalla nascita. Tutto ciò anticipa di almeno due decenni rispetto alla popolazione generale non FH, la comparsa delle manifestazioni cliniche della cardiopatia ischemica (Figura 1). In Tabella 2 sono riassunte le caratteristiche del fenotipo FH nella forma ADH. I geni responsabili di FH monogenica sono 4 e codificano per: LDL recettore (LDLR), apolipoproteina B (ApoB), *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9* (PCSK9) e *ARH adapter protein*<sup>(57)</sup>.



**Figura 1.** Carico cumulativo del colesterolo LDL in individui con o senza FH in funzione dell'età, all'inizio della terapia con statine

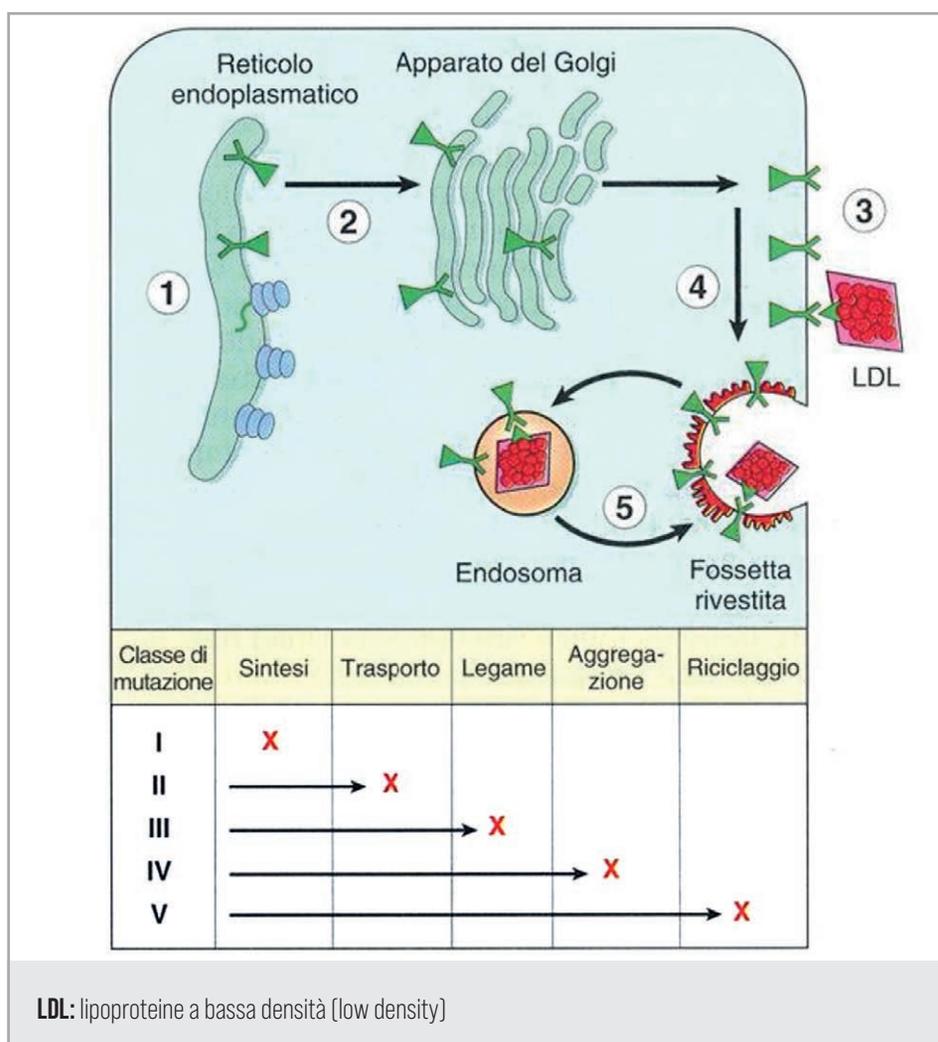
**Tabella 2.** Ipercolesterolemia Familiare autosomica dominante (ADH): caratteristiche epidemiologiche e cliniche

Malattia autosomica dominante
Nel 95% dei casi è causata da mutazioni nel gene che codifica per il recettore delle LDL (>1670 mutazioni) in Italia si stimano 200.000-250.000 pazienti
2 forme cliniche: FH omozigote (HoFH) e FH eterozigote (HeFH)
La frequenza della HeFH è di 1: 200/1:250 La frequenza della HoFH è di 1: 300.000/400.000 Fino al 10% di tutti i casi di malattia cardiovascolare prematura è associato alla FH L'85% dei maschi e il 50% delle femmine con FH vengono colpiti da malattia cardiovascolare prima dei 60 anni se non curati L'80% dei pazienti con FH rimane senza diagnosi L'84% dei pazienti con FH non assume farmaci ipolipemizzanti
Caratteristiche cliniche e di laboratorio
- Elevati livelli di colesterolo LDL eterozigoti ADH (Colesterolo totale= 300-500 mg/dL; LDL medio >220 mg/dL) omozigoti ADH (Colesterolo totale= 500-1000 mg/dL; LDL medio >500 mg/dL) - Storia familiare di cardiopatia ischemica prematura - Xantomatosi tendinea - Cardiopatia ischemica precoce nel probando - Gli omozigoti molto precocemente e gli eterozigoti sviluppano stenosi aortica

LDL: lipoproteine a bassa densità (low density), FH: ipercolesterolemia familiare

Le mutazioni dei geni di LDLR ed *ARH adapter protein* fanno perdere la funzione delle rispettive proteine e quindi sono classificate come *loss of function*; la perdita o severa diminuzione dell'attività recettoriale provoca accumulo in circolo di LDL e del colesterolo da esse trasportato; le mutazioni del gene di ApoB creano sostituzioni puntiformi aminoacidiche che alterano il legame tra la apolipoproteina e LDLR, impedendo quindi l'*uptake* e la internalizzazione delle LDL con accumulo di LDL in circolo, effetto quindi sovrapponibile a quello causato dalle mutazioni dei geni LDLR ed ARH-. Le mutazioni del gene PCSK9 sono invece mutazioni con *gain of function* che aumentando l'attività della proteina PCSK9, aumentano la degradazione di LDLR e di fatto ne riducono il numero, con un effetto finale analogo a quello provocato dalle mutazioni del recettore: aumento in circolo dei livelli di colesterolo LDL.

Sono state identificate più di 1600 mutazioni del gene di LDLR che è responsabile del 95% dei casi di ADH; le mutazioni del gene ApoB sono responsabili del 3-5% dei casi di ADH mentre quelle del gene PCSK9 dell'1%<sup>(58)</sup>. Le mutazioni del gene del recettore sono state classificate in 5 classi funzionali (Figura 2) ed il tipo di mutazione condiziona l'attività residua del recettore. Le mutazioni più gravi determinano un'attività residua <2% (mutazioni *null*) mentre quelle meno gravi (*defective*) un'attività tra il 2% ed il 35%. L'attività residua correla con i livelli plasmatici di colesterolo LDL. Le forme cliniche della ADH monogenica sono riassunte in Tabella 2. La forma più frequente è rappresentata dalla ADH eterozigote con una prevalenza stimata in Italia di 150.000-300.000 soggetti. La ADH omozigote, più rara ha una prevalenza nella popolazione generale di 1:300.000/1:400.000 ed in Italia sono stati identificati circa 125 omozigoti. La forma recessiva-ARH- è meno frequente ed in Italia sono stati identificati 60 omozigoti la maggior parte in Sardegna dove come per altre condizioni genetiche si è realizzato nei secoli una sorta di "isolato genetico": in altre parole la prevalenza dei portatori asintomatici in eterozigosi dell'allele ARH mutato è molto alta (1:70) e questo spiega la elevata prevalenza della ARH recessiva omozigote. Tuttavia, nell'Italia continentale sono stati identificati alcuni casi di ARH che apparentemente



**Figura 2.** Le mutazioni del gene del recettore delle LDL appartengono a 5 classi funzionali, in relazione a quale stadio del ciclo intracellulare del recettore venga alterato o abolito

non sembrano avere origine sarda. In Sardegna sono due le mutazioni prevalenti che rendono conto della quasi totalità dei casi di ARH. La diagnosi clinica di ADH è considerata molto accurata quando sono presenti i criteri codificati da uno score diagnostico ormai molto diffuso (*Dutch Lipid Clinic Network Score*) (Tabella 3). Un punteggio uguale >8 rende la diagnosi di ADH certa, uno score tra 6 ed 8 possibile ed <3 altamente improbabile. Va ricordato che la *performance* dello score diagnostico dipende dal numero di informazioni disponibili e che i punteggi più alti sono conferiti dai livelli di LDL e dalla presenza del fenotipo nella famiglia in età pediatrica.

La diagnosi clinica con score di >8 correla molto strettamente con la diagnosi genetica che rappresenta il *gold standard* (Figura 3). Quando possibile è sempre utile fare la ricerca di mutazioni poiché la diagnosi genetica oltre a fornire informazioni utili dal punto di vista scientifico, aumenta la consapevolezza e la motivazione dei pazienti e dei familiari assicurando una migliore *compliance* e aderenza terapeutica. Inoltre, grazie alla possibilità della diagnosi prenatale, consente ad una coppia di ADH eterozigoti di decidere consapevolmente sull'eventuale prole omozigote.

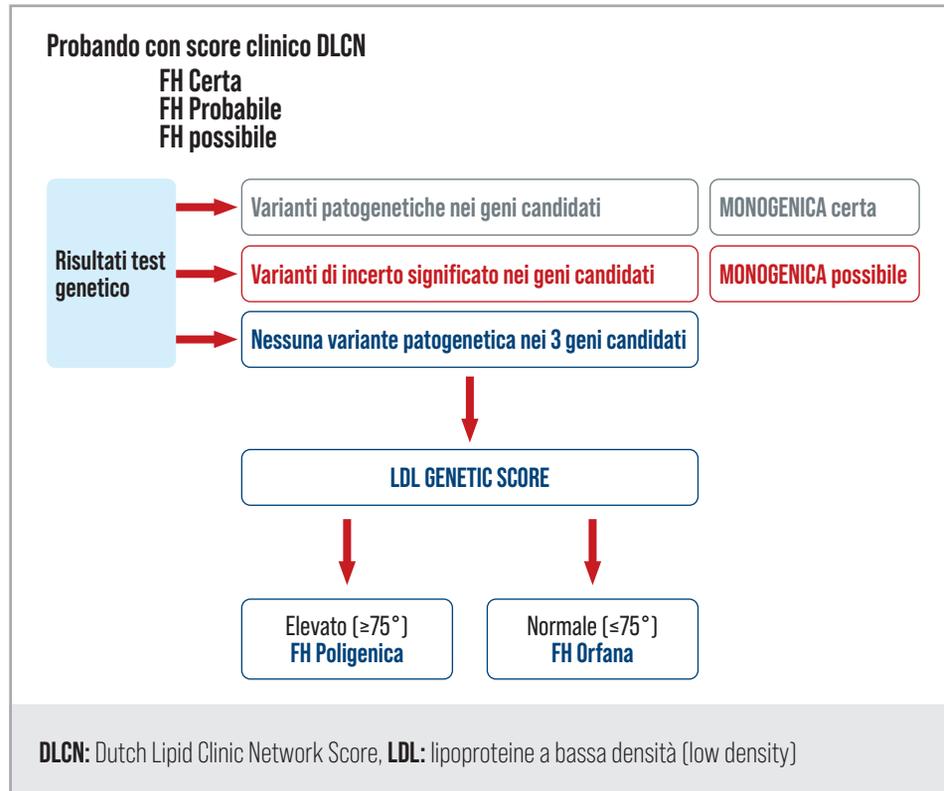
Oggi l'interpretazione del risultato genetico è resa più complessa dalla identificazione di varianti di incerto significato patogenetico (VUS) e dalla possibilità di un *burden* poligenico. La ricerca di mutazioni nei geni candidati di ADH e ARH (LDLR, ApoB, PCSK9 e ARH) ha successo nell'80% dei casi; in un 15-20% dei casi non si trova alcuna mutazione patogenetica. Per tale motivo i pannelli di diagnostica genetica comprendono oltre i geni candidati anche le varianti responsabili del *burden* poligenico, questo ha ridotto, ma non abolito, il numero dei casi non spiegati. In una residuale proporzione di casi non si riesce ad identificare la causa mono o poligenica. La diagnosi clinica o genetica di FH deve attivare un processo definito "screening a cascata". Una volta diagnosticata la FH in un soggetto è necessario che il medico applichi i criteri di diagnosi clinica e/o genetica ai familiari di I grado. Questo perché la FH è sottodiagnosticata e perché nella forma dominante ci si attende di avere almeno

**Tabella 3.** Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) Score

Condizione	Punti
<b>Storia familiare</b>	
a) Familiari di primo grado con coronaropatia prematura (<55 anni negli uomini, <60 anni nelle donne)	1
b) Familiari di primo grado con colesterolo LDL >310 mg/dL (o >95° percentile)	1
c) Familiari di primo grado con xantomi tendinei e/o arco corneale	2
d) Bambini <18 anni con colesterolo LDL >230 mg/dL (o >95° percentile)	2
<b>Storia clinica</b>	
a) Coronaropatia prematura (<55 anni negli uomini, <60 anni nelle donne)	2
b) 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 soggetto di età <45 anni	4
<b>Colesterolo LDL</b>	
a) LDL >325 mg/dL	8
b) LDL 251-325 mg/dL	5
c) LDL 191-250 mg/dL	3
d) 155-190 mg/dL	1
<b>Analisi genetica</b>	
a) Mutazione causativa nota nei geni LDLR, APOB, PCSK9	8

Diagnosi CERTA >8 punti; Diagnosi PROBABILE 6-8 punti; Diagnosi POSSIBILE 3-5 punti; Diagnosi IMPROBABILE 0-2 punti

**LDL:** lipoproteine a bassa densità (low density), **LDLR:** recettore per le LDL, **ApoB:** apolipoproteina B, **PCSK9:** proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9



**Figura 3.** Algoritmo diagnostico-genetico della ipercolesterolemia familiare (FH)

uno dei genitori (entrambi se il paziente è omozigote), eterozigote e quindi portatore del fenotipo clinico e biochimico (elevati livelli di colesterolo LDL). Lo *screening* a cascata permetterà quindi di trattare il più precocemente possibile i casi “nascosti” di FH allo scopo di prevenire le manifestazioni cliniche della cardiopatia ischemica<sup>(57)</sup>.

## Dislipidemie monogeniche con aumenti isolati di trigliceridi

Le ipertrigliceridemie primarie comprendono malattie ad eziologia monogenica o poligenica caratterizzate da alterazioni del metabolismo delle lipoproteine che trasportano i trigliceridi (TG) [Chilomicroni e Lipoproteine a densità intermedia (*intermediate density*, IDL) o molto bassa, *very low density*, VLDL)]. Per valori di TG >885 mg/dL, l'ipertrigliceridemia viene definita severa e la forma monogenica più rara è rappresentata dalla sindrome chilomicronemica familiare (*familial chylomicronemia syndrome*, FCS) mentre quella più frequente, la sindrome chilomicronemica multifattoriale (*multifactorial chylomicronemia syndrome*, MCS) ha eziologia poligenica. Per valori di TG nel range 175–885 mg/dL, l'ipertrigliceridemia primaria si definisce lieve/moderata e l'eziologia è poligenica (Tabella 1).

### Sindrome chilomicronemica familiare (FCS)

La FCS è una malattia rara, monogenica a trasmissione recessiva, causata da mutazioni con perdita di funzione in 5 geni che codificano per: 1) la proteina ad attività enzimatica, Lipoprotein Lipasi (LPL), responsabile in circolo della idrolisi dei TG esogeni veicolati dai chilomicroni e dei TG endogeni veicolati dalle VLDL; 2) la apolipoproteina ApoC2, attivatore della LPL; 3) la apolipoproteina ApoA5, attivatore della LPL; 4) la proteina strutturale *glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1* (GPIHBP1); 5) la proteina che favorisce la

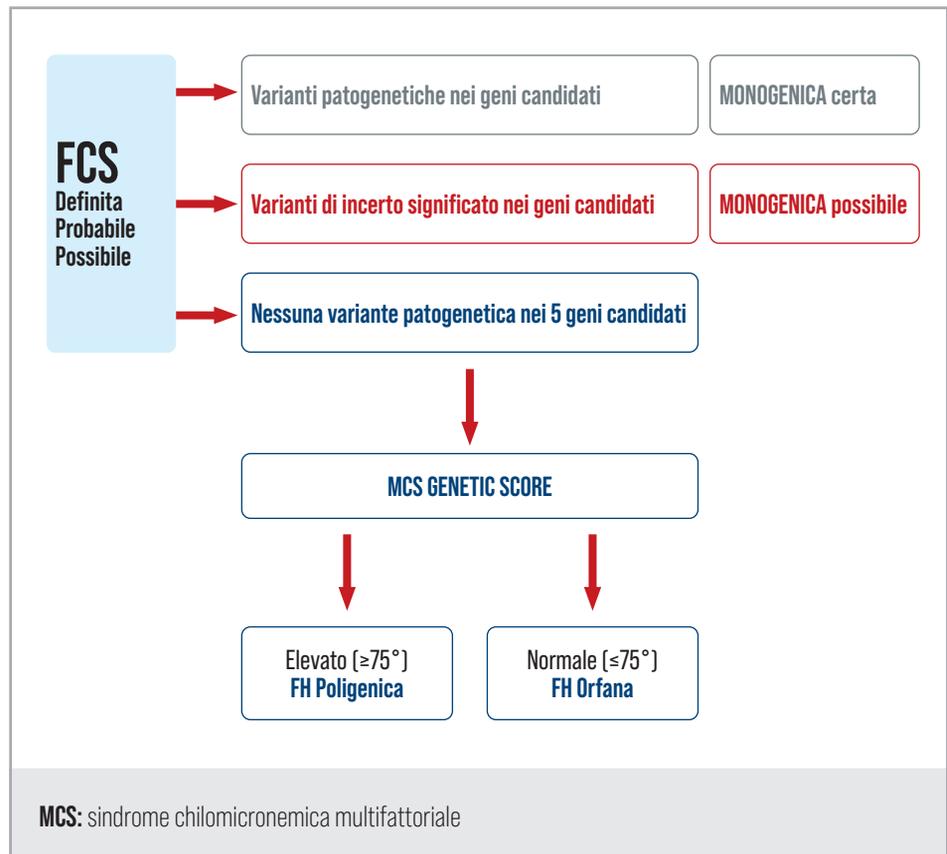
maturazione intracellulare di LPL, *lipase maturation factor 1* (LMF1). La frequenza nella popolazione generale della FCS era ritenuta rara, 1:100.000; Oggi le stime di frequenza devono tener conto delle varie eziologie monogeniche<sup>(59)</sup>. Per la FCS-LPL, la frequenza può variare da 1:100.000 ad 1:1.000.000 a secondo dei contesti geografici. Le FCS-ApoC2, ApoA5, GPIHBP1 e LMF1 sono considerate molto rare.

In Italia sono state identificati ad oggi <50 casi di FCS-LPL e <10 casi per ciascun'altra eziologia monogenica<sup>(60)</sup>. Il fenotipo clinico delle FCS è caratterizzato dal massiccio aumento dei TG plasmatici (da 1000 mg/dL a 30000 mg/dL) con la presenza di plasma lattescente, episodi di dolore addominale e pancreatite ricorrenti, alterazioni cutanee e retiniche, epatosplenomegalia ed alterazioni “neurologiche e comportamentali” (Tabella 4)<sup>(61)</sup>. Esistono differenti relazioni genotipo-fenotipo tra le cinque forme monogeniche di FCS. Le FCS-LPL ed ApoC2 si esprimono fin dalla nascita e non rispondono alle terapie convenzionali, mentre le FCS- ApoA5, GPIHBP1 e LMF1 possono avere una espressione clinica più tardiva, in età adulta e possono rispondere alle terapie convenzionali. In Italia la maggior parte dei casi di FCS è FCS-LPL e ad oggi sono state descritte >30 mutazioni, la maggior parte missenso. La maggior parte dei pazienti FCS-LPL è omozigote per mutazioni del gene LPL, ma una parte dei pazienti può essere eterozigote composto per mutazioni del gene LPL (portatori di due differenti mutazioni dello stesso gene) e stanno emergendo casi di doppi eterozigoti (due mutazioni in due geni diversi tra i 5 responsabili di FCS (es. mutazione in eterozigosi di ApoA5 e mutazione in eterozigosi di LPL). La scoperta della complessità della architettura genetica della FCS è stata resa possibile, così come già visto per la FH, dall'evoluzione delle strategie di *deep sequencing* di nuova generazione. È stato inoltre riportato, e non solo in Italia, che i portatori in eterozigosi di mutazioni di LPL possono sviluppare una FCS. Questo dato è di difficile interpretazione e potrebbe comunque suggerire una frequenza più elevata della patologia. Gli eterozigoti LPL non dovrebbero esprimere il fenotipo LPL; diverse potrebbero essere le spiegazioni: la presenza di *stressors* metabolici come il diabete o l'insulino resistenza potrebbero contribuire a slantizzare il fenotipo clinico anche in assenza della doppia dose di allele mutato oppure i dati sulla architettura genetica di tali eterozigoti potrebbero essere incompleti perché identificati in epoca pre NGS, e quindi esiste sempre la possibilità che siano presenti nell'eterozigote FCS-LPL varianti patogenetiche di uno o più degli altri 4 geni (Figura 4).

La diagnosi di FCS che nel passato si basava sulla determinazione del fenotipo biochimico (presenza/assenza della attività lipolitica e della massa della LPL), oggi si basa sui dati clinici e tra questi i più sensibili sono la persistenza nel tempo di livelli plasmatici di trigliceridi >885 mg/dL, l'espressione del fenotipo in età pediatrica e la

**Tabella 4.** Sindrome chilomicronemica familiare (FCS)/Sindrome chilomicronemica multifattoriale (MCS): caratteristiche cliniche

Dolore addominale	Perdita di memoria
Pancreatiti ricorrenti	Depressione
Epatosplenomegalia	Vomito e diarrea
Xantomatosi eruttiva	Proteinuria
Lipemia retinale	Anemia
Faticabilità	



**Figura 4.** Algoritmo diagnostico-genetico della sindrome chilomicronemica familiare (FCS)

mancata risposta alla terapia convenzionale. La sensibilità della diagnosi clinica di FCS basata sui suddetti elementi è più elevata quando si tratta di FCS-LPL e ApoC2. La pancreatite potrebbe non essersi ancora manifestata al momento della diagnosi. Oggi sappiamo che un paziente con FCS durante l'arco della sua esistenza può sperimentare fino a 10 episodi di pancreatite che, quando gravate da complicanze, ne possono mettere a rischio la vita.

È inoltre aumentato il rischio di diabete secondario alle alterazioni anatomiche pancreatiche conseguenza delle pancreatiti ricorrenti.

Sono stati elaborati negli ultimi anni algoritmi diagnostici nel tentativo di rendere più accurata la diagnosi clinica di FCS. In Italia il *network* delle dislipidemie genetiche "LIPIGEN" che offre la opportunità della diagnosi genetica per i pazienti FH, ha recentemente allargato alla FCS la diagnosi genetica elaborando uno score a punti che facilita la diagnosi clinica di FCS monogenica e MCS poligenica. Il *golden standard* utile ed oggi necessario per l'accesso alle terapie innovative, è rappresentato dalla diagnosi genetica. Grazie alle strategie di NGS è possibile sequenziare contemporaneamente non solo i geni candidati responsabili di FCS monogenica ma anche i geni, molto più numerosi, che contribuiscono al *burden* poligenico. In alcuni casi è possibile avere un risultato genetico-non informativo: nessun coinvolgimento dei geni candidati e *burden* poligenico troppo basso per spiegare il fenotipo FCS. In questo caso, così come già sottolineato per la FH, si parla di FCS orfana (nuove e sconosciute cause genetiche?) (Figura 4). La FCS, quindi, è una malattia relativamente rara che va identificata precocemente per ridurre il rischio di pancreatite e migliorare la qualità della vita dei pazienti, oggi obiettivi raggiungibili con i nuovi farmaci.

## Dislipidemie monogeniche con aumento di colesterolo e trigliceridi (dislipidemie miste)

Le dislipidemie primarie miste sono forme genetiche caratterizzate da aumento dei livelli plasmatici di LDL e di TG. La forma monogenica è rappresentata dalla disbetalipoproteinemia familiare (*familial dysbetalipoproteinemia*, FD), da accumulo di *remnants* (Iperlipoproteinemia Tipo III della classificazione classica); la forma poligenica dalla Iperlipidemia familiare combinata (*combined hyperlipidemia*, CHL).

### Disbetalipoproteinemia familiare

La FD è un'alterazione monogenica del metabolismo delle lipoproteine plasmatiche con trasmissione autosomica recessiva che causa un fenotipo biochimico caratterizzato da accumulo in circolo di lipoproteine *remnants* ricche in TG, colesterolo e IDL. Il fenotipo clinico è caratterizzato da xantomi cutanei o tendinei, che possono essere eruttivi (simili a quelli della FCS) o palmari. I pazienti affetti da FD presentano un rischio molto alto di cardiopatia ischemica e di arteriopatia obliterante periferica aterosclerotica. La presenza di livelli molto alti di TG (> 885 mg/dL) determina un elevato rischio di pancreatite.

La mutazione genica che causa FD interessa il gene che codifica per una apolipoproteina, la ApoE, che è presente nei chilomicroni, VLDL ed IDL, e ne consente la loro rimozione dal circolo. Ciascun individuo è portatore di un genotipo di ApoE che nella grande maggioranza è rappresentato dalla omozigosi o dall'eterozigosi per l'allele epsilon 3 ( $\epsilon 3/\epsilon 3$ - $\epsilon 3/\epsilon 4$  o  $\epsilon 3/\epsilon 2$ ). Quando la mutazione genica causa un genotipo in omozigosi  $\epsilon 2/\epsilon 2$ , la proteina ApoE2 codificata è presente sui *remnants* dei chilomicroni e delle VLDL, ma non è in grado di legarsi al recettore e quindi i *remnants* ricchi in TG e colesterolo si accumulano in circolo.

La prevalenza della FD varia nella popolazione generale tra 0.1% e 1.7%; tuttavia la presenza del genotipo non è sufficiente a determinare il fenotipo biochimico e clinico della FD. Perché si realizzi la malattia con massivo accumulo in circolo di *remnants* è necessario il concorso di altre condizioni genetiche o acquisite che determinano una aumentata produzione epatica di VLDL o una riduzione dell'attività recettoriale e lipolitica (es. diabete, obesità, ipotiroidismo, insulina resistenza).

La diagnosi clinica si basa sulla presenza di valori elevati ed equivalenti di colesterolo totale e TG (*range* 300–1000 mg/dL) con LDL ridotte - misurato con il metodo diretto - ed il fenotipo clinico (xantomi, pancreatite, cardiopatia ischemica ed arteriopatia periferica)<sup>(61)</sup>. La diagnosi genetica è basata sulla presenza della omozigosi  $\epsilon 2/\epsilon 2$ . Di recente, è stato proposto un algoritmo semplice ed accurato per la diagnosi di FD<sup>(62)</sup>. In presenza di una dislipidemia mista è sufficiente calcolare il rapporto tra il non-HDL colesterolo in mmol/L ed il livello plasmatico di ApoB in g/L; nel caso di FD tale rapporto è >3.69. La conferma diagnostica si ottiene se presente il genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$ .

### Iperlipidemia Familiare Combinata

La CHL è una dislipidemia mista con aumento di LDL e TG; rappresenta la dislipidemia più frequente nella popolazione generale ed è stata identificata nel 1973<sup>(63)</sup>. La CHL si associa molto spesso a condizioni caratterizzate da insulino-resistenza quali obesità e diabete e ad un aumentato rischio CV. Il fenotipo biochimico è variabile nell'ambito dello stesso individuo e della stessa famiglia con la presenza nel probando e nei parenti di primo grado di dislipidemia mista, ipercolesterolemia o ipertrigliceridemia isolate.

Non è inoltre possibile stabilire una modalità certa di trasmissione dominante o recessiva. Tutto ciò ha reso complessa la definizione della genetica della CHL. Non è stato possibile identificare una causa monogenica della malattia. Gli studi di GWAS e le strategie di NGS hanno suggerito la possibilità che alla eziologia genetica della CHL contribuiscano varianti di geni candidati delle forme monogeniche FH ed FCS in eterozigosi (LDLR-ApoB-PCSK9-LPL-ApoA5-GPIHBP1-LMF1) in associazione a varianti polimorfiche che nei GWAS sono state associate a LDL e TG. La genetica della CHL è quindi complessa e recentemente è stato dimostrato che i pazienti con CHL non hanno un eccesso di varianti rare dei geni candidati per le forme monogeniche di FH e FCS mentre hanno un elevato *burden* poligenico misurato con un pannello di 16 polimorfismi associati ad ipertrigliceridemia. È quindi possibile che la CHL sia una dislipidemia poligenica e che il fenotipo biochimico e la sua variabilità intra ed interindividuale siano il risultato dell'interazione tra *burden* poligenico ed influenze ambientali sul metabolismo dei TG e del colesterolo. La prevalenza nella popolazione generale della CHL è molto alta (circa 1:100) e la diagnosi clinica (Tabella 5) si basa sulla presenza di livelli di TG >134 mg/dL, LDL >160 mg/dL, ApoB >120 mg/dL associati alla variabilità intra ed interindividuale del fenotipo biochimico all'interno del cluster familiare ed alla presenza nell'individuo e/o nella famiglia di malattia CV, obesità e diabete tipo 2. La diagnosi genetica attualmente non è raccomandata perché la valutazione del *burden* poligenico non è accessibile né diffusa.

**Tabella 5.** Diagnosi clinica di Iperlipidemia Familiare Combinata (CHL)

Criteri maggiori	
LDL >160 mg/dL e/o TG >134 mg/dL	+ ApoB >120 mg/dL
Criteri aggiuntivi	
Variabilità intra ed interindividuale (nel cluster familiare) del fenotipo biochimico	Presenza nella famiglia o nell'individuo di malattia CV, obesità, diabete tipo II

Adattato e modificato da Veerkamp MJ et al. *Circulation*. 2004;109:2980-2985

LDL: lipoproteine a bassa densità (*low density*), TG: trigliceridi, ApoB: apolipoproteina B, CV: cardiovascolare

## Dislipidemia da Iper Lipoproteina(a)

La scoperta della lipoproteina(a) [Lp(a)] risale al 1965 (64) e fu considerata una variante genetica delle LDL ed assimilata ad un nuovo sistema antigenico sierico in aggiunta al sistema ABO. La Lp(a) è costituita da una LDL che è legata da un ponte disulfuro alla apoproteina(a) - apo(a). La massa di Lp(a) è due volte maggiore di quella delle LDL e oltre a trasportare una quota del colesterolo totale, la Lp(a) rappresenta il veicolo principale dei fosfolipidi ossidati (65). Il gene che codifica apo(a) è un gene polimorfico ed apo(a) è una proteina polimorfica: ciascun individuo eredita in eterozigosi due isoforme differenti per dimensioni di apo(a) o in omozigosi due isoforme della stessa dimensione. Se definiamo “*small*” (S) e “*large*” (L) le combinazioni possibili saranno: LL, SS, LS (66). I livelli di Lp(a) sono geneticamente determinati e la distribuzione in una data popolazione è *skewed* con la maggior parte dei soggetti con valori <50 mg/dL e con circa il 20% con valori >50 mg/dL (67). I livelli plasmatici di Lp(a) sono stabili nel corso della vita di un individuo, tuttavia un aumento primario dei livelli di Lp(a) può essere rilevato nelle condizioni che determinano una reazione di fase acuta (es. flogosi, sepsi etc.) e questo perché nella regione del promotore del gene Lp(a) esiste la

sequenza che quando attivata dall'interleuchina 6 aumenta l'espressione di Lp(a); un aumento secondario di Lp(a) si verifica nei pazienti con insufficienza renale cronica specie se in trattamento dialitico, nei pazienti con sindrome nefrosica e nelle donne in post-menopausa <sup>(65)</sup>.

Il ruolo predominante della genetica nel determinare valori elevati di Lp(a) in una rilevante parte della popolazione generale - *range* plasmatico di Lp(a): da 1mg/dL a >1000 mg/dL - assieme alle evidenze sperimentali, epidemiologiche e di randomizzazione mendeliana, hanno da un lato stabilito il ruolo causale di questa lipoproteina nella malattia CV aterosclerotica e dall'altro costituito le basi concettuali per la definizione di questa nuova forma di dislipidemia primaria, l'Iperlipidemia da aumento quantitativo di Lp(a) - Iper Lp(a).

Lp(a) si accumula nella placca aterosclerotica e contribuisce alla formazione delle foam cells ed all'attivazione della cascata di eventi immuno-flogistici che condizionano l'evoluzione dell'ateroma e che sono causati non solo dai prodotti di ossidazione delle LDL, ma anche e forse soprattutto dalla ossidazione dei fosfolipidi dei quali Lp(a) è il principale serbatoio. I fosfolipidi ossidati della Lp(a) sono inoltre ritenuti responsabili della stenosi valvolare aortica calcifica <sup>(68)</sup>. Il ruolo protrombotico della Lp(a), legato all'analogia strutturale di apo(a) con il plasminogeno ed alla potenziale competizione con esso e conseguente interferenza sui processi fibrinolitici, rimane oggetto di dibattito. A differenza delle altre forme di dislipidemie primarie mono o poligeniche che hanno una prevalenza da 1:100 ad 1:250 nella popolazione generale, la frequenza di IperLp(a) con qualsiasi *cut-off* (>30 mg/dL, 50 mg/dL o 60 mg/dL) è altissima interessando nell'Unione Europea tra 150 e 260 milioni di soggetti; i soggetti con Lp(a) >180 mg/dL, che secondo le linee guida ESC/EAS 2019 hanno lo stesso rischio conferito dall'essere FH eterozigoti con LDL >190 mg/dL, in EU sono stimati essere 7.500.000 <sup>(69)</sup>. Pur nella consapevolezza che il rischio da Lp(a) è continuo come quello da LDL, esiste una forma di IperLp(a) grave, con livelli >180 mg/dL, familiare, con una prevalenza doppia rispetto alla FH, che va considerata negli algoritmi diagnostici alla stessa stregua della FH, inclusa la necessità di eseguire uno *screening* a cascata <sup>(70)</sup>. Per tali motivi è necessario che il clinico sia consapevole della rilevanza della IperLp(a): valori elevati di Lp(a) sono responsabili del rischio residuo di nuovi eventi nei pazienti ad alto ed altissimo rischio CV nonostante il trattamento con statine o inibitori di PCSK9; è necessario dosare Lp(a), secondo linee guida, almeno una volta nella vita; i livelli di Lp(a) consentono una migliore stratificazione del rischio CV; va sospettata la IperLp(a) nei soggetti con eventi CV ricorrenti o prematuri, altrimenti non spiegati, per iniziare una terapia mirata (afèresi lipoproteica o nel futuro farmaci innovativi) ed intensificare la riduzione farmacologica delle LDL <sup>(71)</sup>.

## Dislipidemie poligeniche

Le conoscenze acquisite nelle ultime tre decadi sulla genetica delle dislipidemie ne hanno rivoluzionato l'inquadramento nosografico. Fino a pochi anni fa si riteneva che l'FH e la FCS fossero le uniche forme di ipercolesterolemia ed ipertrigliceridemie severe primarie. Oggi l'architettura genetica delle dislipidemie si è rivelata più complessa: accanto alle forme monogeniche esistono le forme oligogeniche ma soprattutto le forme poligeniche. Lo stesso fenotipo clinico di una dislipidemia primaria è il risultato di un'importante alterazione di un singolo gene o l'effetto della somma di lievi alterazioni che coinvolgono molti geni e che si accumulano nello stesso

individuo. Non più quindi malattia di-allelica ma malattia multi-allelica. Inoltre, la interazione gene/i-ambiente concorre non solo alla variabilità di espressione clinica del fenotipo ma anche alla possibilità di intervento che deve sempre considerare le modifiche dello stile di vita in associazione ai farmaci.

## Ipercolesterolemia severa poligenica

Nella popolazione generale la curva gaussiana di distribuzione dei livelli di LDL ci permette di identificare tre aree: la coda di sinistra (<5° percentile) rappresentata dai soggetti con valori bassi di LDL, l'area centrale dove è rappresentata la maggior parte della popolazione con livelli di LDL la cui severità dipende dal profilo di rischio individuale e la coda di destra (>95° percentile) (>190 mg/dL) dove sono rappresentati i soggetti con FH che come già detto ha una prevalenza di 1:200 individui. Tuttavia, quando si cercano le mutazioni nei geni candidati per FH, in una percentuale significativa di soggetti l'ipercolesterolemia severa non viene spiegata.

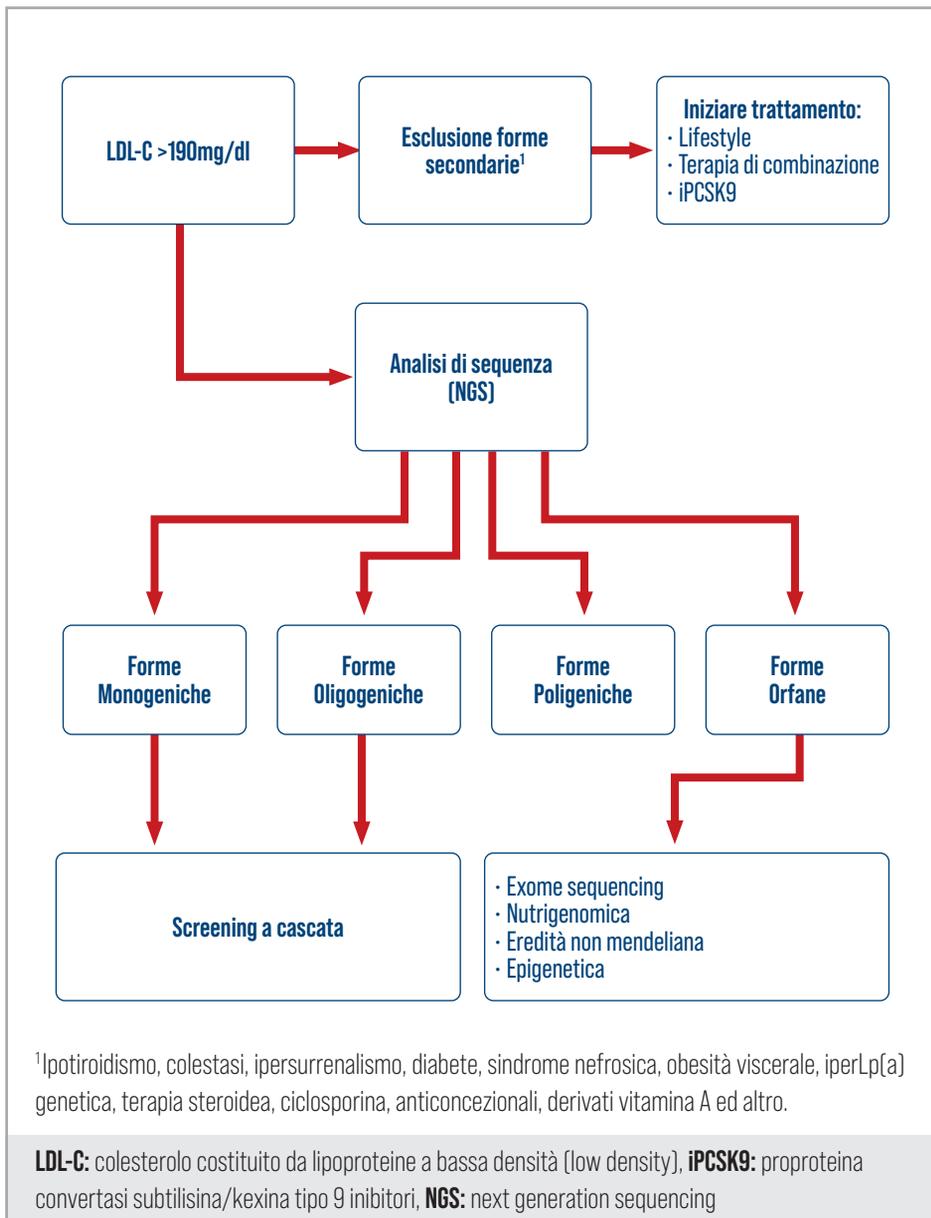
Khera *et al.* hanno chiaramente dimostrato come in una grande coorte di oltre 20.000 soggetti il 6.7% aveva livelli di LDL >190 mg/dL e con il semplice approccio della sequenza dei tre geni candidati (LDLR, ApoB e PCSK9) solo circa il 2% era carrier di FH monogenica<sup>(72)</sup>. Lo studio epidemiologico AMCO ha messo in evidenza come la prevalenza di ipercolesterolemia severa (LDL >190 mg/dL) nella popolazione italiana nella fascia di età tra 35 e 79 anni sia di gran lunga superiore a quella stimata per la FH (7% vs 0.5 %). Nel 2013 Talmud<sup>(73)</sup> ha dimostrato come livelli di LDL sovrapponibili a quelli dei soggetti con ipercolesterolemia monogenica potevano essere spiegate dal contributo additivo di 12 varianti funzionali in altrettanti geni che contribuivano ciascuno ad un piccolo aumento di LDL.

È quindi possibile analizzare le 12 varianti<sup>(73)</sup>, o il pannello ridotto di 6 varianti che funziona altrettanto bene, per accertare l'eziologia poligenica dell'ipercolesterolemia severa. Tuttavia, in una certa percentuale di casi (fino al 30%) non è possibile determinare la presenza di un'eziologia né monogenica né poligenica; queste forme orfane potrebbero essere spiegate da altri geni ancora sconosciuti, ma prima di definirle orfane bisogna escludere i casi di ipercolesterolemia da aumenti di estremi di Lp(a). Un nuovo livello di complessità genetica è rappresentato dall'esistenza di pazienti con ipercolesterolemia severa con una causa oligogenica: mutazioni sia nei tre geni candidati (LDLR, PCSK9, e ApoB) che in 4 geni accessori (ABCG5, ABCG8, ApoE, and LDLRAP1).

L'identificazione dei soggetti con ipercolesterolemia severa a eziologia poligenica ha importanti implicazioni cliniche; i soggetti con ipercolesterolemia poligenica pur se esposti più tardivamente dei monogenici a livelli elevati di LDL sono soggetti ad alto rischio CV, vanno identificati e precocemente trattati. Inoltre, va ricordato che il DUTCH score è accurato per la diagnosi di FH monogenica, ma non per l'ipercolesterolemia poligenica. Dal punto di vista clinico-pratico clinico l'algoritmo diagnostico proposto nella Figura 5<sup>(74)</sup> potrebbe costituire un approccio semplificato alla diagnosi di ipercolesterolemia primaria (mono e poligenica).

## Ipertrigliceridemie poligeniche

L'ipertrigliceridemia severa poligenica (TG >887 mg/dL) o la MCS rappresenta la forma più frequente di ipertrigliceridemia primaria. È caratterizzata da un aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi (chilomicroni e VLDL) mentre la MCS da un



**Figura 5.** Algoritmo per la gestione diagnostico-terapeutica dell'ipercolesterolemia severa

aumento dei chilomicroni. La ipertrigliceridemia moderata (TG tra 177 mg/dL e 887 mg/dL) presenta spesso una familiarità (denominata anche Ipertrigliceridemia Familiare) e la classe lipoproteica aumentata è rappresentata dalle VLDL.

Le due forme hanno una eziologia poligenica<sup>(60)</sup>.

Gli studi di GWAS e le metodiche NGS hanno permesso di identificare ed utilizzare a scopo diagnostico pannelli costituiti da numerose varianti geniche che sono associate ad aumenti quantitativi dei TG (). Leziologia poligenica della MCS e della ipertrigliceridemia primaria moderata non obbedisce alla trasmissione intra-familiare di tipo dominante o recessivo tipica delle forme monogeniche. Per tale motivo non è raccomandato lo *screening* a cascata. Il fenotipo clinico della MCS è molto simile a quello della FCS (Tabella 4) con una differenza relativa alla risposta alla terapia: i pazienti con MCS rispondono alla terapia convenzionale (fibrati ed omega 3) ipotrigliceridemizzante.

Mentre nella MCS, così come nella FCS, il rischio maggiore riguarda la pancreatite, nella ipertrigliceridemia primaria moderata il rischio da prevenire è quello di malattia CV. Le evidenze sperimentali, epidemiologiche, di intervento farmacologico e di randomizzazione mendeliana hanno chiaramente dimostrato il ruolo causale delle lipoproteine ricche in TG e dei loro *remnants* nei confronti degli eventi CV aterosclerotici. Le linee guida raccomandano l'intervento farmacologico sui TG nei pazienti a rischio dopo il fallimento delle modifiche degli stili di vita ed il raggiungimento del goal primario per il *target* di LDL.



# Il ruolo del recettore LOX-1 nella patogenesi dell'aterosclerosi

Francesco Romeo, Francesca Romana Prandi, Jawahar L Mehta

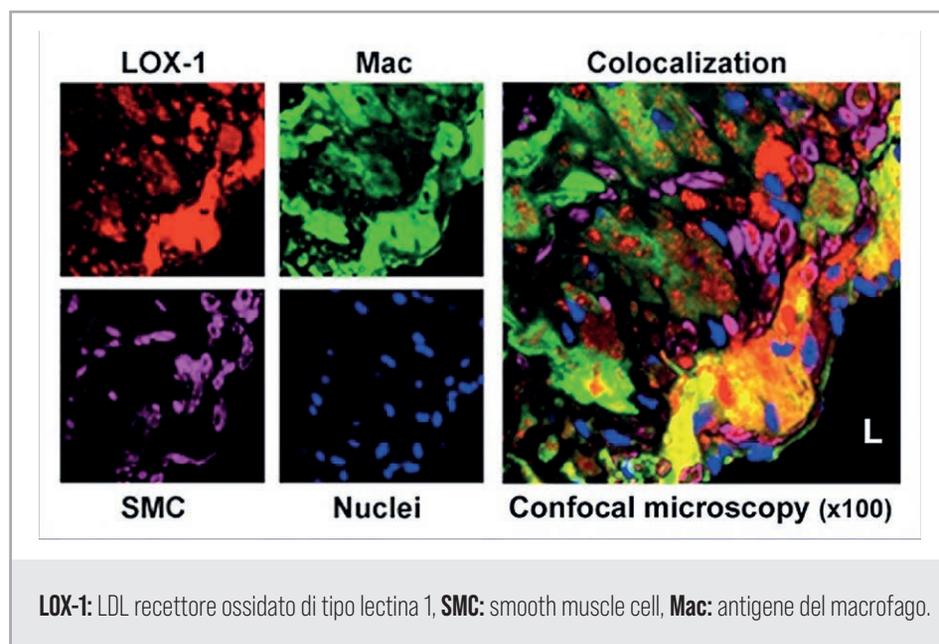
## Introduzione

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria cronica, caratterizzata da depositi di lipidi e cellule infiammatorie risultanti nella formazione di placche fibrolipidiche nelle pareti delle arterie di medio e grande calibro. Nel 1856 Rudolph Virchow fu il primo a riconoscere il ruolo dell'infiammazione nella patogenesi dell'aterosclerosi<sup>(75)</sup>. Nel 1913 Nikolai N. Anitschkow dimostrò che i conigli sottoposti a dieta ad alto contenuto di colesterolo sviluppavano, in associazione a livelli sierici molto alti di colesterolo, lesioni vascolari simili all'aterosclerosi umana ("senza colesterolo, non c'è aterosclerosi"), ed identificò per primo le cellule schiumose<sup>(76)</sup>. Nel 1976 il patologo Russell Ross formulò l'ipotesi della risposta al danno endoteliale ("*response to injury*") e nel 1999 pubblicò un articolo sul *New England Journal of Medicine* affermando che l'aterosclerosi è una patologia infiammatoria, determinata non soltanto da un passivo accumulo di lipidi<sup>(77)</sup>. Nel 1973 Michael S. Brown e Joseph L. Goldstein scoprirono il recettore delle LDL (LDLR) e descrissero il suo funzionamento nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo<sup>(78)</sup> vincendo il premio Nobel per la Fisiologia o la Medicina nel 1985. Nel 2017 Hansson pubblicò un articolo su *Circulation* intitolato "Infiammazione ed Aterosclerosi- la fine di una controversia", discutendo come i risultati del *trial* randomizzato CANTOS (*Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study*) stabilivano senza dubbio che l'infiammazione è un meccanismo patogenetico nell'aterosclerosi e come tale può essere utilizzato come target terapeutico<sup>(79)</sup>. Diversi studi hanno dimostrato tramite una serie di dati sperimentali che le lipoproteine a bassa densità (*low density lipoproteins*, LDL) ossidate, agendo tramite il recettore LOX-1 (LDLR ossidato di tipo lectina 1), rappresentano "*l'injury*" che innesca la "*response to injury*", ovvero l'infiammazione con i meccanismi dell'immunità innata e adattativa che portano infine alla formazione della placca aterosclerotica. Dunque, la malattia aterosclerotica è una malattia infiammatoria che riconosce come "*injury*" iniziale l'attività delle LDL ossidate, che esercitano i loro effetti tramite il legame con il recettore LOX-1, innescando una serie di *pathway* di segnalazione a valle.

L'accumulo di lipoproteine e la disfunzione endoteliale rappresentano il primo passo nell'aterogenesi, insieme al reclutamento e migrazione dei leucociti a livello subendoteliale, con formazione delle cellule schiumose e quindi delle strie lipidiche. Successivamente le cellule muscolari lisce dalla tonaca media migrano nell'intima, proliferano e producono matrice extracellulare, portando ad una lesione fibro-lipidica, che può poi evolvere in lesione complicata, caratterizzata da erosione, rottura

e trombosi della placca. Numerosi mediatori dell'infiammazione, citochine, fattori chemotattici, meccanismi dell'immunità innata e adattativa intervengono nel processo di aterogenesi.

Le LDL ossidate esercitano i loro vari effetti su cellule endoteliali, piastrine, macrofagi, fibroblasti e cellule muscolari lisce attraverso la glicoproteina transmembrana LOX-1, un membro della famiglia dei recettori scavenger di classe E, che svolge un ruolo cruciale nella patogenesi dell'aterosclerosi <sup>(80)</sup> (Figura 1), di cui discuteremo nel dettaglio in questo capitolo.



**Figura 1** . Co-localizzazione del segnale LOX-1 e delle cellule nella placca aterosclerotica alla microscopia confocale [con il permesso del Prof. D. Li e del Prof. J. Metha]

## Meccanismo dell'aterosclerosi

Le prime fasi dell'aterogenesi umana sono rappresentate dall'accumulo extracellulare di LDL, che si legano ai proteoglicani dell'intima arteriosa e tendono a confluire formando degli aggregati. Il legame con i proteoglicani ritarda l'attraversamento dell'intima da parte delle LDL, aumentando il loro tempo di stazionamento e rendendole maggiormente suscettibili a modificazioni ossidative. Tra i fattori che contribuiscono allo stress ossidativo nell'ateroma nascente troviamo la nicotinammide adenina dinucleotide/nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADH/NADPH) ossidasi, espresse dalle cellule vascolari, le lipossigenasi, espresse dai leucociti infiltranti e l'enzima mieloperossidasi. Lo squilibrio tra la generazione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) ed il sistema di difesa antiossidante, che si verifica in condizioni quali ipertensione, diabete mellito, fumo e dislipidemia <sup>(77)</sup>, determina un aumentato stress ossidativo, contribuendo all'ossidazione delle LDL native in LDL ossidate, che svolgono un ruolo chiave nell'aterogenesi.

La disfunzione endoteliale rappresenta un elemento chiave nell'aterogenesi. In condizioni fisiologiche, lo stress tangenziale endoteliale del flusso laminare interagendo con i meccanosensori attiva le cascate di trasduzione del segnale che aumentano l'espressione genica di superossido dismutasi, che protegge dallo stress

ossidativo catabolizzando l'anione superossido reattivo, e di ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS), che genera ossido nitrico, che oltre ad essere un vasodilatatore endogeno esercita anche un effetto anti-infiammatorio aumentando la produzione di I $\kappa$ B $\alpha$ , che inibisce NF- $\kappa$ B, che regola numerosi geni coinvolti nell'infiammazione. In caso di alterazioni del flusso, si avrà una riduzione dello stress tangenziale con conseguente riduzione di superossido dismutasi ed eNOS, che determinano aumentato stress ossidativo, ridotta vasodilatazione e aumentata produzione di molecole pro-infiammatorie.

Nelle prime fasi del processo aterogenetico si verifica inoltre il reclutamento dei leucociti, principalmente monociti circolanti, grazie ad un aumento dell'espressione di molecole di adesione per i leucociti sulle cellule endoteliali, come la molecola di adesione alle cellule vascolari di tipo 1 (VCAM1), la molecola di adesione intercellulare di tipo 1 (ICAM1) e la selectina-P o CD62P. Lo stress ossidativo può stimolare la produzione locale di citochine, che aumentano l'espressione delle molecole di adesione e la produzione di molecole chemotattiche o chemochine, come la proteina chemotattica per i monociti 1 (MCP-1) o CCL2, che è prodotta dall'endotelio in risposta a lipoproteine ossidate e a mediatori dell'infiammazione e guida la migrazione direzionale dei monociti in sede subendoteliale. Oltre ai monociti, anche i linfociti T tendono ad accumularsi nelle lesioni aterosclerotiche iniziali; gli ateromi esprimono tre chemochine selettive per i linfociti, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, indotte dall'interferone gamma (INF $\gamma$ ). Nei classici fattori di rischio per l'aterosclerosi, come fumo, ipertensione, diabete e dislipidemia, si verifica un'attivazione delle cellule endoteliali con conseguente espressione di molecole di adesione che facilita l'adesione delle cellule infiammatorie che successivamente migrano in sede sub-endoteliale in risposta a segnali chemiotattici.

Diversi fattori di crescita presenti a livello della parete arteriosa, come il fattore stimolante la crescita dei macrofagi, stimolano la differenziazione dei monociti in macrofagi e l'espressione di recettori *scavenger* come LOX1, SR-A e CD36, che internalizzano le particelle lipoproteiche modificate e formano le cellule schiumose macrofagiche, che rappresentano il segno distintivo della lesione aterosclerotica iniziale. Le cellule schiumose a loro volta producono citochine, specie ossidanti come l'anione superossido e l'acido ipocloroso e metalloproteinasi di matrice (MMP), promuovendo l'infiammazione nella placca e la progressione della lesione. Questo tipo di amplificazione della risposta infiammatoria che non dipende da una stimolazione antigenica rappresenta l'immunità innata. Nell'aterogenesi entra in gioco anche l'immunità adattativa, o antigene-specifica. Le cellule presentanti l'antigene (cellule dendritiche, macrofagi e cellule endoteliali) possono presentare antigeni (lipoproteine modificate, agenti infettivi, proteine da shock termico, etc.) ai linfociti T presenti nella placca determinandone l'attivazione e conseguente produzione di citochine. I linfociti T CD4+ si distinguono in Thelper 1, che elaborano citochine proinfiammatorie (INF $\gamma$ , CD40L, TNF $\alpha$ ) e Thelper 2, che producono IL10 e fungono da inibitori dell'infiammazione. I linfociti T CD8+ possono esprimere Fas ligando e altri fattori citotossici che promuovono citolisi e apoptosi delle cellule bersaglio. I linfociti T regolatori producono il fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ) e IL-10, con effetti antinfiammatori. I linfociti B2 promuovono la produzione di citochine proinfiammatorie, mentre i linfociti B1 possono secernere anticorpi naturali che proteggono dall'aterosclerosi.

Le strie lipidiche sono rappresentate da depositi subendoteliali di macrofagi infarciti di

lipidi. L'ateroma nascente si sviluppa quindi sotto l'influenza di vari fattori di crescita come il TGF- $\beta$  ed il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), che stimolano la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media all'intima e la loro deposizione di matrice extracellulare, che forma un cappuccio fibroso per la placca aterosclerotica. Le cellule muscolari lisce migrate a livello dell'intima presentano un diverso fenotipo, contengono meno fibre contrattili e più reticolo endoplasmatico rugoso, ed esprimono livelli più alti di isoforme embrionali di miosina. La stria lipidica, pertanto, è evoluta in lesione fibro-lipidica. La reazione infiammatoria locale provoca il rilascio di MMP, che porta alla perdita di endotelio a causa della degradazione della membrana basale subendoteliale, e all'indebolimento del cappuccio fibroso, con possibile rottura della placca e conseguente esposizione del fattore tissutale trombogenico nel nucleo lipidico ai fattori di coagulazione nelle cellule, portando alla trombosi nel vaso sanguigno. Crescendo, le placche aterosclerotiche grazie a fattori di crescita come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), possono sviluppare una propria microcircolazione, che consente la crescita della placca e la rende più friabile e predisposta alla rottura. Inoltre, attraverso l'aumentata secrezione di alcune citochine come le proteine morfogenetiche ossee, può verificarsi calcificazione della placca ateromasica; infine, durante l'aterogenesi, può verificarsi la morte cellulare delle cellule muscolari lisce sia per apoptosi che per mezzo dei linfociti T CD8+, dando luogo ad una capsula fibrosa relativamente acellulare<sup>(81)</sup>.

## Il ruolo dell'interazione LDL ossidate-LOX-1 nell'aterogenesi

Le LDL ossidate inibiscono l'espressione dell'eNOS, contribuiscono alla generazione di ROS dalle cellule muscolari lisce e dai macrofagi ed inducono l'espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali, la proliferazione dei macrofagi, la migrazione delle cellule muscolari lisce, la produzione di collagene e l'attivazione piastrinica.

I recettori *scavenger*, di cui sono state identificate otto classi (A-H), sono un gruppo di recettori che fanno parte dell'immunità innata, in grado di legarsi a vari ligandi, compresi organismi patogeni e proteine self modificate. Con l'eccezione di SCARA-5 (classe A) e LAMP (classe D), tutti i recettori scavenger sono in grado di legarsi alle LDL modificate. SR-A (tipo I e II) e CD-36 contribuiscono fino al 75-90% dell'assorbimento di LDL ossidate, ed insieme a LOX-1 sono coinvolti nella formazione di cellule schiumose. Oltre alla captazione delle LDL ossidate, SR-A media anche l'adesione dei macrofagi alla matrice extracellulare e CD36 l'adesione tra i macrofagi e le piastrine attivate e il collagene.

La proteina LOX-1 umana è codificata dal gene del recettore 1 delle LDL ossidate (OLR1) nel *cluster* genico della lectina di tipo C nel cromosoma 12. LOX-1 è un membro della famiglia dei recettori *scavenger* di classe E, che è stato inizialmente identificato nelle cellule endoteliali aortiche bovine e successivamente riscontrato in una varietà di altre cellule come macrofagi, cellule muscolari lisce vascolari, piastrine, fibroblasti e cardiomiociti. È rappresentato da una glicoproteina transmembrana di 50kDa, costituita da un collo citoplasmatico, una regione transmembrana e domini extracellulari. Il dominio extracellulare della proteina LOX-1, quando viene scisso dalla regione del collo, forma il LOX-1 solubile (sLOX-1).

LOX-1 ha un ruolo cruciale nell'aterogenesi, essendo coinvolto nel legame, nell'internalizzazione e nella degradazione delle LDL ossidate; inoltre, contribuisce alla disfunzione endoteliale, all'apoptosi, alla migrazione dei monociti, alla differenziazione dei macrofagi, alla proliferazione e migrazione della muscolatura liscia e all'instabilità della placca<sup>(82)</sup>.

## La via di segnalazione di LOX-1 ed i suoi effetti

L'attivazione di LOX-1 innesca diverse vie di segnalazione a valle. LOX-1 si lega a MMP14 ed attiva RhoA e Rac1. RhoA inibisce la sintesi endoteliale di NO, mentre Rac1 aumenta l'attività della NADPH ossidasi, con conseguente produzione di ROS e stress ossidativo. L'esposizione delle cellule endoteliali ad alti livelli di LDL ossidate fosforila p66<sup>shc</sup>, un enzima *redox* coinvolto nella produzione mitocondriale di ROS e nel danno al DNA mitocondriale. Gli enzimi NADPH ossidasi (Nox) sono una fonte importante di ROS nei tessuti vascolari. L'isoforma Nox2 è localizzata principalmente nei monociti e forma un complesso attivo con le subunità p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, e p67<sup>phox</sup>. D'altra parte, Nox4 è espresso nelle cellule endoteliali e forma un complesso con p22<sup>phox</sup>. La formazione di ROS indotta dalle LDL ossidate è favorita dall'induzione di Nox2, Nox4 e p47<sup>phox</sup>. La delezione di LOX-1 nei topi alimentati con dieta ad alto contenuto di colesterolo e grassi diminuisce l'espressione di Nox2, Nox4, p22<sup>phox</sup> e p47<sup>phox</sup><sup>(83)</sup>.

NF-κB è attivato dalle LDL ossidate attraverso LOX-1, ed attiva a sua volta le vie proinfiammatorie e LOX-1 (LOX-1 ha difatti un sito di legame per NF-κB nella regione 5'), formando così un circolo vizioso di aumentato assorbimento di LDL ossidate attraverso il LOX-1 attivato, aumentata produzione di ROS ed aumentata espressione dei recettori LOX-1. Dunque le LDL ossidate aumentano l'espressione di LOX-1 attraverso NF-κB, portando ad un vizioso ciclo di *signaling* proinfiammatorio. L'interazione tra LDL ossidate e LOX-1 determina un aumento della produzione di molecole d'adesione come VCAM-1 e citochine come MCP-1, che portano all'adesione dei monociti alle cellule endoteliali. Il legame LDL ossidate-LOX-1 porta inoltre alla fosforilazione della proteinchinasi attivata dal mitogeno (MAPK) e induce l'apoptosi. Le LDL ossidate provocano l'attivazione della proteina chinasi C e svolgono un ruolo critico nell'espressione delle MMP. L'induzione di LOX-1 riduce anche la fosforilazione della proteina chinasi B (PKB), che è coinvolta nell'attivazione di eNOS mediante la sua fosforilazione. Così, la diminuzione della fosforilazione di PKB diminuisce la produzione di NO a causa della diminuita attivazione dell'eNOS. L'aumentata espressione della proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) aumenta la captazione di LDL ossidate mediata da LOX-1. LPS aumenta l'espressione di LOX-1 ed i livelli di PCSK9 nelle cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari umane. I dati da topi *knockout* per geni e studi di trasfezione di siRNA hanno dimostrato che LOX-1 e PCSK9 aumentano l'espressione genica l'uno dell'altro.

La rapamicina, inibitore di mTOR, regola negativamente LOX-1 interferendo con le interazioni del *signaling* tra mTOR, LOX-1 e NF-κB. L'inibizione della rapamicina e di LOX-1 è associata ad una diminuzione dell'autofagia. Inoltre, LOX-1 è coinvolto nell'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 (*Nod, LRR and pyrin domain-containing protein 3*) e nell'aumentata dell'espressione dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE).

Il legame di LDL ossidate a LOX-1 provoca la rapida internalizzazione del complesso recettore-ligando nella cellula. In base al tipo di cellula in cui si verifica questa interazione, la segnalazione a valle porta a vari effetti<sup>(82)</sup>.

## Cellule endoteliali

Attraverso LOX-1, le LDL ossidate provocano disfunzione endoteliale attraverso molteplici vie. L'interazione LDL ossidate-LOX-1 attiva MAPK, causando un aumento dell'espressione di MCP-1 e delle molecole di adesione come VCAM-1 e ICAM-1, e promuovendo la migrazione e differenziazione dei monociti a macrofagi e la generazione di vasocostrittori come l'ACE e l'endotelina-1. Le LDL ossidate attivano inoltre tramite LOX-1 NF- $\kappa$ B, che a sua volta aumenta l'espressione di TNF-alfa, molecole d'adesione e LOX-1 nelle cellule endoteliali. Le LDL ossidate upregolano il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R); in questo processo l'attivazione del *pathway* di NF- $\kappa$ B sembra svolgere un ruolo importante nella trasduzione del segnale<sup>(84)</sup>. Le LDL ossidate mediante LOX-1 aumentano l'attività della NADPH ossidasi, con incrementata produzione di ROS ed inattivazione dell'NO, e allo stesso tempo provocano la disfunzione dell'eNOS spostandolo dal sito della membrana alveolare ed attivando l'arginasi II, che a sua volta downregola eNOS a causa della competizione per il suo substrato comune L-arginina.

Le LDL ossidate aumentano anche la sintesi di MMP-1, MMP-3 e MMP-9, causando uno squilibrio nelle MMP nelle cellule endoteliali, contribuendo all'aumento della degradazione del cappuccio fibroso ed alla predisposizione alla rottura della placca aterosclerotica.

Le LDL ossidate promuovono l'apoptosi delle cellule endoteliali sia mediante la via intrinseca che estrinseca. Difatti, le LDL ossidate attivano la caspasi-3 e la caspasi-9 nella via apoptotica intrinseca e inibiscono proteine antiapoptotiche come la *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e l'inibitore cellulare dell'apoptosi proteina 1 (c-IAP-2); regolano inoltre positivamente l'espressione di Fas nella via apoptotica estrinseca sulla superficie delle cellule endoteliali, portando così all'apoptosi Fas mediata<sup>(82)</sup>.

## Macrofagi

In circostanze normali, LOX-1 espresso nei macrofagi contribuisce al 5-10% della captazione delle LDL ossidate. Tuttavia, negli stati proinfiammatori e in condizioni di iperglicemia, l'espressione di LOX-1 è aumentata, arrivando al 40% dell'assorbimento delle LDL ossidate da parte dei macrofagi.

Attraverso LOX-1, le LDL ossidate modulano le proteasi cellule dipendenti come le calpaine, provocano un aumento dell'adesione dei macrofagi e della concentrazione di calcio nelle cellule ed un'inibizione della migrazione dei macrofagi, funzioni reversibili con la delezione di LOX-1.

Yang *et al.* inoltre hanno mostrato, utilizzando la tecnologia degli *small interfering RNA* (siRNA), che le LDL ossidate determinano un aumento della produzione di ROS ed una diminuzione dell'attività della superossido dismutasi nei macrofagi a livello cellulare, contribuendo così all'apoptosi. LOX-1 siRNA è stato in grado di invertire significativamente i parametri dello stress ossidativo.

## Cellule muscolari lisce

LOX-1 è espresso sulle membrane cellulari delle cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni e come nelle cellule endoteliali e nei macrofagi è upregolato negli stati infiammatori in risposta a citochine proinfiammatorie. Le LDL ossidate inducono il rilascio di fattori di crescita come il fattore di crescita insulino simile (IGF-1), PDGF e il fattore di crescita epidermico (EGF), portando alla proliferazione delle cellule

muscolari lisce vascolari, e sopprimono l'espressione di miR-141, che a sua volta promuove la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari. È stato dimostrato che il miRNA let-7g, che inibisce il gene LOX-1, riduce la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari mediata dalle LDL ossidate.

Le cellule muscolari lisce vascolari possono anche formare cellule schiumose attraverso l'accumulo di goccioline lipidiche. L'anticorpo anti-LOX-1 può ridurre significativamente l'assorbimento di LDL ossidate e la formazione di cellule schiumose a partire dalle cellule muscolari lisce vascolari. Elevate concentrazioni di LDL ossidate aumentano inoltre l'espressione di proteine proapoptotiche come la proteina X associata a bcl-2 (Bax), causando l'apoptosi delle cellule muscolari lisce vascolari. L'apoptosi nelle cellule muscolari lisce vascolari porta all'instabilità e rottura della placca aterosclerotica. Questi effetti sono mediati in gran parte da LOX-1<sup>(82)</sup>.

## Piastrine e fibroblasti

L'espressione di LOX-1 sulle piastrine avviene in modo attivazione dipendente, a differenza di altri recettori *scavenger* come ad esempio CD36 che sono espressi costitutivamente. Nelle piastrine attivate, LOX-1 media il legame e l'internalizzazione di LDL ossidate ed induce l'espressione delle molecole di adesione piastriniche e la formazione di cellule schiumose. Le piastrine contribuiscono anche alla disfunzione endoteliale inducendo l'endotelina-1, attraverso le interazioni con LOX-1 e CD40. Attraverso LOX-1, le LDL ossidate possono causare instabilità della placca attraverso il rilascio dell'induttore extracellulare di MMP CD147. LOX-1 è importante nella formazione di trombi, contribuendo all'attivazione ADP-indotta dei recettori del fibrinogeno, come le integrine  $\alpha$ Ibb3 e  $\alpha$ 2b1. L'anticorpo anti-LOX-1 inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da ADP. È stato anche dimostrato che l'aspirina e le statine riducono l'espressione di LOX-1 nelle piastrine.

L'espressione di LOX-1 nei fibroblasti contribuisce alla formazione del collagene. Nei fibroblasti difatti, è stato dimostrato che l'anticorpo anti-LOX-1 riduce gli effetti della sintesi di collagene mediata dal TGF-beta. Inoltre, la delezione di LOX-1 nei topi *knockout* per il recettore LDL riduce l'accumulo di collagene nella placca<sup>(82,83)</sup>.

## Benefici dell'eliminazione di LOX-1 nell'aterosclerosi e nell'ischemia miocardica

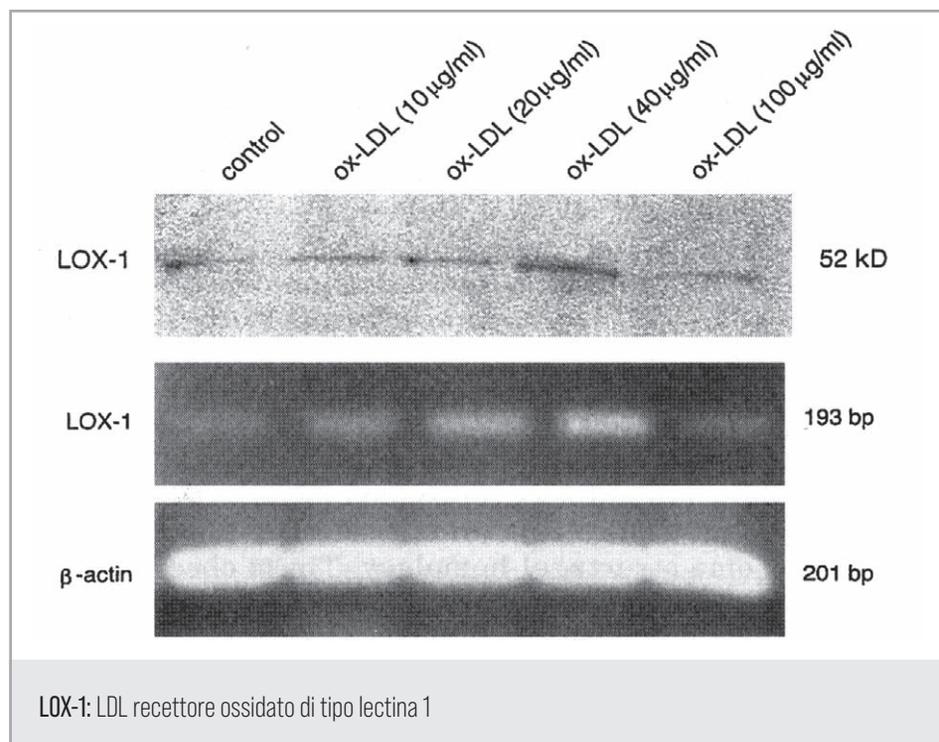
La prova dei benefici dell'eliminazione di LOX-1 è venuta dallo studio di Hinagata *et al.* in un modello murino di iperplasia neointimale dopo una lesione arteriosa con palloncino. Mehta *et al.*<sup>(85)</sup> hanno mostrato che la delezione del gene LOX-1 è associata ad una diminuzione dello stress ossidativo, della risposta infiammatoria, della degradazione dell'NO e dell'aterosclerosi nei topi privi di recettori LDL sottoposti a dieta ricca di colesterolo per 18 settimane. In un altro studio di Hu *et al.*, la delezione di LOX-1 nei topi nulli per il recettore LDL riduceva la formazione di collagene nelle regioni aterosclerotiche<sup>(83)</sup>.

Oltre all'aterosclerosi, alcuni studi hanno dimostrato il beneficio della terapia anti-LOX-1 nell'ischemia miocardica. In uno studio di Li *et al.*<sup>(86)</sup>, un precedente trattamento con l'anticorpo LOX-1 era associato a una diminuzione dell'infiammazione, dell'apoptosi e delle dimensioni dell'infarto del miocardio. LOX-1 è stato anche implicato nella deposizione di collagene che porta alla formazione e al rimodellamento

della cicatrice nel cuore ischemico. Lu *et al.* hanno mostrato che la delezione del gene LOX-1, nei topi sottoposti a legatura permanente dell'arteria coronaria, riduce i segnali di rimodellamento cardiaco, con conseguente contrattilità cardiaca preservata dopo un'ischemia miocardica sostenuta e miglioramento della sopravvivenza globale.

## Regolazione di LOX-1

L'espressione di LOX-1 è bassa in condizioni fisiologiche normali. Tuttavia, in presenza di un ambiente infiammatorio, si verifica un'incrementata trascrizione e traduzione del gene LOX-1. Le LDL ossidate sono il più potente attivatore di LOX-1 (Figura 2). Mediatori come l'angiotensina II (attraverso l'attivazione del recettore ATR1)<sup>(87)</sup>, le citochine, l'IFN- $\gamma$ , la lisofosfatidilcolina, i ROS, lo stress di parete ed i prodotti finali di glicazione avanzata (*advanced glycation end-product*, AGE), e condizioni come diabete mellito, ipertensione, dislipidemia, obesità, danno da ischemia-riperfusion, stress psicologico e infezione da HIV aumentano l'espressione di LOX-1. Il legame di LDL ossidate a LOX-1 attiva NF- $\kappa$ B, che si lega al lato 5' di LOX-1 ed attiva a sua volta l'espressione di LOX-1. Il legame di LDL ossidate a LOX-1 si traduce inoltre in una maggiore espressione di molecole di adesione come VCAM-1 e MCP-1, che a loro volta determinano aumentata espressione di LOX-1 a livello delle cellule endoteliali, formando un ciclo che si autoalimenta tra LDL ossidate, LOX-1 e NF- $\kappa$ B. Altre molecole pro-infiammatorie e pro-aterogeniche come IL-1, IL-6 e TNF-alfa aumentano l'espressione di LOX-1 nelle cellule muscolari lisce vascolari. Inoltre, l'attivazione di LOX-1 accentua lo stress ossidativo, con conseguente maggiore formazione di LDL ossidate, ed autoamplificazione del ciclo. Alcuni agenti infettivi come *Chlamydia*, *H. pylori* e *Citomegalovirus*, che sono stati implicati nella aterosclerosi, sono in grado di



**Figura 2.** Upregolazione del LOX-1 da parte delle LDL ossidate (ox-LDL). Modificata da Mehta JL, Li D. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:511-4

aumentare i livelli di sLOX-1 e l'endocitosi delle LDL ossidate diretta da LOX-1 nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana<sup>(88)</sup>.

Oltre all'infiammazione e ad agenti infettivi, l'espressione di LOX-1 è regolata da diversi meccanismi epigenetici. Diversi studi hanno dimostrato che vari microRNA come miR-155, miR-590-5P e let-7 g regolano l'espressione di LOX-1. Le LDL ossidate inoltre regolano negativamente la metilazione del DNA del promotore di LOX-1, riducendo la soppressione della trascrizione ed aumentando così la produzione di LOX-1. Analogamente, l'esposizione delle cellule endoteliali all'omocisteina (come ad esempio nell'iperomocisteinemia) riduce l'attività della DNA metiltransferasi ed aumenta l'espressione di LOX-1, reversibile con la terapia con l'acido folico; possono inoltre peggiorare l'infiammazione attraverso l'acetilazione dell'istone e la conseguente regolazione positiva della produzione di IL-8 e MCP-1. Al contrario, la sirtuina 1 provoca l'istone deacetilazione di NF-κB e downregola l'espressione di LOX-1.

Mentrup *et al.* in un recente studio hanno mostrato che il *signaling* di LOX-1 è controllato anche da proteasi intramembrana come il peptide segnale peptidasi-simile 2a e b (SPPL2a/b), che sono coinvolti nella proteolisi regolata intramembrana e scindono i frammenti N-terminali di LOX-1, che sono in grado di attivare la via delle MAP chinasi indipendentemente dai ligandi di LOX-1, senza attivare la via di NF-κB. Stancel *et al.* hanno proposto che la proteina C-reattiva (PCR) e LOX-1 formino un meccanismo ciclico con le LDL ossidate nell'aterogenesi. La PCR è un ligando di LOX-1 ed aumenta la permeabilità vascolare, altera la funzione vasodilatatrice endotelio-dipendente e svolge un ruolo nell'adesione tra cellula endoteliale e monociti. La PCR, tramite FcγRI/CD64 e FcγRIIa/CD32, aumenta l'espressione di LOX-1. Inoltre, LDL ossidate e plasma L5, attraverso un meccanismo dipendente da LOX-1, aumentano il rilascio di PCR dalle cellule endoteliali aortiche umane. Quando il gene OLR1 che codifica per la proteina LOX-1 va incontro ad eventi di *splicing* alternativo, genera tre varianti, OLR1, OLR1D4 e LOXIN. La variante LOXIN non presenta l'esone 5 e i due terzi del dominio funzionale, svolgendo un ruolo protettivo in patologie correlate con overespressione di LOX-1 come l'aterosclerosi ed i tumori<sup>(89)</sup>.

## LOX-1 come *marker* diagnostico

La porzione extracellulare del recettore LOX-1 può essere scissa grazie all'azione delle metalloproteinasi ADAM10, formando sLOX-1. sLOX-1 è stato investigato come possibile *marker* diagnostico in varie malattie cardiovascolari. In letteratura sono presenti studi che hanno evidenziato il ruolo di sLOX-1 come predittore precoce di disfunzione endoteliale nella sindrome metabolica, inoltre elevati livelli elevati di sLOX-1 sono stati associati a ipertensione, diabete mellito di tipo 2 e fumo. In uno studio di Hayashida *et al.* i livelli di sLOX-1 sono risultati significativamente più alti nei pazienti con sindrome coronarica acuta, con un picco più precoce rispetto alla troponina T e con livelli più alti nella circolazione coronarica rispetto a quella sistemica, suggerendo un'origine dalla circolazione coronarica. Dunque, sLOX-1 potrebbe essere considerato un *marker* precoce di instabilità della placca. I livelli di sLOX-1 sono risultati più alti anche nei pazienti sottoposti a rivascolarizzazione percutanea per angina stabile che successivamente hanno sviluppato infarto miocardico peri-procedurale legato alla procedura<sup>(82)</sup>. Ulteriori studi su larga scala sono necessari prima di poter applicare sLOX-1 come *marker* diagnostico di malattie cardiovascolari nella pratica clinica.

## Inibitori LOX-1

In considerazione del suo ruolo cruciale in molteplici *pathway* nell'aterogenesi e nelle malattie ad essa correlate, LOX-1 è considerato un potenziale bersaglio terapeutico. Molte delle attuali terapie come l'aspirina, le statine e gli ipoglicemizzanti orali esercitano effetti indiretti sull'espressione di LOX-1. In uno studio di Li *et al.*<sup>(90)</sup> è stato mostrato come le statine, in particolare atorvastatina e simvastatina, sono in grado di ridurre l'espressione di LOX-1 e delle molecole d'adesione VCAM1, ICAM1, E-selectina e P-selectina a livello delle cellule endoteliali delle arterie coronarie umane, riducendo l'attivazione del *pathway* di NF-kB. Inoltre, queste statine sono in grado di esercitare un effetto cardioprotettivo anche grazie ad un'upregolazione dell'eNOS, mediante un effetto inibitorio sull'espressione di LOX-1 e sull'attivazione della via delle MAPK<sup>(91)</sup>. Numerosi composti presenti in natura ed erbe vegetali hanno proprietà antiossidanti e sono in grado di ridurre l'espressione di LOX-1 e la generazione di ROS, come ad esempio l'estratto di Ginkgo biloba, la curcumina, il succo di bergamotto, l'acido ellagico, il resveratrolo, il tanshionone II-A, la berberina, il diidrotanshinone I e la quercetina<sup>(82)</sup>. Attualmente sono in fase di sviluppo farmaci disegnati sulla struttura, modulatori sintetici LOX-1 basati su tecniche di interferenza dell'RNA, e anticorpi monoclonali. Nella struttura di LOX-1, c'è un *tunnel* idrofobico che funge da sito di legame primario per la frazione fosfolipidica di LDL ossidate. Le molecole che si legano in questo *tunnel* impediscono l'interazione di LDL ossidate e LOX-1 e pertanto sono attualmente in corso di studio, un esempio è PLAzPC sviluppata da Falconi *et al.* Let7g miRNA è stato usato per inibire l'espressione di LOX-1 e l'assorbimento di LDL ossidate nelle cellule muscolari lisce aortiche umane<sup>(92)</sup>. Piccoli RNA interferenti, come l'antisense OLR1, hanno dimostrato di regolare negativamente l'mRNA e l'espressione proteica di LOX-1. Lo sviluppo di anticorpi monoclonali contro LOX-1 rappresenta una sfida a causa del dominio lectinico di tipo C di LOX-1 altamente conservato tra le specie di mammiferi<sup>(93)</sup>. Gli studi con anticorpi chimerici pollo-umano hanno dimostrato la capacità di inibire gli effetti di LOX-1 e ridurre l'assorbimento di anticorpi chimerici pollo-umano. Ulteriori studi sono in corso per sviluppare queste molecole chimeriche, che possono essere utilizzate per uso clinico.

## Conclusioni

La malattia aterosclerotica è una malattia infiammatoria che riconosce come “*injury*” iniziale l'azione delle LDL ossidate, che tramite il legame con il recettore LOX-1 svolgono un ruolo critico nell'aterogenesi<sup>(94)</sup>, esercitando effetti su più tipi cellulari, come cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vascolari, fibroblasti, macrofagi e piastrine, contribuendo alla disfunzione endoteliale, all'apoptosi, alla migrazione dei monociti, alla differenziazione dei macrofagi, alla proliferazione e migrazione della muscolatura liscia e all'instabilità della placca. LOX-1 rappresenta un possibile *link* tra aterosclerosi e ipertensione arteriosa, nonché tra aterosclerosi, infiammazione e tumori. La regolazione dello splicing di OLR1 e il *pattern* di espressione delle isoforme di *splicing* alternativo di OLR1 nei tumori e nell'aterosclerosi richiedono ulteriori studi. Il recettore sLOX-1 è attualmente in corso di studio come potenziale biomarcatore per le malattie cardiovascolari. Inoltre, sono in corso studi per valutare l'uso di LOX-1 come bersaglio terapeutico per modificare il processo aterosclerotico e le malattie ad esso correlate.



# Dislipidemia e danno vascolare

C5

Marco Matteo Ciccone, Pietro Scicchitano,  
Stefania Rizzo, Cristina Basso

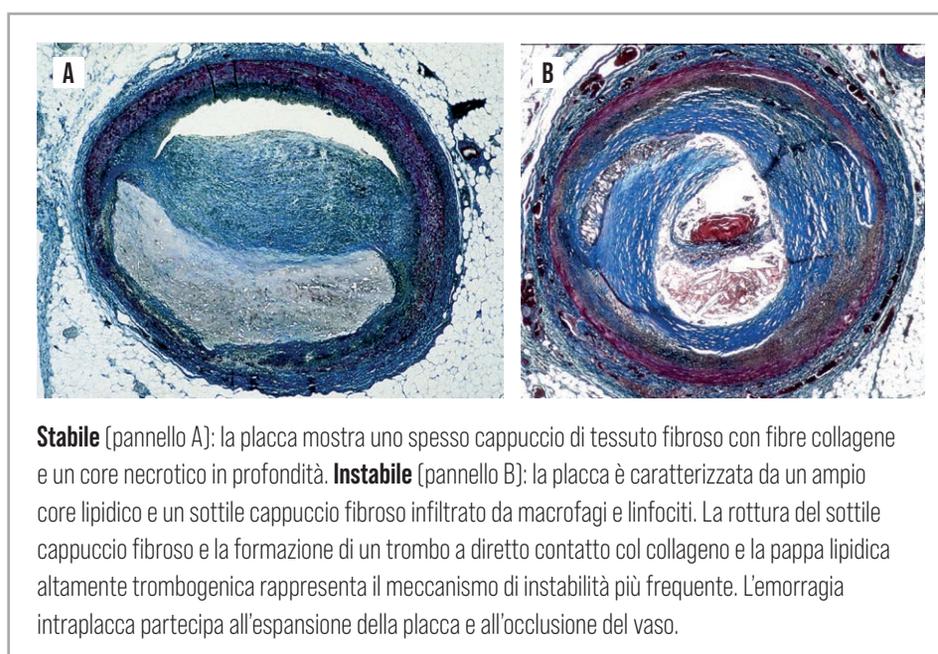
L'aterosclerosi rappresenta la patologia più diffusa a livello globale nonché la principale causa di morte<sup>(77,95)</sup>. Il carattere infiammatorio sistemico del processo aterosclerotico rende conto della sua capacità di danneggiare tutti i vasi dell'organismo, non solo quelli coronarici. Le recenti linee guida europee sul *management* delle arteriopatie periferiche hanno posto l'attenzione proprio sull'aspetto "sistemico" della patologia aterosclerotica e sulla necessità di indagare precipuamente tutti i distretti periferici al fine di ottimizzare l'inquadramento clinico-prognostico del paziente e la sua probabilità di andare incontro ad eventi acuti cardiovascolari (CV), infarto e *stroke* su tutti<sup>(96)</sup>. Determinanti essenziali dell'aterosclerosi sono rappresentati dai maggiori fattori di rischio CV: prescindendo da quelli non modificabili (età, sesso, familiarità), un focus particolare viene essenzialmente posto su quelli modificabili come ipertensione arteriosa, diabete mellito, abitudine tabagica e dislipidemia. Le alterazioni del metabolismo lipidico rappresentano il più importante "*primum movens*" nelle alterazioni vascolari che conducono alla genesi della placca aterosclerotica. Nella placca aterosclerotica, per disfunzione endoteliale, si ha un progressivo accumulo di colesterolo, macrofagi schiumosi, cellule muscolari lisce e prodotti ossidativi a livello intimale, con successivo rimodellamento della media e dell'avventizia<sup>(97,98)</sup>. La placca aterosclerotica si accresce fino a determinare ostruzione del lume vascolare e ostacolo al flusso ematico, con sviluppo successivo di ischemia che dipendono dall'entità dell'ostruzione, dalla rapidità di sviluppo (acuta o cronica) e dalla presenza di circoli collaterali. Nel cuore le più comuni entità cliniche sono rappresentate dall'angina stabile e dalle sindromi coronariche acute. L'aterosclerosi è una malattia lunga e silente che rimane asintomatica per un lungo periodo di tempo e che si manifesta nell'arco di anni o decenni dall'iniziale deposito lipidico nell'intima dei vasi.

I sintomi si rendono evidenti quando l'ostruzione del lume vascolare è superiore o uguale al 70% (soglia critica di stenosi), con discrepanza fra domanda da parte del miocardio e capacità di apporto di ossigeno. Il primo sintomo può essere l'infarto miocardico o la morte improvvisa per occlusione acuta del lume residuo da parte di un trombo o per vasospasmo<sup>(99)</sup>.

La placca aterosclerotica consiste di un rilievo intimale in genere fibro-ateromasico, ovvero con una pappia lipidica in profondità (ateroma o core lipidico) e un cappuccio fibroso sovrastante che separa l'ateroma dal lume (100) (Figura 1A). La placca stabile è la placca aterosclerotica a lenta crescita, con stenosi fissa e ostacolo meccanico alla progressione ematica, senza un contributo funzionale (vasospasmo). Con il tempo il

“core lipidico” della placca (ateroma) aumenta di volume, per progressivo accumulo di lipidi e apoptosi delle cellule schiumose, mentre il cappuccio fibroso diventa sempre più sottile, per lisi del collagene da parte di metalloproteasi (collagenasi), liberate dai macrofagi. Siamo di fronte alla placca vulnerabile, a rischio di rottura e delle potenziali complicanze trombotiche, quindi di infarto miocardico e morte improvvisa coronarica. Altri fattori di instabilità di placca sono la presenza di calcificazioni, in forma sia puntiformi a livello del cappuccio fibroso dove aumentano lo stress meccanico e predispongono alla rottura, che come noduli calcifici in placche avanzate, che affiorano sulla superficie endoteliale e possono scatenare una trombosi; e la neoangiogenesi, a rischio di emorragia intraplacca ed espansione del volume della placca, e anche via di ingresso di nuove cellule infiammatorie, ulteriore fattore di vulnerabilità. Da sottolineare è che le placche vulnerabili sono in genere non ostruttive (stenosi <70%) per un fenomeno di rimodellamento positivo della parete arteriosa, per cui possono essere valutate come angiograficamente non significative, sono silenziose e non determinano lo sviluppo di circoli collaterali. La severità della stenosi del lume non è quindi un parametro sufficiente per stimare il rischio di eventi acuti. La placca instabile, infine, è quella placca aterosclerotica con improvvisa alterazione della struttura e dell'entità della stenosi, per rottura del cappuccio fibroso (due terzi dei casi), erosione (un terzo dei casi) e affioramento di noduli calcifici, come prima descritto (in <5% dei casi). La condizione più frequente è la rottura di un sottile cappuccio fibroso per il rilascio da parte delle di collagenasi in un contesto di flogosi acuta con successiva trombosi sovrapposta (Figura 1B). In questo caso il collagene e il core lipidico, altamente trombogenici, vengono esposti direttamente al sangue. Si ha inoltre emorragia di placca, per entrata nell'ateroma di sangue, che contribuisce ad aumentare il volume della placca e ad ostruire, insieme alla trombosi, il segmento coronarico affetto<sup>(101)</sup>.

Nel caso dell'erosione si verifica una disendotelizzazione in corrispondenza di una placca con spesso cappuccio fibroso, perfino privo di ateroma con trombosi coronarica



**Figura 1.** Placca aterosclerotica

occlusiva in assenza di una rottura di placca. Tale complicità è imprevedibile, non solo perché la placca sottostante spesso non causa stenosi critica, ma soprattutto perché in termini di composizione tissutale non si tratta di una placca vulnerabile. I meccanismi responsabili dell'erosione endoteliale possono essere vari e oggi sono estesamente studiati (danno endoteliale da attacco ipertensivo? endotelite per flogosi immunitaria o infettiva? vasospasmo con danno endoteliale?)<sup>(101,102)</sup>. Più raramente, un nodulo calcifico che affiora sulla superficie endoteliale può dare inizio alla formazione del trombo.

Da ricordare, infine, è che l'instabilità di placca può avere un mero meccanismo funzionale da vasospasmo sopraggiunto per contrazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media e stenosi critica-occlusiva transitoria. Recenti evidenze mostrano come anche le cellule muscolari lisce dell'intima mantengono un fenotipo contrattile che potrebbe contribuire al vasospasmo e all'ischemia transitoria<sup>(103,104)</sup>. La necessità di identificare precocemente la placca aterosclerotica è fondamentale al fine di inquadrare il rischio CV individuale nonché permettere di identificare le forme di lesioni aterosclerotiche che potrebbero rivelarsi a più alto rischio di rottura. Nel corso del tempo sono state messe a punto innumerevoli tecniche di *imaging* non invasivo e biomarcatori umorali che cercano di identificare le alterazioni vascolari precoci.

Lo studio delle carotidi, la valutazione della funzione endoteliale (*flow mediated dilation*, FMD), il diametro antero-posteriore dell'aorta addominale infrarenale (APAO) e biomarcatori come il *suppressor of tumorigenicity* solubile (sST2) o i miRNAs sono solo alcuni degli strumenti a nostra disposizione per l'inquadramento del profilo vascolare aterosclerotico del paziente.

La deregolazione del metabolismo lipidico favorisce la progressione dell'alterazione della funzione e morfologia dei vasi arteriosi e le tecniche/biomarcatori sopra indicati sono in grado di identificare minimi sovertimenti. È noto, infatti, che l'endotelio è in grado di presiedere ad una innumerevole serie di attività che vanno dalla regolazione dei processi di vasodilatazione/vasocostrizione, alla modulazione dei processi di adesione, infiltrazione e migrazione leucocitaria, nonché di rimodellamento dei vasi<sup>(105)</sup>. Le cellule endoteliali sono in grado di rilasciare ossido nitrico (NO), una molecola fondamentale per la dilatazione vascolare in relazione alle esigenze metaboliche organiche. La dislipidemia, come d'altronde altri fattori di rischio CV, è in grado di alterare questa capacità delle cellule endoteliali<sup>(105-107)</sup>. Le lipoproteine a bassa densità (*low density lipoproteins*, LDL) sembrano avere una particolare affinità per i proteoglicani delle pareti arteriose e ciò promuove la ritenzione subendoteliale di queste particelle: ciò diventa premessa per la precoce alterazione della funzione endoteliale che si esprime, metodologicamente parlando, in anomalie della vasodilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale<sup>(106,108)</sup>. D'altro canto, pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare presentano ridotti valori di FMD (circa -2%) e più alti di spessore medio-intimale carotideo (cIMT) e spessore intima-media femorale rispetto a soggetti normolipemici del tutto correlabili alle concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale e legato a LDL<sup>(109)</sup>. Per questo motivo l'uso di statine e il ridimensionamento dei livelli di colesterolo promosso da tali farmaci determina un reale miglioramento della funzione endoteliale<sup>(110,111)</sup>. In realtà, le alterazioni del metabolismo lipidico non sono in grado di determinare una precoce disfunzione endoteliale, ovvero una alterazione funzionale dell'epitelio di rivestimento dei vasi. Le dislipidemie alterano nettamente il profilo morfologico della parete vascolare. In questo senso, il progressivo ed incontrollato incremento delle concentrazioni

plasmatiche dei lipidi è notoriamente correlato con lo sviluppo di un incremento del cIMT e, successivamente, con la comparsa di vere e proprie placche carotidee<sup>(112)</sup>. È stato calcolato che il rischio di comparsa di placca carotidea aumenta del 24% e del 62% per ogni incremento di 1 mmol/L nei livelli plasmatici di colesterolo totale e LDL, rispettivamente<sup>(113)</sup>.

La rilevazione di alterazioni morfo-funzionali in pazienti dislipidemici non è un puro esercizio clinico di valutazione del paziente. La presenza di placche aterosclerotiche carotidee è strettamente correlata con il riscontro di lesioni aterosclerotiche coronariche. Se è vero che valori incrementati di cIMT sono correlati con alterazioni strutturali cardiache come l'indice di massa ventricolare sinistra<sup>(114)</sup>, è anche reale che la presenza di placche carotidee e di un incremento del cIMT si lega ad un numero di vasi coronarici coinvolti dal processo aterosclerotico, ergo di eventi CV avversi<sup>(114-116)</sup>. La presenza di placche aterosclerotiche, infatti, aumenta di 2-3 volte il rischio di eventi CV futuri<sup>(117,118)</sup>. In tutto questo, un ruolo predominante è rivestito dalla morfologia della placca carotidea: placche anecogene, altamente infiammate e con un largo core lipidico rappresentano elementi particolarmente instabili e prone alla degenerazione ed all'evento cerebro-cardiovascolare<sup>(118)</sup>.

Il problema sostanziale, dunque, è comprendere se vi sono biomarcatori in grado di predire l'instabilità di placca. Al di là della predittività prognostica della placca carotidea, del cIMT o dell'FMD in termini di occorrenza di eventi CV futuri, una delle più annose questioni aperte in ambito di prevenzione CV è proprio la ricerca di un parametro in grado di identificare l'alterazione aterosclerotica che risulta maggiormente in grado di degenerare e provocare un evento acuto. L'sST2 può effettivamente rappresentare un ottimo biomarcatore in tal senso<sup>(119)</sup>. sST2 rappresenta la forma libera, plasmatica del recettore dell'interleuchina-33 ed agisce come *decoy receptor* per questa proteina. Generalmente aumenta in condizioni di sovraccarico meccanico ventricolare sinistro in quanto lo stiramento delle fibre miocardiche favorisce la produzione di questo recettore<sup>(119)</sup>. È stato osservato che, in pazienti sottoposti a tromboendarterectomia carotidea, le concentrazioni di ST2L – la forma di ST2 presente sulla membrana cellulare – rilevabili sulla membrana dei macrofagi delle placche carotidee aterosclerotiche sono elevati in pazienti sintomatici per patologie cerebro-vascolari<sup>(120)</sup>. Zhang *et al.*<sup>(121)</sup> hanno osservato una correlazione tra livelli plasmatici di sST2 ed estensione e complessità delle lesioni aterosclerotiche coronariche. D'altro canto i livelli plasmatici di sST2 sono associati alle concentrazioni plasmatiche di P-selectina e all'espressione monocitaria di fattore tissutale in pazienti con arteriopatia periferica<sup>(122)</sup>, ovvero con sostanze correlate con la progressione aterosclerotica. Ciò rende conto della correlazione che sussiste tra sST2, eventi CV maggiori a lungo termine e morte da tutte le cause in pazienti con coronaropatia<sup>(123)</sup>. L'alterazione del metabolismo lipidico determina un sovvertimento del rapporto reciproco che sussiste tra metalloproteinasi della matrice (MMP) ed i loro relativi inibitori (TIMP)<sup>(124)</sup>. È stato dimostrato che i valori sierici di MMP-9 eTIMP-2 sono in grado di predire il livello di complessità della lesione aterosclerotica coronarica<sup>(124)</sup>. Studi su conigli hanno dimostrato che i farmaci ipolipemizzanti sono in grado di ridimensionare l'attività delle MMP con conseguente stabilizzazione delle placche aterosclerotiche e ridotto rischio di rottura delle stesse<sup>(125)</sup>.



# Statine, inibitori del riassorbimento del colesterolo e terapia di combinazione

# C6

Francesco Barillà, Dalgisio Lecis,  
Gaetano Idone, Saverio Muscoli

## Introduzione

Le statine, in associazione alle modifiche dello stile di vita, in monoterapia o in combinazione ad ezetimibe, sono i farmaci di riferimento e di prima linea per il trattamento dell'ipercolesterolemia, sia in prevenzione primaria che secondaria. Le Linee Guida 2019 dell'*European Society of Cardiology* (ESC) <sup>(10)</sup> sul trattamento delle dislipidemie raccomandano, in classe IA, la prescrizione di statine ad alta intensità, da titolare fino alla dose massima tollerata, al fine di raggiungere il target di lipoproteine a bassa densità (*low density lipoproteins*, LDL) corrispondente alla classe di rischio cardiovascolare (CV) di ogni paziente; qualora con la dose massima tollerata di statine non fosse raggiunto il *target* desiderato, è raccomandata la combinazione con ezetimibe (classe IB). Raccomandazioni simili derivano dal recente *consensus statement dell'European Atherosclerosis Society* (EAS) <sup>(126)</sup> che propone, inoltre, come prima linea l'associazione statina/ezetimibe in determinate categorie di pazienti, ovvero in coloro nei quali è prevedibile, in base ai valori basali di LDL ed alla riduzione percentuale richiesta per raggiungere il *target* (Tabella 1), che con la sola statina non raggiungerebbero i *target* desiderati, in particolare nei pazienti con nota *atherosclerotic cardiovascular disease* (ASCVD) ed elevati valori basali di LDL. Le statine ad alta intensità determinano, infatti, una riduzione media del valore di LDL di circa il 50%, mentre la loro combinazione con ezetimibe determina una riduzione media di LDL che può raggiungere anche il 65% rispetto al valore basale. Pertanto, tale combinazione è altamente raccomandata per raggiungere il *target* di LDL, favorendo l'uso di farmaci a combinazione fissa, al fine di semplificare il trattamento e migliorare l'aderenza dei pazienti.

**Tabella 1.** Effetto sulla riduzione di LDL dei farmaci ipolipemizzanti e della loro combinazione

Trattamento farmacologico	Riduzione media LDL
Statina a moderata intensità	~ 30%
Statina a alta intensità	~ 50%
Statina a alta intensità + ezetimibe	~ 65%
Inibitore PCSK9	~ 60%
Inibitore PCSK9 + statina a alta intensità	~ 75%
Inibitore PCSK9 + statina a alta intensità + ezetimibe	~ 85%

**PCSK9:** proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9

## Statine

Le statine sono farmaci naturali o sintetici, che bloccano la sintesi del colesterolo a livello epatico, attraverso il blocco selettivo e competitivo dell'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) reduttasi. Questo enzima converte l'HMGCoA in mevalonato, un precursore fondamentale nella biosintesi del colesterolo (Figura 1). Negli anni '70 lo scienziato giapponese Akira Endo è riuscito ad isolare dal brodo di coltura di un fungo, il *Penicillium citrinum*, una sostanza, la mevastatina, in grado di inibire selettivamente l'enzima HMGCoA reduttasi. Dalla seconda metà degli anni '80, questi farmaci sono entrati nella pratica clinica ed attualmente sono prodotti per sintesi chimica. Delle statine attualmente in commercio la maggior parte è liposolubile: lovastatina, fluvastatina, simvastatina, atorvastatina, pitavastatina (non disponibile in Italia) e la cerivastatina (ritirata dal commercio nel 2001 per rischio di rabdomiolisi). Le uniche idrosolubili sono la pravastatina e la rosuvastatina.

Questi farmaci determinano, come conseguenza del ridotto *pool* intracellulare di LDL, un aumento dell'espressione del numero dei recettori per le LDL sulla superficie degli epatociti, cui consegue un incremento della captazione e del catabolismo delle lipoproteine plasmatiche. Le statine inibiscono anche la sintesi epatica delle *very low density lipoproteins* (VLDL) riducendo il numero totale di lipoproteine appartenenti alle VLDL e LDL, deputate al trasporto del colesterolo dal fegato ai tessuti periferici ed ai vasi arteriosi, e principali responsabili dello sviluppo e progressione della malattia aterosclerotica.

Nei pazienti in terapia con statine, l'efficacia massima sulla riduzione dei valori di LDL è stata documentata già dopo 4-6 settimane di trattamento. L'effetto di questi farmaci non è limitato alla riduzione dei livelli di colesterolo LDL, ma anche alla riduzione del colesterolo totale e dei trigliceridi (TG), con un incremento, seppur modesto, del colesterolo composto primariamente da *high density lipoproteins* (HDL). È dimostrato che le statine non sono efficaci sulla riduzione dei livelli di Lipoproteina(a). Gli effetti antinfiammatori delle statine sono importanti nei pazienti con sindrome coronarica

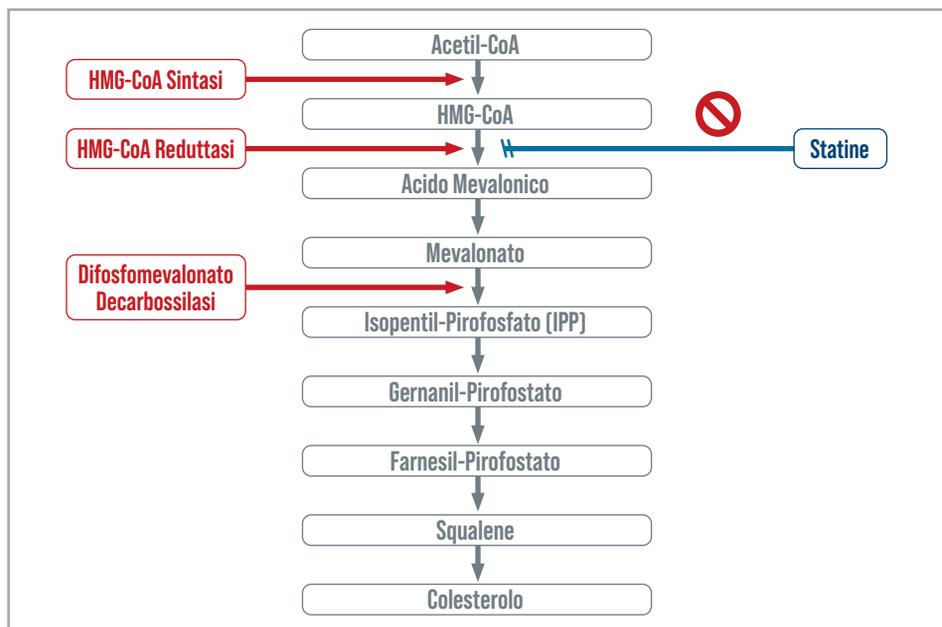


Figura 1. Inibizione dell'HMGCoA reduttasi da parte delle statine

acuta (SCA). In questi, le statine quando somministrate in fase acuta e ad alto dosaggio, sono in grado di ridurre sia i livelli di colesterolemia totale e LDL, e lo stato infiammatorio locale, fondamentale per la stabilizzazione della placca ateromasica della lesione culprit e/o di altre lesioni ateromasiche instabili.

Infatti, un effetto molto discusso, ma affascinante, delle statine è il così detto effetto pleiotropico (Figura 2). È stato dimostrato che le statine a dosaggi adeguati sono in grado di ridurre lo stato infiammatorio, la disfunzione endoteliale, inibiscono l'attivazione piastrinica e hanno una attività stabilizzante la placca ateromasica. È comunque verosimile, che questi cosiddetti effetti pleiotropici siano secondari alla riduzione dei valori di colesterolo LDL ossidato e alla conseguente riduzione dell'attivazione monocitaria, macrofagica e dello stato infiammatorio, aspetto che rende incerto il contributo degli effetti "pleiotropici" (ovvero colesterolo indipendenti) descritti in modelli sperimentali, riguardo ai benefici clinici nell'uomo. Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato come la terapia con statine riduca il rischio di *major adverse CV events* (MACE) in maniera direttamente proporzionale alla riduzione di LDL e al tempo di trattamento. Tutti gli studi clinici sia con statine che con gli inibitori del recettore PCSK9, hanno dimostrato che la separazione delle curve di Kaplan Meier tra i pazienti in trattamento attivo/intensivo vs. coloro in trattamento con placebo/meno intensivo, iniziano a separarsi dopo un tempo di latenza che solitamente va oltre i 12 mesi. Per quanto riguarda i valori sierici di LDL bisogna riconoscere che non esiste un concetto assoluto di normalità per questo parametro; i livelli raccomandati dalle linee guida dipendono dall'entità del rischio CV dei pazienti.

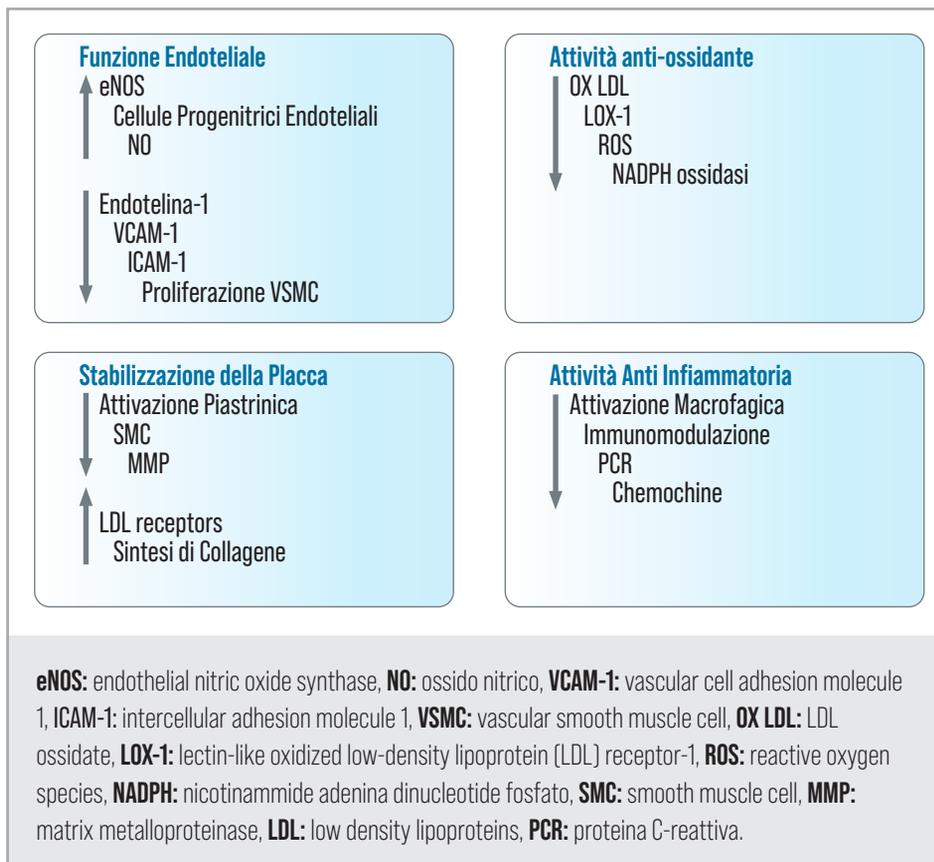
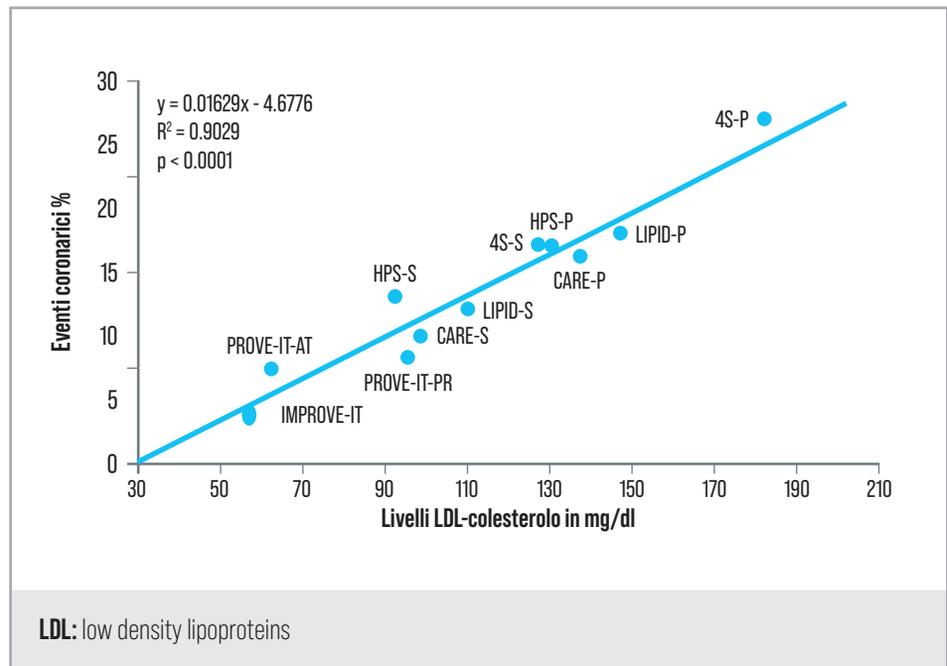


Figura 2. Principali effetti pleiotropici delle statine



**Figura 3.** Correlazione tra livelli di LDL e rischio cardiovascolare

Il famoso aforisma, introdotto ed accettato dalla comunità scientifica internazionale del “*the lower, the better*”, è dovuto al fatto che tutti i *trials* clinici hanno dimostrato che la riduzione degli eventi in prevenzione primaria e in prevenzione secondaria, è direttamente proporzionale ai mmol/L (o mg/dL) di riduzione dei livelli di LDL. A tal proposito, il *Cholesterol Treatment Trialists’ (CTT) Collaborators*<sup>(127)</sup> ha dimostrato che la riduzione di un 1 mmol/L (39 mg/dL) di LDL comporta in 5 anni una riduzione del rischio di eventi coronarici maggiori del 23% e una riduzione del rischio di eventi vascolari maggiori del 21%, mentre una riduzione di 2-3 mmol/L di LDL ridurrebbe il rischio di eventi CV del 40-50% (Figura 3). Nonostante ci siano delle differenze riguardo alle indicazioni di trattamento tra le linee guida europee ed americane, entrambe sottolineano la necessità di un approccio personalizzato in base alla classe di rischio del paziente e alla presenza di importanti comorbidità come il diabete, l’insufficienza renale cronica, ecc.

L’uso delle statine è in continua crescita, circa il 25% della popolazione mondiale con più di 65 anni assume una statina in prevenzione primaria o secondaria con effetti positivi in termini di riduzione di morbilità e mortalità.

## Farmacodinamica e farmacocinetica

Le statine vengono estratte dal circolo a livello epatico, che rappresenta il sito principale di sintesi del colesterolo e di eliminazione delle sue lipoproteine. Un ruolo fondamentale per la captazione a livello epatico, di alcune statine come pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina, è svolto dal trasportatore di membrana noto come peptide di trasporto degli anioni organici (*organic anion transporting polypeptide-C*, OATP-C). Simvastatina e lovastatina sono invece lattoni inattivi, che essendo lipofili entrano per diffusione semplice a livello degli epatociti dove vengono attivati nei rispettivi  $\beta$  idrossiacidi.

Nonostante i *trials* randomizzati sulle statine abbiano dato per tutte risultati di efficacia

rilevanti, questi farmaci manifestano un diverso profilo farmacocinetico, diversa potenza e diversa efficacia. Le statine più recenti come atorvastatina e rosuvastatina hanno dimostrato un profilo di sicurezza/efficacia superiore anche se si differenziano per alcuni aspetti.

L'atorvastatina viene rapidamente assorbita nel tratto gastroenterico, raggiungendo la concentrazione plasmatica massima ( $C_{max}$ ) entro 1-2 ore ( $T_{max}$ ) dall'assunzione ed ha una biodisponibilità assoluta del 14%. Questa bassa disponibilità è attribuibile alla sua *clearance* a livello della mucosa gastroenterica e/o al metabolismo epatico di primo passaggio. L'assunzione di atorvastatina ai pasti determina una riduzione del 25% della  $C_{max}$  (Tabella 2); anche antiacidi contenenti magnesio o alluminio, riducono la biodisponibilità dell'atorvastatina. Invece, l'assorbimento di lovastatina è aumentato dalla contemporanea assunzione di cibo. Una particolare attenzione va prestata al succo di pompelmo, potente inibitore del CYP3A4, che aumenta in maniera significativa le concentrazioni plasmatiche di lovastatina, simvastatina, atorvastatina con potenziale aumento dell'attività farmacologica. L'atorvastatina è metabolizzata dal citocromo P450 3A4 ed il suo legame con le proteine del plasma è superiore al 98%. Il sistema enzimatico P450 è presente prevalentemente nel fegato e in presenza di altri farmaci, può determinare, per competizione col substrato, un aumento o una riduzione delle concentrazioni plasmatiche delle statine.

**Tabella 2.** Caratteristiche farmacologiche delle statine

	Lovastatina	Provastatina	Fluvastatina	Simvastatina	Atorvastatina	Rosuvastatina
CYP450	CYP3A4	Nessuno	CYP2C9 (CYP3A4 minore)	CYP3A4 (maggiore) CYP3A5	CYP3A4	CYP2C9 (<10%) CYP2C19 (minore)
Biodisponibilità [%]	<5	18	25	<5	14	20
Emivita (h)	2,9	2,5	2	2	30	19
Escrezione urinaria	10	20	5	13	2	5
Escrezione fecale	83	70	95	60	98	90
Lipofilia	Si	No	Si	Si	Si	No
Assorbimento	30	34	98	70	30	Veloce

Il metabolismo di rosuvastatina, invece, dipende scarsamente dal citocromo P450 e quindi la probabilità di una sua interazione con farmaci metabolizzati da questo citocromo è ridotta. La rosuvastatina, così come la pravastatina, sono composti idrofili, mentre le altre statine sono lipofile. I composti lipofili vengono generalmente metabolizzati a composti più idrofili per essere escreti, mentre i composti idrofili sono più facilmente escreti nelle urine senza essere modificati, il che riduce le potenziali interazioni tra farmaci. Le statine idrofile sono quindi potenzialmente molto più selettive verso le cellule epatiche rispetto a quelle di natura lipofila. Per la sua caratteristica idrofila, la rosuvastatina si dimostra altamente selettiva per efficacia nelle cellule epatiche rispetto alle cellule di altri organi. La rosuvastatina viene assorbita dal tratto gastroenterico e la  $C_{max}$  viene raggiunta dopo circa 5 ore dall'assunzione raggiungendo una biodisponibilità assoluta del 20% ed un'emivita di circa 19 ore. Inoltre, la rosuvastatina si lega nella misura del 90% circa prevalentemente all'albumina, per cui la molecola viene metabolizzata in maniera limitata dal citocromo P450, in

particolare dall'isoenzima CYP2C9. L'eliminazione avviene in forma immodificata nelle feci (90% circa, compresa la quota di composto non assorbita), mentre la parte rimanente, circa 5%, viene escreta nelle urine.

Le statine sono anche i substrati per la glicoproteina P che favorisce il passaggio dei farmaci attraverso la membrana citoplasmatica. Questa è una proteina ubiquitaria, la cui attività condiziona un ridotto assorbimento intestinale ed un'augmentata eliminazione dei farmaci a livello renale. Le sostanze che interferiscono con la glicoproteina P possono competere tra loro con conseguente aumento dell'assorbimento e diminuita escrezione epatica o renale. Sia la glicoproteina P che il citocromo P450 3A4 si trovano sia negli epatociti che negli enterociti, dove coadiuvano la riduzione della concentrazione dei loro substrati.

Il grado di riduzione del LDL da parte delle statine è dose-dipendente e varia a seconda dell'intensità di effetto della statina stessa oltre che in base alla risposta individuale del paziente. In diversi studi questi farmaci hanno dimostrato sia di ridurre efficacemente i livelli di colesterolemia, sia di rallentare l'evoluzione del processo aterosclerotico, stabilizzare la placca aterosclerotica e, in alcuni casi, favorirne la regressione. La riduzione dei livelli di LDL ha un effetto positivo sulla riduzione della disfunzione endoteliale, maggiore produzione di ossido nitrico (NO), ridotta espressione di fattori di crescita, ridotta attivazione delle cellule muscolari lisce dei monociti, dei macrofagi e dei linfociti T, fattori che influenzano la fisiopatologia della formazione, progressione ed instabilità della placca aterosclerotica. Studi angiografici con ultrasonografia intravasale hanno dimostrato una parziale regressione delle placche aterosclerotiche a seguito di una terapia intensiva e prolungata con statine.

## Statine in prevenzione primaria

Numerosi studi clinici, effettuati in pazienti senza storia clinica di malattia CV, hanno dimostrato che livelli sierici elevati di colesterolemia totale e soprattutto di LDL comportano un aumento del rischio di sviluppo di malattia aterosclerotica coronarica. Infatti, anche in prevenzione primaria, esiste una relazione lineare tra la riduzione dei livelli di LDL e la riduzione del rischio di sviluppo di aterosclerosi.

Nei bambini, adolescenti (10-19 anni) e in età giovanile (20-39 anni), in caso di livelli elevati di LDL, il primo trattamento raccomandato è la promozione di uno stile di vita adeguato che comporti la correzione e la riduzione dei fattori che nel tempo aumentano il rischio CV (esercizio fisico, alimentazione, controllo del peso corporeo, abolizione del fumo di sigaretta, ecc.). La terapia farmacologica in questa fascia di età, si rende necessaria solo in pazienti selezionati con ipercolesterolemia familiare o alti livelli di LDL ( $>160$  mg/dL [ $\geq 4.1$  mmol/L]), con familiarità per eventi CV e che non rispondono, o non sono aderenti, alle modifiche dello stile di vita<sup>(128)</sup>.

I pazienti con ipercolesterolemia familiare e gli adulti dai 45 ai 75 anni con ipercolesterolemia severa, o con altri fattori di rischio come il diabete o l'ipertensione arteriosa, sono solitamente candidati ad un trattamento immediato con statine oltre alle modifiche dello stile di vita. Il tipo di trattamento da iniziare dovrebbe essere scelto in base al rischio globale del paziente e quindi al *target* di LDL da raggiungere. In caso di rischio CV basso o intermedio, può essere utile l'integrazione degli *score* di rischio con i cosiddetti *risk modifiers*, ovvero determinanti aggiuntivi di rischio che permettono di riclassificare il rischio del paziente (generalmente da intermedio a classi di rischio più elevate), come il *Calcium Score Calculator* (CAC), l'*ankle-brachial*

*index* (ABI) e la presenza di placche carotidee, femorali o coronariche, per definire meglio il profilo di rischio CV globale<sup>(10)</sup>. I pazienti diabetici, specie coloro con storia di malattia >10 anni, con fattori di rischio associati e/o danno d'organo, sono pazienti considerati a rischio CV alto o molto alto, pertanto, dovrebbero precocemente iniziare un trattamento con statine<sup>(128)</sup>.

L'età è un importante indicatore della classe di rischio per malattia aterosclerotica, ma non è l'unico da considerare e non riflette quelli che sono i fattori di rischio individuali. In quest'ultimi sono da considerare sia fattori genetici, che acquisiti, come per esempio: malattie infiammatorie croniche, sindrome metabolica, insufficienza renale cronica, livelli sierici elevati ed inspiegabili di proteina C-reattiva (PCR), che sembrano aumentare la predisposizione ad eventi aterotrombotici. In presenza di fattori di rischio aggiuntivi, in coloro che per età hanno un rischio, sarebbe giustificato l'inizio del trattamento con statine, nel caso in cui le modifiche dello stile di vita non siano sufficienti a mantenere livelli adeguati di LDL<sup>(128)</sup>.

Importanti studi hanno dimostrato il ruolo favorevole della riduzione di LDL in prevenzione primaria.

Lo studio JUPITER (*Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein*)<sup>(129)</sup> ha arruolato 17.800 pazienti (uomini ≥50 anni, donne ≥60 anni), senza storia pregressa di malattia coronarica, livelli di LDL pari o inferiori a 130 mg/dL e valori di PCR ≥2 mg/L. Di questi, un gruppo (8900 pazienti) è stato randomizzato a rosuvastatina 20 mg e l'altro gruppo (8900 pazienti) a placebo. Nel gruppo trattato con rosuvastatina c'è stata una riduzione significativa dell'incidenza di eventi CV maggiori (infarto e ictus), rispetto al gruppo trattato con placebo. Il gruppo in trattamento attivo ha avuto una riduzione dei livelli di LDL del 50% e dei livelli di PCR del 37%. Evidenze ancora più significative sono state fornite dallo studio HOPE-3<sup>(130)</sup> che, nel braccio lipidico, ha confrontato rosuvastatina 10 mg vs. placebo in individui a rischio moderato in prevenzione primaria e livelli mediani di LDL di 130 mg/dL. Lo studio ha dimostrato una sorprendente riduzione dell'*endpoint* primario composito costituito da morte CV, infarto miocardico (IM) non fatale o stroke non fatale e dei singoli *endpoint* CV secondari, dimostrando, per la prima volta, come un approccio assimilabile ad una strategia di popolazione possa contribuire a ridurre mortalità e morbilità CV in maniera significativa.

## Statine in prevenzione secondaria

Lo studio 4S (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*)<sup>(131)</sup> è stato il primo *trial* clinico randomizzato, controllato, che ha dimostrato l'efficacia delle statine in prevenzione secondaria. Lo studio ha arruolato 4444 pazienti, con storia di pregresso IM ed elevati livelli di colesterolemia (213-310 mg/dL); l'*endpoint* primario era la valutazione dell'efficacia di 20 o 40 mg di simvastatina vs. placebo in un *follow-up* medio di 5,4 anni. Lo studio ha dimostrato che i pazienti trattati con simvastatina avevano una riduzione dei livelli di colesterolemia totale e di LDL del 25% e 35% rispettivamente, ed un aumento dell'8% dei valori di HDL. La mortalità totale, che rappresentava l'*endpoint* primario dello studio, nei pazienti trattati con statina è stata dell'8% vs. il 12% del gruppo trattato con placebo, con una riduzione del rischio relativo del 30% (rischio relativo - RR 0.70, 95% CI 0.58-0.85; p=0.0003). I pazienti morti per cause CV sono stati 111 nel gruppo simvastatina e 189 nel gruppo placebo (RR 0.58, 95% CI 0.46-0.73). Durante i sei anni di *follow-up*, 431 (19%) pazienti trattati con simvastatina

hanno avuto un nuovo evento coronarico rispetto a 622 (28%) pazienti nel gruppo placebo, con una riduzione del rischio relativo del 34% (RR 0.66, 95% CI 0.59-0.75;  $p < 0.00001$ ). È interessante osservare come lo studio 4S sia stato l'unico *trial* con statine a poter investigare, per gli elevati livelli di LDL basali della popolazione arruolata e per l'elevato profilo di rischio basale, un *endpoint* primario di mortalità per tutte le cause. L'efficacia delle statine in prevenzione secondaria, è stata confermata a metà degli anni '80 dallo studio LIPID (*The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease*)<sup>(132)</sup> che ha valutato l'efficacia della pravastatina 40 mg sulla riduzione degli eventi CV nei pazienti con IM e/o angina instabile. Il LIPID ha arruolato 9014 pazienti, randomizzati a pravastatina vs. placebo. Il gruppo pravastatina ha dimostrato una riduzione significativa di mortalità globale (11.0% vs. 14.1%, riduzione del RR 22%) e per cause CV (6.4% vs. 8.3%, riduzione del RR 24%), rispetto al gruppo trattato con placebo. Nei pazienti trattati con pravastatina, c'è stata una riduzione significativa del rischio di eventi CV in termini di IM (riduzione del RR 29%;  $p < 0.001$ ), morte CV o IM non fatale (riduzione del RR 24%;  $p < 0.001$ ), ictus (riduzione del RR 19%;  $p = 0.048$ ) e necessità di rivascolarizzazione coronarica (riduzione del RR 20%;  $p < 0.001$ ).

Un ulteriore importante risultato sull'utilizzo delle statine in prevenzione secondaria, è arrivato dallo studio CARE (*The Cholesterol and Recurrent Events*)<sup>(133)</sup>, dove è stata valutata la correlazione tra la riduzione di LDL ed eventi CV in pazienti i cui i valori basali di colesterolo totale erano  $< 240$  mg/dL. Il CARE ha arruolato 4159 pazienti, con pregresso IM e livelli di colesterolo LDL tra 115 e 174 mg/dL, randomizzati a pravastatina 40 mg o placebo. Lo studio, durato 5 anni, ha dimostrato una ridotta incidenza di morte CV, IM fatale e non fatale (*endpoint* primario) in pravastatina; in particolare, è stata registrata una percentuale di eventi del 10.2% nel gruppo in trattamento, rispetto al 13.2% del gruppo in placebo con una riduzione del RR del 24%. C'è stata, inoltre, una riduzione dell'incidenza di ictus del 31% nel gruppo in trattamento attivo rispetto al placebo.

I risultati dei primi *trials* con le statine hanno dimostrato chiaramente come la riduzione dei livelli di LDL riduca il tasso di eventi coronarici ma, dato ancor più interessante, è stata l'osservazione che il beneficio clinico è direttamente proporzionale al grado di riduzione dei livelli di LDL. Questa constatazione ha dato il via ad un'altra serie di studi clinici con dosaggi più elevati di statine vs. dosaggi più bassi e di confronto tra statine ad alta intensità (atorvastatina e rosuvastatina) e statine a bassa intensità (simvastatina e pravastatina).

Lo studio TNT (*Treating to New Targets*)<sup>(134)</sup> ha avuto l'obiettivo di valutare se il trattamento con alti dosaggi di atorvastatina, 80 mg vs. 10 mg, fosse più efficace sulla riduzione del rischio di eventi CV in pazienti con storia clinica di cardiopatia ischemica. Sono stati arruolati 10.001 pazienti con malattia coronarica stabile e valori di LDL  $< 130$  mg/dL. Il *follow-up* medio è stato di 4,9 anni, durante il quale i pazienti con atorvastatina 80 mg hanno raggiunto un *target* di LDL di 77 mg/dL, rispetto ai 101 mg/dL dei pazienti trattati con 10 mg. Durante il *follow-up*, l'incidenza di eventi CV è stata dell'8.7% rispetto al 10.7% nei i pazienti trattati con alti vs. bassi dosaggi di statina ( $p = 0.0002$ ). Non c'è stata alcuna differenza nei due gruppi riguardo alla mortalità totale.

Invece, lo studio IDEAL (*High-Dose Atorvastatin vs. Usual-Dose Simvastatin for Secondary Prevention After Myocardial Infarction*)<sup>(135)</sup> ha arruolato 8888 pazienti con pregresso IM, seguiti per un *follow-up* medio di 4,8 anni. I pazienti sono stati randomizzati a una dose elevata di atorvastatina 80 mg o a simvastatina 20 mg.

I pazienti trattati con atorvastatina hanno raggiunto un valore di LDL di 81 mg/dL, rispetto al valore di 104 mg/dL del gruppo simvastatina. L'incidenza di eventi coronarici maggiori è stata del 9.3% nel gruppo atorvastatina, rispetto al 10.4% nel gruppo simvastatina (*Hazard Ratio* – HR 0.89, 95% CI 0.78-1.01; p=0.07). L'incidenza di IM non fatale è stata del 6% nel gruppo in trattamento con atorvastatina, rispetto al 7.2% del gruppo simvastatina (HR 0.83, 95% CI 0.71-0.98; p=0.02). Anche l'incidenza di eventi CV maggiori è stata più elevata nel gruppo simvastatina rispetto al gruppo atorvastatina (HR 0.87, 95% CI 0.77-0.98; p=0.02). I *trials* eseguiti in questa fase temporale sebbene abbiano dimostrato una relazione lineare tra la riduzione dei livelli di LDL e la riduzione del rischio di eventi CV, hanno arruolato pazienti con sindromi coronariche croniche o pazienti con storia di IM, ma non hanno valutato l'efficacia della riduzione dei livelli sierici di LDL nel *follow-up* post-SCA.

Lo studio MIRACL (*Myocardial Ischaemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering*)<sup>(136)</sup> stato il primo *trial* eseguito per valutare l'efficacia e la sicurezza di un trattamento intensivo con statine nei pazienti con NSTEMI o angina instabile. Il MIRACL ha arruolato 3086 pazienti di età ≥18 anni dopo 24-96 ore dall'insorgenza dei sintomi. Il disegno dello studio prevedeva il trattamento con atorvastatina 80 mg o placebo per 16 settimane. Il trattamento con atorvastatina ha ridotto significativamente i livelli di LDL, da un valore basale di 124 mg/dL a 81 mg/dL dopo 16 settimane di trattamento. I pazienti in trattamento con atorvastatina hanno avuto una riduzione significativa di eventi CV rispetto al placebo (RR 0.88, 95% CI 0.70-1.00; p=0.048). Il MIRACLE ha dimostrato per la prima volta come il trattamento precoce ed intensivo dopo SCA, sia in grado di ridurre l'incidenza di eventi coronarici nel *follow-up* a medio termine.

In ultimo, lo studio PROVE-IT<sup>(137)</sup> ha randomizzato 4162 pazienti ospedalizzati per SCA nei 10 giorni precedenti l'arruolamento, a ricevere pravastatina 40 mg (*standard therapy*) o atorvastatina 80 mg (*intensive therapy*). L'*endpoint* primario dello studio era un composito di mortalità per tutte le cause, IM, angina instabile, rivascolarizzazione e *stroke*. Il trattamento intensivo ha determinato una più efficace riduzione del valore di LDL (62 mg/dL vs. 95 mg/dL del trattamento standard) ed una minore occorrenza dell'*endpoint* primario (22.4% vs. 26.3% del trattamento standard) con una significativa riduzione del rischio pari al 16% in un *follow-up* mediano di 24 mesi, sottolineando che un trattamento intensivo in fase acuta fornisce una maggiore protezione in un *follow-up* a medio termine rispetto alla terapia standard.

I dati che hanno generato il cambio di paradigma sulla riduzione dei livelli di LDL nel post-infarto sono provenuti da uno studio di metanalisi del *Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration*<sup>(127)</sup> che ha incluso 21 *trials* randomizzati e circa 170.000 pazienti, con un *follow-up* medio di 4,8 anni, dimostrando che non solo è necessario ridurre i livelli di LDL, ma che esiste una correlazione lineare tra la riduzione di LDL e gli eventi CV, e che questa relazione continua ad essere lineare anche a livelli molto ridotti di LDL (<50 mg/dL). In altri termini, maggiore è la riduzione del colesterolo LDL, maggiore è l'efficacia sulla riduzione dei MACE per cui, nella comunità scientifica internazionale c'è stata la consapevolezza del “*the lower the better*”.

Tutti i *trials* di prevenzione secondaria hanno, inoltre, dimostrato che il trattamento con statine riduce il rischio di ictus tra i pazienti con storia di malattia coronarica ed in quelli a rischio elevato di malattie CV. Uno studio di metanalisi eseguito su circa 90.000 pazienti trattati con statine, ha dimostrato che anche la riduzione del rischio di ictus era direttamente proporzionale alla riduzione dei livelli plasmatici di LDL.

I dati in letteratura sulla efficacia delle statine nella riduzione del rischio ictus/TIA in pazienti con una storia pregressa di *stroke* ischemico non sono tuttavia così corposi se paragonati all'evidenza riguardo alla prevenzione secondaria del post-IM.

## Le statine negli studi sulla progressione dell'aterosclerosi

Nello studio REVERSAL (*Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering*)<sup>(138)</sup> è stato valutato l'effetto di un trattamento ipolipemizzante intensivo con atorvastatina 80 mg rispetto al trattamento con pravastatina 40 mg, mediante metodica ecografica intravascolare (*IntraVascular UltraSound*, IVUS), sulla progressione di aterosclerosi coronarica in pazienti con coronaropatia. L'IVUS è stata eseguita a tempo 0 e a 18 mesi in 502 pazienti con coronaropatia. L'endpoint primario era rappresentato dalla variazione percentuale del volume dell'ateroma. Nel gruppo in trattamento con atorvastatina non è stata osservata alcuna progressione della placca aterosclerotica. La variazione del volume dell'ateroma è stata di -0,4 % per il gruppo in trattamento con atorvastatina e +2,7 % per il gruppo in pravastatina. Lo studio ASTEROID<sup>(139)</sup>, invece, ha valutato l'effetto di rosuvastatina 40 mg sul volume dell'ateroma rispetto al placebo su 349 pazienti, al basale e dopo 24 mesi di *follow-up*. La terapia con rosuvastatina, oltre a ridurre i livelli di LDL a 60,8 mg/dL, ha dimostrato di essere efficace nel ridurre significativamente il volume dell'ateroma dopo 24 mesi di trattamento.

A fronte delle indiscutibili evidenze disponibili sulla efficacia e sulla intensità di riduzione di LDL le ultime Linee Guida dell'ESC del 2019 sul trattamento delle dislipidemie raccomandano in tutte le categorie di rischio, tranne che nei pazienti a basso rischio, una riduzione più aggressiva di LDL rispetto alle precedenti raccomandazioni. In prevenzione secondaria, le statine ad alta efficacia (rosuvastatina, atorvastatina) sono raccomandate, alla massima dose tollerata, in classe IA, ed in associazione con ezetimibe se non sufficienti, per raggiungere i target di LDL sulla base del livello di rischio CV individuale.

## Sicurezza e tollerabilità

Le statine sono in generale dei farmaci ben tollerati. La maggior parte dei pazienti inizialmente intolleranti ad una statina è poi in grado di proseguire il trattamento utilizzando un altro tipo di statina, oppure riducendone il dosaggio. I pazienti che ricevono un trattamento prolungato e con alti dosaggi hanno un rischio maggiore di sviluppare eventi avversi, tra cui crampi e/o dolori muscolari, o altri sintomi, a volte alquanto aspecifici. La mialgia da statine, il cosiddetto *statin-associated muscle symptoms* (SAMS), è riportata nel 10-15% dei pazienti in trattamento, è caratterizzata da dolori muscolari diffusi in assenza di aumento del livello sierico di CPK o di marcata limitazione funzionale. Effetti collaterali gravi come la rhabdomiolisi sono stimati nell'ordine dello 0.2%, determinano un aumento oltre dieci volte dei livelli di CPK plasmatici e possono provocare insufficienza renale secondaria, con urine scure per la presenza di mioglobinuria. Non molto frequente è l'effetto tossico sul fegato; viene considerato indice di danno epatico con indicazione alla sospensione della terapia, un aumento delle transaminasi tre volte superiore ai valori di riferimento. Inoltre, c'è da tener conto, che in una piccolissima percentuale di pazienti è anche possibile avere un aumento dei valori di lipasi ed amilasi, come espressione anche di un danno pancreatico. Effetti

collaterali più comuni anche a tanti altri farmaci, sono la dispepsia, la nausea e l'astenia. Particolare attenzione va rivolta a pazienti di età >75 anni; in questi, alti dosaggi di statine sono spesso mal tollerati, aumentano gli effetti collaterali e riducono la compliance alla terapia. Il monitoraggio frequente delle transaminasi, del CPK e degli enzimi pancreatici non è raccomandato. Comunque sia, è sempre utile fare una valutazione periodica a seconda del tipo di trattamento, dell'età del paziente e degli eventuali sintomi riferiti dai pazienti.

Alcuni trattamenti farmacologici possono interferire con l'uso di statine. Le *drug-drug interactions* si sviluppano quando la farmacocinetica o la farmacodinamica di un farmaco viene modificata dalla precedente o dalla contemporanea somministrazione di un altro farmaco, con conseguente alterazione dell'effetto atteso. Particolare attenzione va posta alle interazioni farmacologiche a livello del citocromo P450. Infatti, alcuni farmaci come la ciclosporina, l'amiodarone, il verapamil, il diltiazem, il gemfibrozil e l'eritromicina, inibiscono l'attività del citocromo P450-3A4. In questi casi, l'utilizzo di statine che non interagiscono con questi citocromi, come la rosuvastatina o la fluvastatina, ha un rischio minore di sviluppare effetti indesiderati. Le statine, soprattutto in individui con sindrome metabolica e pre-diabete possono aumentare del 9% il rischio di sviluppare diabete (*odds ratio* - OR 1.09, 95% CI 1.02-1.17)<sup>(140)</sup>, mentre sono stati definitivamente sconfessati i presunti effetti sfavorevoli sugli ictus emorragici e sui disturbi cognitivi in pazienti con livelli particolarmente ridotti di LDL.

## Ezetimibe

### Farmacodinamica e farmacocinetica

L'ezetimibe è un farmaco ipolipemizzante che agisce inibendo l'*uptake* del colesterolo alimentare, biliare e dei relativi steroli vegetali a livello del piccolo intestino, senza interferire con l'assorbimento dei nutrienti liposolubili. L'ezetimibe ha come bersaglio molecolare la proteina Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), un trasportatore degli steroli, espresso sia sulle cellule intestinali, a livello dell'orletto a spazzola, che sulle cellule epatiche. A seguito della ridotta disponibilità di colesterolo a livello epatico, si ha un incremento dell'espressione dei recettori LDL sulla superficie degli epatociti con conseguente incremento dell'*uptake* e della *clearance* sierica di LDL ed un effetto positivo sulla riduzione dei livelli plasmatici di LDL.

L'ezetimibe assunto per via orale, viene ampiamente assorbito nel tratto gastrointestinale e successivamente metabolizzato a livello dell'intestino tenue e nel fegato. Il metabolismo si configura con un processo di coniugazione che porta alla formazione di ezetimibe-glucuronide, metabolita farmacologicamente attivo. Il picco plasmatico ( $C_{max}$ ) di ezetimibe-glucuronide si verifica entro una o due ore dall'assunzione. Il legame alle proteine plasmatiche di ezetimibe e della sua forma glucuronata si attesta rispettivamente per il 99.7% e l'88-92%. In considerazione del suo basso effetto di inibizione o induzione sul citocromo P450, presenta meno interazioni farmacologiche delle statine; viene eliminato prevalentemente per via biliare e solo in minima parte per via urinaria raggiungendo un'emivita di 22 ore.

Nei pazienti con insufficienza renale o disfunzione epatica lieve (punteggio Child-Pugh 5-6), non è necessario eseguire modifiche del dosaggio farmacologico; al contrario un punteggio Child-Pugh >9 controindica l'utilizzo del farmaco.

## Efficacia e sicurezza di ezetimibe: *trial* clinici

L'ezetimibe, in monoterapia al dosaggio di 10 mg/die, determina una riduzione dei livelli di LDL di circa il 15-20% ed un aumento del 4-9% di HDL. Inoltre, ha un profilo di tollerabilità quasi simile al placebo. In monoterapia è raccomandato esclusivamente in quei pazienti che riferiscono intolleranza alle statine, in tutti gli altri casi è preferibile l'associazione con le statine per potenziare l'efficacia di entrambi i composti e migliorarne la tollerabilità (Tabella 3).

Il *trial* multicentrico giapponese EWTOPIA-75 (*Ezetimibe Lipid-Lowering Trial on Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in 75 or Older*)<sup>(141)</sup>, ha valutato la terapia con ezetimibe 10 mg vs. terapia standard dietetica, in pazienti di età >75 anni, senza storia clinica di coronaropatia avendo come *outcome* primario un composito di morte cardiaca improvvisa, IM, rivascolarizzazione coronarica o ictus. Il *trial* ha dimostrato l'efficacia di ezetimibe nel ridurre l'incidenza dell'*outcome* primario (HR 0.66, 95% CI 0.50-0.86; p=0.002). Tuttavia, non è stata riscontrata alcuna differenza, rispetto al placebo, nell'incidenza di ictus, mortalità per tutte le cause o eventi avversi tra i gruppi di studio.

Una metanalisi eseguita su otto RCT<sup>(142)</sup>, ha valutato l'efficacia e la sicurezza della monoterapia con ezetimibe nel trattamento dell'ipercolesterolemia eterozigote familiare e non familiare, su un totale di 2722 pazienti. L'analisi ha dimostrato che il farmaco in monoterapia comportava una riduzione significativa del 18.5% dei valori di LDL rispetto al placebo. Inoltre, è stata dimostrata una riduzione significativa del colesterolo totale (-13.46%), dei TG (-8.06%) e un lieve aumento delle HDL (+3%).

## Terapia di associazione statine/ezetimibe

La terapia di associazione con statine ed ezetimibe ha il vantaggio di combinare l'effetto delle statine, che riducono la sintesi epatica del colesterolo mediante il blocco dell'enzima HMGCoA reduttasi e quello dell'ezetimibe, che blocca l'assorbimento intestinale del colesterolo. La terapia di combinazione ha diversi vantaggi: 1) è più efficace sulla riduzione dei livelli di LDL e consente di raggiungere i valori *target* più

**Tabella 3.** Effetto sulla riduzione di LDL delle diverse combinazioni ezetimibe/statina (Modificata da De Luca L. et al. *Kardiol Pol* 2020;78:850-860)

Trattamento farmacologico	Riduzione media LDL
Ezetimibe/atorvastatina	
10/10 mg	53%
10/20 mg	54%
10/40 mg	56%
10/80 mg	61%
Ezetimibe/rosuvastatina	
10/5 mg	52%
10/10 mg	57%
10/20 mg	64%
Ezetimibe/simvastatina	
10/10 mg	45%
10/20 mg	52%
10/40 mg	55%
10/80 mg	60%

facilmente e più precocemente di quanto non avvenga con le sole statine; 2) permette di utilizzare dosaggi più bassi di statine, il che riduce il rischio di effetti avversi ed aumenta la *compliance* nel medio-lungo termine. Inoltre, in caso di utilizzo di combinazioni fisse, si ha un effetto favorevole sull'aderenza alla terapia.

## Efficacia e sicurezza della combinazione statina/ezetimibe: trial clinici

Lo studio IMPROVE-IT (*Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial*)<sup>(143)</sup> è stato il più importante trial randomizzato disegnato per valutare l'efficacia dell'associazione statina-ezetimibe rispetto a statina in monoterapia nei pazienti con SCA. Il trial IMPROVE-IT ha randomizzato 18.144 pazienti con SCA (STEMI/NSTEMI) e livelli basali di LDL compresi tra 50 e 125 mg/dL a simvastatina/ezetimibe vs. simvastatina in monoterapia, seguiti per un *follow-up* medio di 7 anni. Il dosaggio di simvastatina di base era di 40 mg/die, titolato a 80 mg/die nei pazienti che continuavano ad avere un valore di LDL >79 mg/dL. Già dopo un anno dall'inizio del trattamento, i risultati hanno documentato una efficacia schiacciante dell'associazione simvastatina/ezetimibe sulla riduzione dei livelli di LDL. Il gruppo di pazienti in trattamento con la terapia di associazione aveva raggiunto un valore medio di 53,3 mg/dL (1,4 mmol/L), rispetto a 69,9 mg/dL (1,8 mmol/L) del gruppo di pazienti in trattamento con simvastatina in monoterapia ( $p<0.001$ ). Il tasso di eventi CV a 7 anni, *endpoint* primario combinato di mortalità per cause CV, eventi coronarici maggiori (IM non fatale, angina instabile richiedente ospedalizzazione e rivascolarizzazione coronarica) e ictus non fatale è stato del 32.7% nel gruppo simvastatina-ezetimibe e del 34.7% in placebo ( $p=0.016$ ) (Figura 4). Il rischio di IM e di ictus è stato significativamente più basso nel gruppo simvastatina/ezetimibe rispetto a simvastatina in monoterapia (HR 0.87,  $p=0.002$  e HR 0.79,  $p=0.008$ , rispettivamente). Invece, i tassi di mortalità CV e per tutte le cause sono

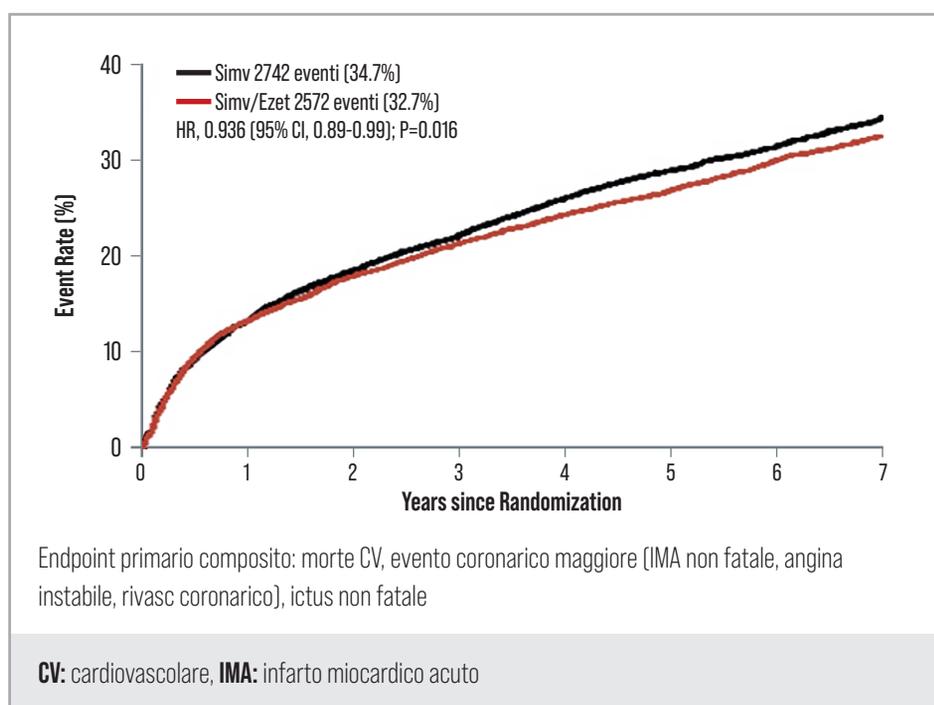


Figura 4. Curve di Kaplan-Meier per l'endpoint primario dello studio IMPROVE-IT

risultati simili nei due gruppi. Il beneficio della terapia di combinazione è stato significativo in particolar modo nei pazienti diabetici e nei pazienti di età  $\geq 75$  anni. La sospensione del trattamento per eventi avversi si è verificata nel 10.1% dei pazienti in simvastatina rispetto al 10.6% dei pazienti trattati con simvastatina/ezetimibe.

Le implicazioni cliniche dello studio IMPROVE-IT sono state di fondamentale importanza per il trattamento dell'ipercolesterolemia in prevenzione secondaria. È stato il primo studio a dimostrare che la riduzione dei valori di LDL al di sotto di 70 mg/dL (considerato all'epoca il valore *target* di riferimento e raccomandato dalle linee guida), determina una ulteriore riduzione del rischio relativo di eventi avversi maggiori nei pazienti con SCA. Inoltre, ha confermato che la riduzione del rischio di eventi CV è presente nel *follow-up* a medio-lungo termine. Pertanto, è fondamentale che sia raggiunto il *target* raccomandato di LDL (attualmente, grazie allo studio IMPROVE-IT, le linee guida raccomandano un valore  $< 55$  mg/dL, essendo i pazienti con SCA ad altissimo rischio CV) e, dato anch'esso importante, è che questo *target* rimanga costante nel tempo, per avere un beneficio sulla riduzione del rischio di eventi cardio e cerebrovascolari.

La terapia di associazione si è dimostrata vantaggiosa anche in specifiche categorie di pazienti come documentato dallo studio SHARP<sup>(144)</sup>. In tale studio sono stati arruolati oltre 9000 pazienti con insufficienza renale cronica. I pazienti sono stati randomizzati nel ricevere l'associazione simvastatina/ezetimibe (20/10 mg/die) o placebo. Dopo un *follow-up* medio di circa 5 anni, i pazienti in terapia di associazione, inclusa la popolazione in trattamento dialitico, hanno avuto una riduzione significativa del 17% degli eventi CV, secondari ad aterosclerosi, rispetto a quanto osservato nel gruppo trattato con placebo.

Una serie di studi ha, inoltre, dimostrato il vantaggio della combinazione statina/ezetimibe rispetto alla statina in monoterapia o al raddoppio della dose di statina.

Nel *trial Combination Therapy of Rosuvastatin and Ezetimibe*<sup>(145)</sup> eseguito in pazienti a rischio CV elevato, è stato dimostrato che il tasso di raggiungimento del *target* di LDL è nettamente superiore nei gruppi trattati con farmaci in combinazione, rispetto a quelli trattati con la sola statina (91% vs. 73%). La somministrazione combinata di rosuvastatina ed ezetimibe si è dimostrata più efficace nel ridurre gli eventi avversi *drug-related*, rispetto alla somministrazione della statina in monoterapia e questo comporta certamente incremento della *compliance* e dell'aderenza alla terapia ipocolesterolemizzante. Un altro vantaggio della terapia di combinazione rispetto alla monoterapia è la maggiore efficacia nell'indurre una regressione del volume della placca ateromastica<sup>(146)</sup>.

Lo studio ACTE<sup>(147)</sup> ha confrontato l'efficacia di rosuvastatina 5 o 10 mg/ezetimibe 10 mg verso il raddoppio della dose di rosuvastatina da 5 a 10 mg o da 10 a 20 mg nel ridurre il colesterolo LDL in 440 pazienti a rischio CV moderato/alto. Lo studio ha dimostrato a 6 settimane una maggiore riduzione di colesterolo LDL con la terapia combinata rosuvastatina/ezetimibe rispetto all'aumento della dose in monoterapia con rosuvastatina (21% vs. 5.7%, rispettivamente; differenza tra gruppi 15.2%,  $p < 0.001$ ); risultati simili sono stati osservati quando ogni strato in rosuvastatina è stato analizzato singolarmente. Similarmente, lo studio EZ-PATH<sup>(148)</sup> ha confrontato l'efficacia di atorvastatina 40mg/ezetimibe 10 mg verso il raddoppio della dose di atorvastatina da 40 a 80 mg. Lo studio ha confermato a 6 settimane una maggiore riduzione del valore di LDL con la combinazione atorvastatina/ezetimibe vs. la monoterapia raddoppiata (27% vs. 11%, rispettivamente; differenza tra gruppi 16%,  $p = 0.001$ ).

Lo studio I-Rosette <sup>(149)</sup> ha confrontato i diversi dosaggi della combinazione rosuvastatina/ezetimibe vs. monoterapia con rosuvastatina alle varie dosi disponibili in 396 pazienti con ipercolesterolemia sia in prevenzione primaria che secondaria. Dopo 8 settimane di trattamento la variazione percentuale di LDL rispetto a basale è stata di -57% e -44.4% nei gruppi totali rosuvastatina/ezetimibe e rosuvastatina, rispettivamente ( $p < 0.001$ ). L'efficacia nella riduzione del valore di LDL di ogni combinazione rosuvastatina/ezetimibe è stata superiore a quella di ogni dose di rosuvastatina e  $> 50\%$  in tutti i gruppi di terapia di combinazione. Il numero dei pazienti che ha raggiunto i livelli *target* di colesterolo LDL alla settimana 8 è stata significativamente maggiore nel gruppo rosuvastatina/ezetimibe (180 [92.3%]) rispetto al gruppo in monoterapia con rosuvastatina (155 [79.9%]) ( $p < 0.001$ ).

La terapia di combinazione si pone dunque come risorsa fondamentale per il cardiologo e per il paziente, in quanto è più efficace nel raggiungimento e nel mantenimento del *target* di LDL e consente di ridurre i dosaggi di statina, migliorando la tollerabilità del paziente al trattamento e l'aderenza. Barkas *et al.* <sup>(150)</sup> in una revisione della letteratura pubblicata nel 2013 hanno riportato che i pazienti in terapia con una combinazione preconstituita per il trattamento dell'ipercolesterolemia erano per il 32% più aderenti al trattamento rispetto ai pazienti in terapia con multipli singoli farmaci (OR 1.32, 95% CI 1.27-1.36;  $p < 0.01$ ). Per tale motivo le ultime Linee Guida dell'ESC <sup>(10)</sup> e le più recenti raccomandazioni EAS <sup>(126)</sup>, ne suggeriscono l'uso in pazienti a rischio CV alto e molto alto, ovvero in quei soggetti in cui è inverosimile raggiungere il *target* desiderato di LDL con la sola statina, anche se ad alta intensità ed alta dose. In tale contesto assumono un posto predominante i pazienti con ASCVD che già per la sola presenza di aterosclerosi manifesta si collocano in una classe di rischio molto alto con un *target* di LDL  $< 55$  mg/dL. In tali pazienti, l'EAS suggerisce un algoritmo specifico (Figura 5) che raccomanda di considerare l'associazione in singola compressa come

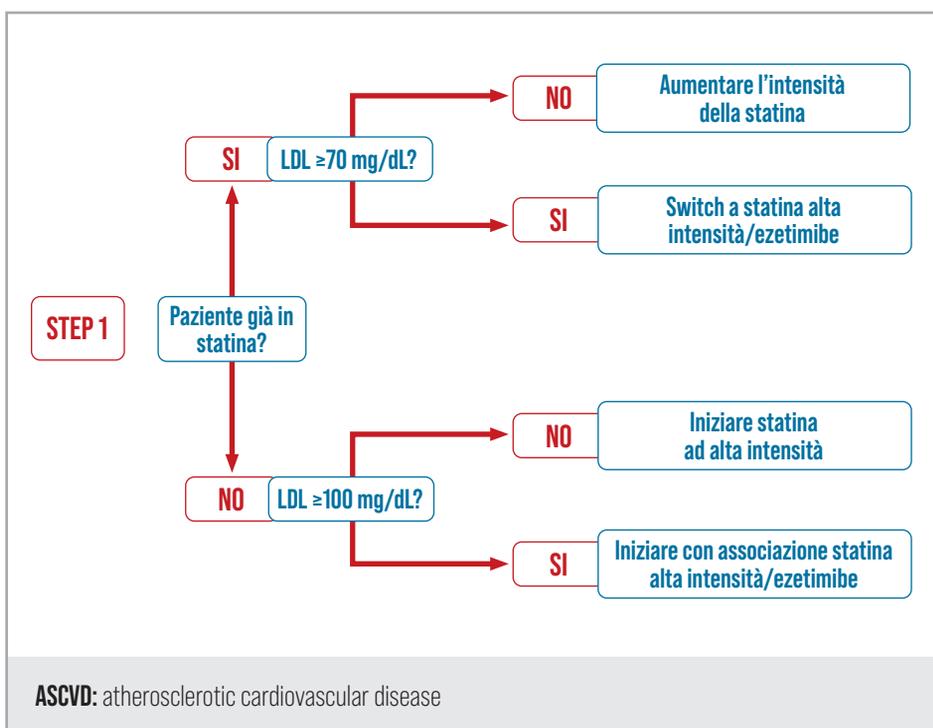


Figura 5. Primo step di trattamento dell'ipercolesterolemia nel paziente con ASCVD (Modificata da ref #126)

primo *step* terapeutico: i pazienti già in trattamento con statina e con LDL  $\geq 70$  mg/dL dovrebbero essere *switchati* direttamente a trattamento combinato statina ad alta intensità/ezetimibe; i pazienti non ancora in terapia con statina dovrebbero ricevere *upfront* tale combinazione in presenza di un valore basale di LDL  $\geq 100$  mg/dL.

Questa raccomandazione, che supera l'anacronistico algoritmo terapeutico a gradini delle linee guida ESC 2019, dovrebbe rappresentare l'approccio convenzionale al trattamento della ipercolesterolemia nei pazienti a rischio molto elevato, ai fini del raggiungimento precoce del target lipidico, miglioramento dell'aderenza terapeutica, riduzione degli effetti collaterali delle alte dosi di statine.

## Associazioni fisse statine-antipertensivi

La combinazione in singola compressa di statina ad alta efficacia e antipertensivi rappresenta una recente importante opportunità terapeutica per i pazienti ipertesi. La coesistenza di ipertensione e dislipidemia varia tra il 15 ed il 30% circa e le linee guida ESC/ESH sull'ipertensione e sulle dislipidemie hanno reso più stringenti i *target* di LDL nei soggetti ipertesi. Dunque, la disponibilità in singola compressa di farmaci che agiscono su differenti fattori di rischio CV rappresenta una nuova potenzialità terapeutica per il controllo simultaneo della pressione arteriosa e dei valori di LDL. In tale contesto lo studio ASCOT<sup>(151)</sup> fornì nel 2003 importanti evidenze, soprattutto, per questo aspetto, provenienti dal braccio di pazienti ipertesi ad alto rischio CV randomizzati, oltre che a differenti modalità di riduzione della pressione, al trattamento con atorvastatina o placebo. Fu riportata una significativa riduzione pari al 36% degli eventi CV maggiori negli ipertesi in prevenzione primaria randomizzati ad atorvastatina (HR 0.64, 95% CI 0.50–0.83;  $p=0.0005$ ) successivamente confermata nella osservazione a lungo termine più recentemente pubblicata<sup>(152)</sup>.



# Acidi grassi e fibrati

Savina Nodari, Francesco Fioretti,  
Martino Deidda, Giuseppe Mercurio

C7

## Acidi grassi

### Introduzione

L'interesse per gli acidi grassi polinsaturi (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) e i loro effetti favorevoli sul profilo di rischio cardiovascolare (CV) e sulla prevenzione degli eventi CV è andato crescendo nel corso degli anni, anche se i risultati non sempre concordanti forniti da studi osservazionali e trial clinici relativi all'aumentato apporto dietetico o farmacologico di tali sostanze ha portato a modificarne le indicazioni e la prescrivibilità, limitandole attualmente al trattamento dell'ipertrigliceridemia<sup>(10)</sup>. Le più recenti favorevoli evidenze sugli eventi CV hanno tuttavia riconfermato un loro importante ruolo nella riduzione del rischio residuo rappresentato da ipertrigliceridemia e non-HDL colesterolo in pazienti in trattamento ottimizzato con statine.

### Cosa sono gli acidi grassi

Gli acidi grassi (AG) presentano la tipica struttura RCOOH, contenente un'estremità metilica, una catena idrocarburica (R) ed un terminale carbossilico (Figura 1). La catena di carbonio (C) può notevolmente variare in lunghezza, con un *range* compreso tra i 2 e i 36 atomi di C. Vengono distinti in saturi, monoinsaturi e polinsaturi in base al numero di doppi legami C=C presenti nella loro molecola (rispettivamente nessuno, uno o più di uno). Gli AG hanno un nome sia sistematico che comune (ad esempio acido ottadecanoico o stearico) e sono spesso espressi con una formula schematica (notazione abbreviata): CN:p n-x, dove CN rappresenta il numero totale di atomi di C, p il numero di doppi legami, x la posizione del primo doppio legame dall'estremità metilica (n)<sup>(153)</sup>.

Rivestono particolare interesse biologico e medico i PUFA n-3 (Omega 3, PUFA n-3) ed n-6 (Omega 6, PUFA n-6), ovvero AG il cui primo doppio legame è presente rispettivamente sul terzo e sul sesto atomo di C, numerato dall'estremità metilica della catena carboniosa<sup>(153)</sup>.

Gli acidi linoleico (AL) e alfa-linoleico (ALA) sono definiti essenziali perché non possono essere sintetizzati de novo nell'uomo e devono, quindi, essere assunti con la dieta (Tabella 1); sono considerati i precursori delle famiglie PUFA n-3 ed n-6 (154). PUFA n-3. Includono l'ALA (18:3 n-3), di origine vegetale e gli AG di derivazione animale, in specie frutti di mare (olio di pesce), principalmente rappresentati dagli acidi eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3), docosaesaenoico (DHA; 22:6n-3) e

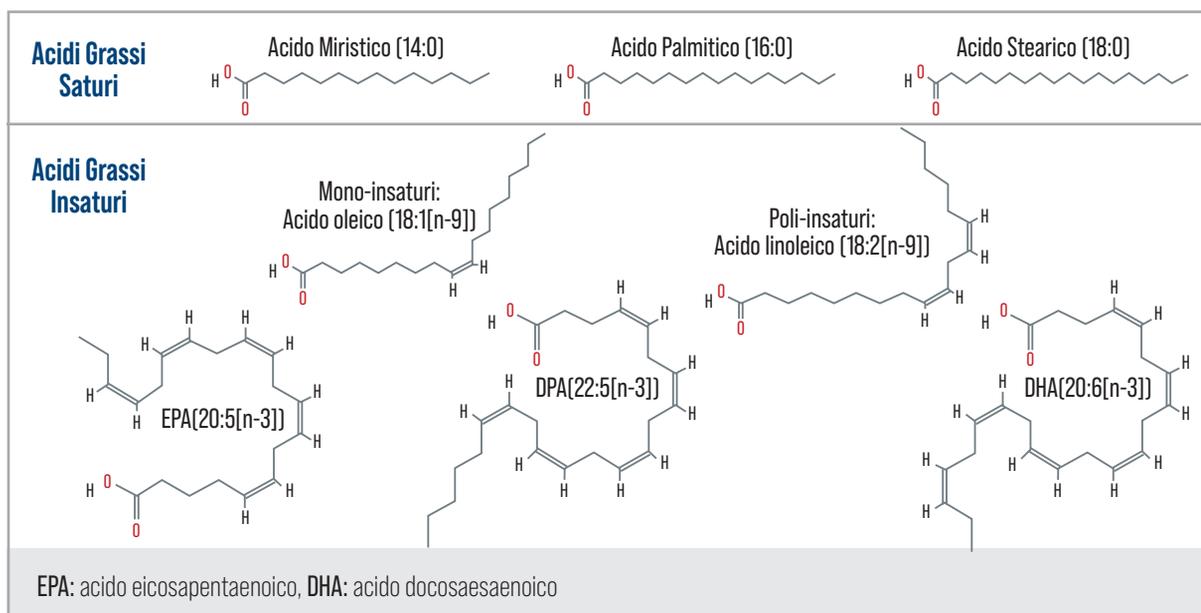


Figura 1. Struttura degli acidi grassi

Tabella 1. Contenuto (in mg) di n-6 PUFA ed n-3 PUFA negli alimenti.

Prodotto	AL	ALA	AA	EPA+DHA
<b>n-6 PUFA</b>				
Olio di semi di mais	50000	900		
Olio di semi di cotone	47800	1000		
Olio di semi di arachide	23900			
Olio di semi di soia	53400	7.600		
Olio di semi di girasole	60200	500		
Olio di cartamo	74000	470		
Margarina	17600	1900		
Lardo	8600	1000	1070	
Uova di gallina	3800	220		
Bacon	6080	250	250	
Prosciutto	2480	160	130	
Soia	8650	1000		
Mais	1630	40		
Mandorle	9860	260		
Noce brasiliana	24900			
Arachidi	13900			
Noci	34100	6800	590	
<b>n-3 PUFA</b>				
Olio di colza	19100	8600		
Olio di semi di lino	13400	55300		
Aringa	150	61	36	1700
Salmone	440	550	300	1200
Trota	74		30	500
Tonno	250	270	280	400
Merluzzo	4	2	3	300

AL: acido linoleico, ALA: acido alfa-linoleico, AA: acido arachidonico, EPA: acido eicosapentaenoico, DHA: acido docosapentaenoico

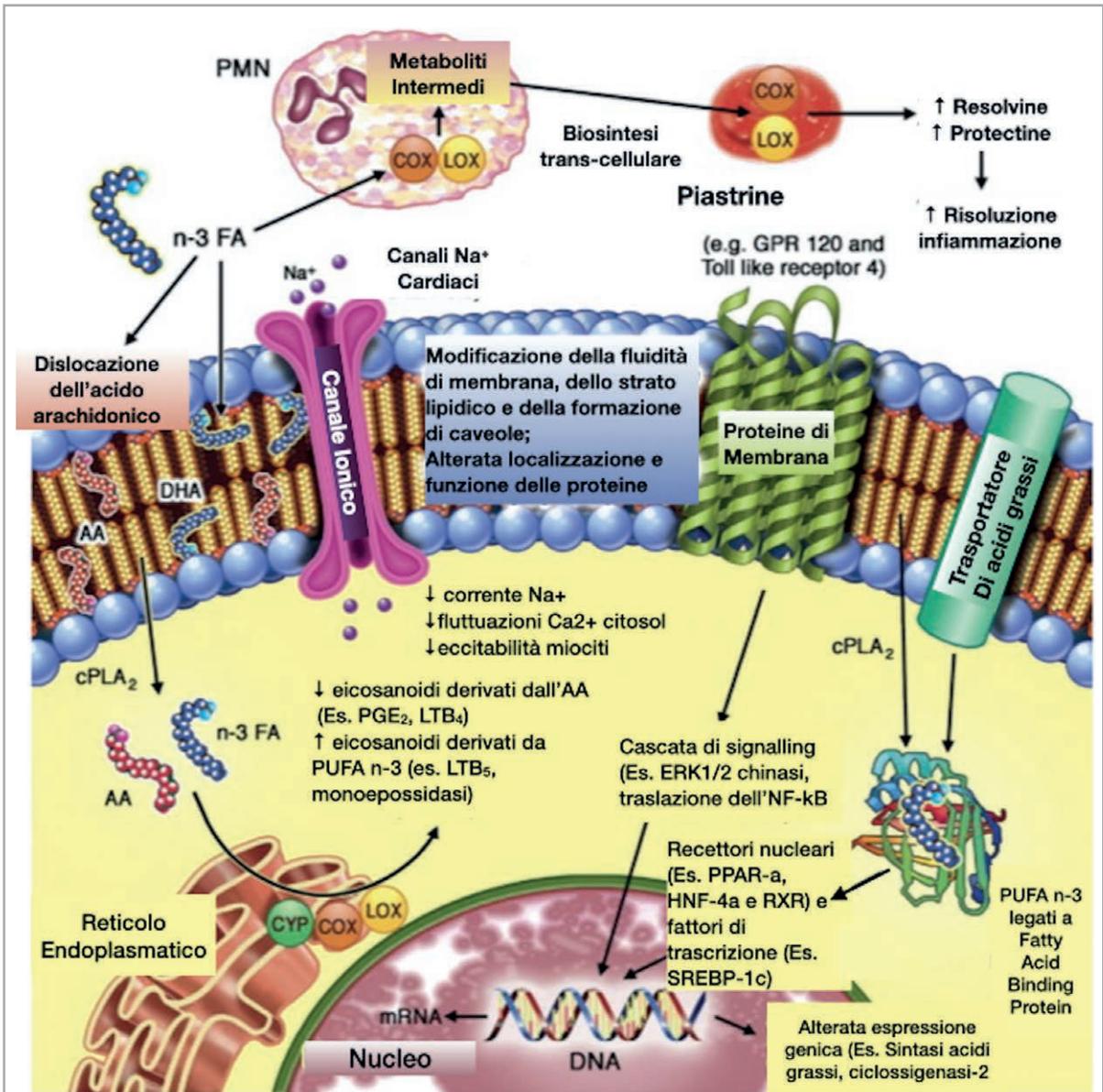
docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3). L'ALA ha mostrato di indurre benefici CV in studi osservazionali<sup>(155)</sup>, l'assunzione di pesce è risultata protettiva verso il rischio di malattia coronarica<sup>(156)</sup> e una correlazione negativa tra PUFA n-3 e mortalità CV è stata segnalata in studi clinici e metanalisi<sup>(157)</sup>.

PUFA n-6. I principali PUFA n-6 sono l'AL e l'acido arachidonico (AA). L'AL è il principale PUFA n-6 alimentare ed è contenuto negli oli vegetali, in noci e semi; l'AA si assume principalmente da carne rossa, uova, alghe e olio di pesce<sup>(158)</sup>. Un'elevata assunzione di PUFA n-6, prevalentemente di AL in sostituzione di AG saturi, sembrerebbe associata a un ridotto rischio di cardiopatia ischemica, ictus ischemico e mortalità CV<sup>(159)</sup>. Diversi studi hanno evidenziato l'importanza dell'equilibrio tra PUFA n-6 ed n-3 piuttosto che della quantità assoluta di ogni singola molecola. E la centralità di questo rapporto è stata sottolineata non solo in ambito cardiologico, ma anche nella patogenesi delle patologie oncologiche, infiammatorie ed autoimmuni. In una versione semplificata di tale concetto, un rapporto n-6/n-3 elevato è considerato dannoso per la salute umana, mentre un valore prossimo ad 1 è ritenuto protettivo nei confronti delle patologie degenerative<sup>(160)</sup>.

In soggetti sani alimentati con una dieta tipica svedese è stato osservato come un rapporto sierico PUFA n-6/n-3 di 4.72:1 risulti associato ad un aumento del numero di leucociti e piastrine e dei livelli di VEGF, quando confrontato con un rapporto PUFA n-6/n-3 di 2.6:1, garantito agli individui che seguivano una dieta di tipo mediterraneo. Questo confronto dietetico e le rispettive implicazioni cliniche sono alla base del riconoscimento dell'importanza dell'alimentazione mediterranea nel mantenimento di un migliore stato di salute, sancito dall'inserimento di tale dieta nell'elenco dei Patrimoni Immateriali dell'Umanità dell'UNESCO<sup>(161)</sup>.

## Meccanismi molecolari alla base degli effetti dei PUFA n-3

I PUFA n-3 producono multipli effetti, manifestando, oltre alla nota funzione ipolipemizzante e ipotrigliceridemizzante, proprietà anti-infiammatorie, anti-trombotiche e sulla funzione endoteliale. I meccanismi molecolari attraverso i quali i PUFA n-3 esercitano la loro pleiotropica attività sono complessi e non ancora completamente definiti. In primo luogo, i PUFA n-3 sono incorporati nella parete e negli organelli cellulari, alterando l'ambiente lipidico delle membrane e la loro fluidità. Con ciò i PUFA n-3 sono coinvolti in diverse funzioni cellulari, quali la trasduzione del segnale e il *protein trafficking*. Da questa stessa modalità sembrano derivare gli effetti benefici dei PUFA n-3 osservati sull'infiammazione, sulla funzione piastrinica e sui fenotipi dei monociti riconosciuti negli individui con ipertrigliceridemia. In particolare, la produzione di mediatori specializzati, come le resolvine della serie E derivate dall'EPA e le protectine e resolvine della serie D derivate dal DHA, possono svolgere un ruolo importante nella risoluzione del fenomeno infiammatorio. Alla riduzione della risposta infiammatoria da parte dei PUFA n-3 concorre l'inibizione della generazione di secondi messaggeri intracellulari, quali il diacilglicerolo e la ceramide. Inoltre, i PUFA n-3 legano e attivano diversi recettori nucleari e fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione dell'espressione di diversi geni che partecipano a funzioni relative all'aterosclerosi, come l'infiammazione, l'omeostasi glucosio-insulina, il metabolismo lipidico e la produzione di adipocitochine. Infine, l'attivazione del peroxisome *proliferator-activated receptor-γ* da parte di PUFA n-3 determina la riduzione della traslocazione di NF-κB nel nucleo, riducendo la generazione di molteplici citochine infiammatorie<sup>(158)</sup>.



FA: fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids, AA: acido arachidonico, DHA: acido docosaesaenoico, COX: ciclo-ossigenasi, LOX: lipossigenasi

Figura 2. Meccanismi molecolari alla base degli effetti dei PUFA n-3

### Meccanismi alla base dell'effetto ipolipemizzante dei PUFA n-3

Sebbene la capacità dei farmaci a base di PUFA n-3 di ridurre i trigliceridi (TG) plasmatici sia ampiamente riconosciuta, il meccanismo d'azione attraverso cui essi agiscono non è completamente interpretato. I risultati di studi preclinici e clinici suggeriscono che i PUFA n-3 riducono le concentrazioni plasmatiche di TG limitandone la sintesi, ma anche diminuendo la loro incorporazione nelle lipoproteine a densità molto bassa (*very low density lipoprotein*, VLDL), riducendo la loro secrezione e migliorando la clearance dei TG da parte delle VLDL<sup>(162,163)</sup>.

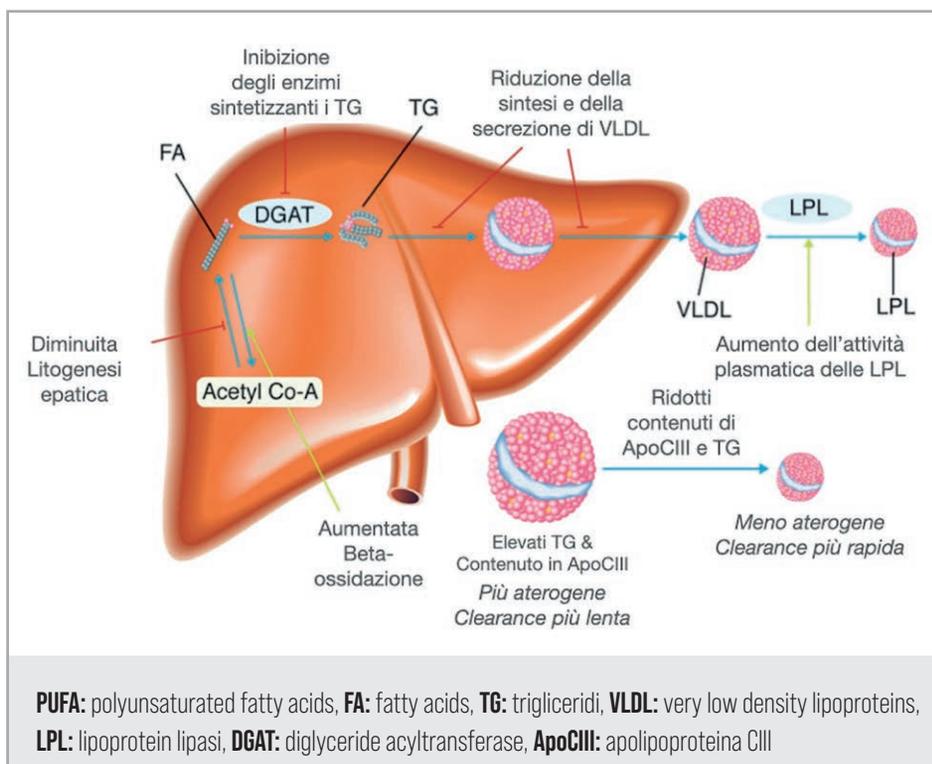
È stato proposto che i PUFA n-3 esercitino questi effetti attraverso una serie di

meccanismi (Figura 3):

- diminuzione della lipogenesi epatica attraverso la soppressione dell'espressione della *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c). Tale effetto, a sua volta, conduce ad una diminuzione dell'espressione degli enzimi preposti alla sintesi di colesterolo, acidi grassi e TG.
- aumento della  $\beta$ -ossidazione degli AG, con conseguente riduzione della disponibilità del substrato necessario per la sintesi di TG e VLDL <sup>(162)</sup>.
- inibizione degli enzimi chiave coinvolti nella sintesi epatica dei TG, come la fosfatasi acida fosfatidica e la diacilglicerolo aciltransferasi <sup>(164)</sup>.
- aumento dell'espressione della lipoproteina lipasi (LPL), componente chiave delle vie biosintetiche delle lipoproteine ricche in TG (*trygliceride-rich lipoproteins*, TRL), con conseguente, maggiore rimozione dei TG da parte delle VLDL e dei chilomicroni circolanti.

I costituenti primari delle formulazioni di PUFA n-3, l'EPA e il DHA, hanno, entrambi, dimostrato di ridurre i TG. Tuttavia, i due PUFA n-3 sono noti per produrre effetti diversi su LDL e HDL <sup>(165)</sup>. In una meta-analisi di studi in cui gli effetti del DHA e dell'EPA sono stati posti a diretto confronto, il DHA è stato associato ad una maggiore riduzione dei TG, ma anche ad un maggiore incremento del colesterolo LDL rispetto all'EPA. Il DHA è stato, inoltre, associato ad un aumento delle HDL rispetto al placebo, ma non rispetto all'EPA. Sono necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi e il significato di tali differenze <sup>(165)</sup>.

È stato anche dimostrato che i PUFA n-3 riducono i livelli circolanti di apolipoproteina CIII (ApoCIII) che si ritiene contribuisca alla progressione dell'aterosclerosi e delle malattie CV attraverso molteplici meccanismi, tra cui l'attivazione e il potenziamento



**Figura 3.** Meccanismi alla base dell'effetto ipolipemizzante dei PUFA n-3

di vie pro-infiammatorie. Inoltre, inibisce anche l'assorbimento mediato dal recettore delle TRL e dei loro *remnants*, rallentando la loro *clearance*, e promuovendo la formazione di piccole particelle dense di LDL a partire dalle VLDL. L'ApoCIII fornisce anche un contributo chiave alla patogenesi dell'ipertrigliceridemia, principalmente a causa della sua azione inibitoria sull'LPL che idrolizza le TRL plasmatiche, producendo AG liberi, *remnants* di chilomicroni e lipoproteine a densità intermedia (*intermediate density lipoproteins*, IDL). Alcune particelle di IDL possono subire un'ulteriore idrolisi mediata da LPL, convertendosi in LDL.

È stato ipotizzato che proprio alle loro differenti interazioni con la sintesi di ApoCIII possano essere ricondotti i diversi effetti del DHA e dell'EPA sul profilo lipidico. Si ritiene che il DHA riduca la sintesi di ApoCIII, regolando un certo numero di fattori di trascrizione epatica, quali l'*hepatic nuclear factor-4-alpha* (HNF4A) e il *forkhead box-O transcription factor O1* (FOXO1). In questo modo, il DHA promuove maggiormente l'idrolisi delle VLDL, con conseguente maggiore conversione delle stesse in LDL, determinando infine la formazione di particelle LDL più grandi e meno dense. Ulteriori studi si rendono necessari allo scopo di chiarire queste proprietà.

Oltre all'effetto di riduzione dei TG, i PUFA n-3 sono accreditati di ulteriori benefici effetti sui fattori di rischio cardio-metabolici, dimostrando di ridurre in modo significativo una serie di *marker* dell'infiammazione associati all'aterosclerosi e allo sviluppo di malattie CV. Studi clinici hanno rilevato che i livelli di fosfolipasi A2 lipoproteina-associata (Lp-PLA2) vengono ridotti dai PUFA n-3 e dall'icosapent etile (IPE) rispetto al placebo, e che la concentrazione di proteina C-reattiva (PCR) ad alta sensibilità è diminuita dall'IPE<sup>(166,167)</sup>. Studi preclinici e clinici hanno, altresì, evidenziato che EPA e DHA possiedono effetti antiaritmici e antiossidanti, migliorano la funzione endoteliale e favoriscono un profilo di lipoproteine meno aterogenico se somministrati in associazione alla terapia con statine<sup>(168)</sup>. Anche i biomarcatori di attività piastrinica risultano ridotti dall'EPA e dal DHA rispetto al placebo, indipendentemente dall'assunzione concomitante di aspirina e statine e si suppone che a ciò si associ una inibizione dell'aggregazione piastrinica. In merito a quest'ultima proprietà, si ritiene che il DHA possieda effetti anti-aggreganti più potenti di quelli dell'EPA. Inoltre, il DHA ha dimostrato di ridurre la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca e di svolgere un effetto protettivo sul declino cognitivo.

Sebbene la maggior parte degli studi sul potenziale terapeutico dei PUFA n-3 si sia concentrata sull'EPA e sul DHA, ricerche recenti hanno approfondito il meccanismo d'azione del DPA. I livelli di DPA sono risultati associati in modo indipendente ad una riduzione del rischio di sviluppo di infarto miocardico (IM) e coronaropatia, mentre ridotti livelli circolanti di DPA hanno dimostrato di associarsi allo sviluppo di placche ricche in lipidi e di arteriopatia periferica.

EPA, DHA e DPA contrastano l'aggregazione piastrinica in modo dipendente dalla dose assunta. Tuttavia, il DPA si è rivelato inibitore dell'attività piastrinica più potente dell'EPA e del DHA. Come il DHA e l'EPA, anche il DPA può ridurre l'espressione di geni pro-infiammatori.

Le modalità di riduzione dei TG da parte dei PUFA n-3 a catena lunga differiscono da quelle di altri farmaci ipolipemizzanti, quali le statine. Pertanto, se somministrati in combinazione, farmaci delle 2 classi potrebbero potenzialmente determinare effetti benefici complementari sul profilo lipidico<sup>(162)</sup>. Le riduzioni incrementali dei livelli di TG che si ottengono quando i PUFA n-3 vengono associati alle statine hanno confermato questo assunto<sup>(169)</sup>.

## PUFA n-3 e placca ateromasica

La relazione inversa riscontrata tra lo spessore intima-media della carotide e l'uso di PUFA n-3 ha suggerito che questi ultimi possano esercitare attività protettiva nei confronti dell'aterosclerosi in tale sede. Esiste specifica evidenza che tale effetto si realizzi attraverso una riduzione dell'infiammazione e un'aumentata stabilità della placca.

In uno studio che ha arruolato pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica percutanea è stato valutato il rapporto tra la vulnerabilità della placca ateromasica e il rapporto sierico PUFA n-3/n-6<sup>(170)</sup>. Il rapporto EPA/AA è stato esaminato al momento del ricovero del paziente. Un esame angioscopico del vaso culprit ha valutato la tonalità di colore della placca (bianco 0; giallo leggero 1; giallo 2; giallo intenso 3) e l'eventuale presenza di un trombo. I pazienti con angina stabile (n=38) sono stati divisi in 2 gruppi in base ad un rapporto EPA/AA ridotto (<0,37; n=19) o elevato ( $\geq 0,37$ ; n=19). Nel gruppo con EPA/AA ridotto, la massima tonalità gialla delle placche era significativamente più alta rispetto ai pazienti con angina stabile e rapporto EPA/AA elevato. Il numero di placche gialle non-culprit con associato un trombo tendeva ad essere più elevato, senza raggiungere la significatività statistica. L'analisi multivariata rivelava un'associazione dei ridotti livelli sierici di EPA e un basso rapporto EPA/AA con il riscontro di placche gialle di grado 3, maggiormente vulnerabili.

In un altro studio sono state valutate 49 placche ateromasiche non-culprit con cappuccio sottile (*thin-cap fibroatheroma*, TCFA) in 30 pazienti con dislipidemia non trattata farmacologicamente<sup>(171)</sup>. I pazienti sono stati randomizzati a terapia con EPA (1,8 g/die) + rosuvastatina (n=15, 23 TCFA) o con sola rosuvastatina (n=15, 26 TCFA). Sono stati eseguiti interventi percutanei e una OCT di *follow-up* a 9 mesi per valutare i cambiamenti morfologici delle TCFA. Sono stati valutati anche il rapporto EPA/AA e i livelli di pentraxina-3. Nonostante che i livelli di LDL durante il *follow-up* fossero comparabili nei due gruppi, i soggetti trattati con EPA+statina hanno presentato un rapporto EPA/AA più elevato e livelli di pentraxina-3 più bassi rispetto a coloro che ricevevano la sola statina. L'OCT ha, inoltre, evidenziato nel gruppo EPA + statina un maggiore incremento dello spessore del cappuccio fibrotico, una riduzione più evidente dell'arco lipidico e della sua lunghezza, nonché un minor riscontro di accumulo macrofagico. Tali evidenze suggeriscono che l'uso concomitante di EPA e rosuvastatina contribuisce alla stabilizzazione di una placca vulnerabile in misura maggiore rispetto alla sola statina e, presumibilmente, attraverso l'inibizione dell'infiammazione della parete arteriosa. Il recente *trial* clinico controllato, randomizzato, in doppio cieco EVAPORATE<sup>(172)</sup> ha valutato l'evoluzione del volume della placca ateromasica, mediante *TC multidetector* (MDCT), confrontando gli effetti di una dose di 4 g/die di IPE in associazione alla dieta e alla terapia con statina, con quelli della statina da sola. Lo studio ha arruolato 80 pazienti con aterosclerosi coronarica documentata dall'MDCT (una o più stenosi con restringimento >20%), già in terapia con statina e con livelli di TG costantemente elevati (valore mediano in entrambi i gruppi di 259,1 $\pm$ 78,1 mg/dL). Le MDCT di *follow-up* sono state eseguite a 9 e 18 mesi. L'*endpoint* primario era rappresentato dalle variazioni di volume con bassa attenuazione (LAP volume) a 18 mesi. Nel gruppo trattato con IPE il LAP volume della placca si è ridotto del 17%, mentre nel gruppo di controllo si è più che raddoppiato (+109%; p=0.0061). Sono state osservate, inoltre, differenze significative nell'indice di progressione di altre placche, come quelle fibrose e fibro-adipose, i cui volumi si sono ridotti nel gruppo IPE e sono progrediti nel gruppo placebo (p<0.01).

## Differenti formulazioni farmacologiche (OM3EE, OM3CA, IPE, EPA/ DPA/DHA EE, prescrivibili come farmaco)

### Note generali

Formulazioni prescrivibili a base di PUFA n-3 sono indicate, in associazione alla dieta, per la riduzione dei TG sierici in individui adulti affetti da ipertrigliceridemia.

Sono attualmente disponibili principalmente tre formulazioni di PUFA n-3<sup>(162)</sup>:

- a base di esteri etilici di acidi grassi a catena lunga (OM3EE), composti principalmente da EPA e DHA;
- a base di formulazione carbossilica di PUFA n-3 (OM3CA), composti da AG a catena lunga in forma libera, fra cui EPA, DHA e DPA;
- a base di IPE, composto per più del 96% dall'estere etilico purificato e stabilizzato dell'EPA<sup>(173)</sup>.

IPE è, dunque, un composto stabile e altamente purificato, contenente un unico principio attivo. È stato recentemente approvato negli Stati Uniti dalla FDA per la prevenzione delle malattie CV in soggetti ad elevato rischio (in terapia con statine, con trigliceridemia >150 mg/dL, pregressa malattia CV o diabete mellito e 2 o più fattori di rischio CV). Tale approvazione deriva da numerose evidenze. La principale proviene dal trial REDUCE-IT<sup>(174)</sup>, in cui è stata osservata una riduzione del 25% del rischio di eventi CV nei pazienti trattati con IPE. In contrasto, le altre due formulazioni prevedono una combinazione di prodotti a base di PUFA n-3 (ad es. DHA+EPA), con limitate evidenze in termini di riduzione del rischio di eventi CV<sup>(173)</sup>. Nonostante ciò, alle dosi approvate tutte e tre le formulazioni disponibili in commercio si sono dimostrate efficaci nel ridurre la trigliceridemia e i livelli sierici di VLDL.

### Biodisponibilità

È stato dimostrato che l'assorbimento di DHA ed EPA varia da una formulazione all'altra. La formulazione di OM3CA ha una biodisponibilità (area che sottende la curva "concentrazione plasmatica-tempo" da zero all'ultimo valore di concentrazione misurato [AUC(0-t)]) di 4 volte maggiore sia per EPA che per DHA in caso di basso consumo di grassi, rispetto a quella degli OM3EE [12]. L'assorbimento degli OM3EE e di IPE richiede una idrolisi mediata da una lipasi pancreatica. Dal momento che i livelli di lipasi pancreatica dipendono dalla quantità e dal tipo di lipidi ingeriti, si ritiene che l'assorbimento degli OM3EE dipenda fortemente dal contenuto di grassi dei pasti. Al contrario, i PUFA n-3 in forma di AG libero, contenuti nelle formulazioni di OM3CA, non dipendono dall'idrolisi della lipasi pancreatica. Pertanto, la biodisponibilità di EPA e DHA presenti in tale formulazione risulta meno dipendente dal contenuto di grassi dei pasti rispetto alle formulazioni di OM3EE.

In uno studio condotto in condizioni di scarso introito di grassi, il 59% dei soggetti in trattamento con OM3CA ha mantenuto un AUC(0-t) per EPA e DHA  $\geq 50\%$  rispetto alla AUC(0-t) osservata in caso di elevato introito di grassi. In contrasto, tale dato era presente solamente nel 6% dei soggetti trattati con OM3EE. Tale osservazione potrebbe risultare utile da un punto di vista terapeutico, poiché le attuali linee guida raccomandano ai pazienti con ipertrigliceridemia grave di seguire una dieta a bassissimo contenuto di grassi<sup>(175)</sup>.

## Efficacia

Tutte le formulazioni a base di PUFA n-3, somministrati ad una dose di 4 g/die, hanno dimostrato di ridurre significativamente i livelli di TG, VLDL, non-HDL e ApoB nei pazienti ipertrigliceridemici e con alto rischio CV <sup>(162)</sup>. Dosi maggiori di PUFA n-3 e livelli di trigliceridemia di base più elevati si associano a maggiori riduzioni percentuali dei TG <sup>(176)</sup>. Ciò è stato evidenziato anche nel MARINE trial <sup>(166)</sup>, in cui sono stati confrontati differenti dosaggi di etil-estere di EPA altamente purificato. Tale effetto risulta indipendente dalla gravità della ipertrigliceridemia.

Nello studio JELIS <sup>(177)</sup>, l'utilizzo di una formulazione di etil-estere di EPA altamente purificato ha dimostrato di ridurre gli eventi CV quando associato alla statina e una riduzione dello spessore della placca aterosclerotica. Inoltre, ha dimostrato di possedere un buon profilo di sicurezza e tollerabilità.

Nel REDUCE-IT <sup>(174)</sup> è stato, invece, evidenziato che una dose di 4 g/die di etil estere di EPA determina effetti favorevoli in termini di riduzione degli eventi ischemici e della mortalità per cause CV.

Al contrario, nel trial STRENGTH <sup>(178)</sup>, che ha utilizzato la formulazione OM3CA (EPA+DHA), si è osservato un effetto neutro in termini di eventi CV, non supportando quindi l'ipotesi di utilizzo di PUFA n-3 per la riduzione del rischio di eventi CV.

Le formulazioni contenenti DHA (OM3CA e OM3EE) possono provocare, specialmente nei pazienti con ipertrigliceridemia grave (TG >500 mg/dL) un incremento dei livelli di LDL. Tale fenomeno non si associa però ad un incremento dei livelli di colesterolo non-HDL o di ApoB, che sembra essere un migliore indicatore di rischio CV rispetto ai valori di LDL <sup>(162)</sup>. Ciò è particolarmente vero per i pazienti con ipertrigliceridemia, che spesso hanno bassi livelli di LDL <sup>(175)</sup>.

Le formulazioni non contenenti DHA (EPA e IPE) sembrano non provocare un incremento dei livelli di LDL <sup>(173)</sup>, come evidenziato nei trial clinici MARINE <sup>(179)</sup> e ANCHOR <sup>(180)</sup>, che hanno studiato efficacia e sicurezza di IPE.

Questi effetti differenti dell'EPA rispetto al DHA sui livelli di LDL possono essere attribuiti a uno o più meccanismi:

- in primo luogo, il DHA (ma non l'EPA) può ridurre l'espressione del recettore delle LDL (LDLR) e la *clearance* LDLR-mediata da parte del fegato, che è un importante regolatore inverso dei livelli di LDL. Ciò sembra avvenire attraverso la soppressione dell'espressione della *sterol regulatory element binding protein* (SREBP-2) da parte del DHA.
- In secondo luogo, il DHA può aumentare l'attività della *cholesteryl ester transfer protein* (CETP), che promuove il trasferimento dei core lipidici tra le lipoproteine, tendendo ad aumentare l'LDL e diminuire i livelli di HDL. L'EPA invece ha un effetto neutro sull'attività del CETP.
- Infine, il DHA sembra up-regolare l'attività dell'enzima lipoproteina lipasi in misura maggiore rispetto all'EPA, con ciò favorendo la conversione del VLDL in LDL e tendendo ad aumentare i livelli di LDL.

È interessante notare come nei pazienti con TG >200 mg/dL, ma <500 mg/dL, non sia stato osservato alcun aumento di LDL con nessuna delle formulazioni. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che nei vari trial clinici su PUFA n-3, tali pazienti avevano livelli di TG sierici di base più bassi ed erano già in terapia con statina.

È stato inoltre osservato che, a differenza di IPE, le formulazioni contenenti DHA aumentano i livelli di HDL-C. Ad oggi, l'effetto di qualsiasi formulazione di PUFA n-3 sulla pancreatite non è stato invece determinato <sup>(162)</sup>.

Si ritiene inoltre che EPA e DHA agiscano in modo differente e, in alcuni casi, contrastante a livello della membrana plasmatica. In particolare, l'inserzione di EPA e DHA avviene in regioni distinte del duplice strato della membrana lipidica, come conseguenza della differente lunghezza degli idrocarburi coinvolti. Il loro inserimento provoca cambiamenti conformazionali che risultano in un incremento della fluidità di membrana e nella promozione dei domini di colesterolo. Fra i due PUFA n-3, EPA ha una struttura più stabile ed estesa e ciò contribuisce alla stabilità di membrana, oltre che all'inibizione della ossidazione dei lipidi e alla formazione di nuovi domini di colesterolo<sup>(181)</sup>. I loro principali effetti sono riassunti nella Figura 4.

## Sicurezza e tollerabilità

Le formulazioni disponibili in commercio a base di PUFA n-3 sono generalmente ben tollerate, con frequenze di interruzione del trattamento simili tra gruppi in trattamento e gruppi placebo<sup>(162)</sup>. Negli studi clinici, gli eventi gastro-intestinali sono stati i principali effetti avversi con formulazioni contenenti DHA, mentre l'artralgia è stato il principale evento avverso segnalato con EPA<sup>(173)</sup>. Nello studio REDUCE-IT<sup>(174)</sup>, il trattamento con EPA è stato associato ad un'aumentata incidenza di fibrillazione

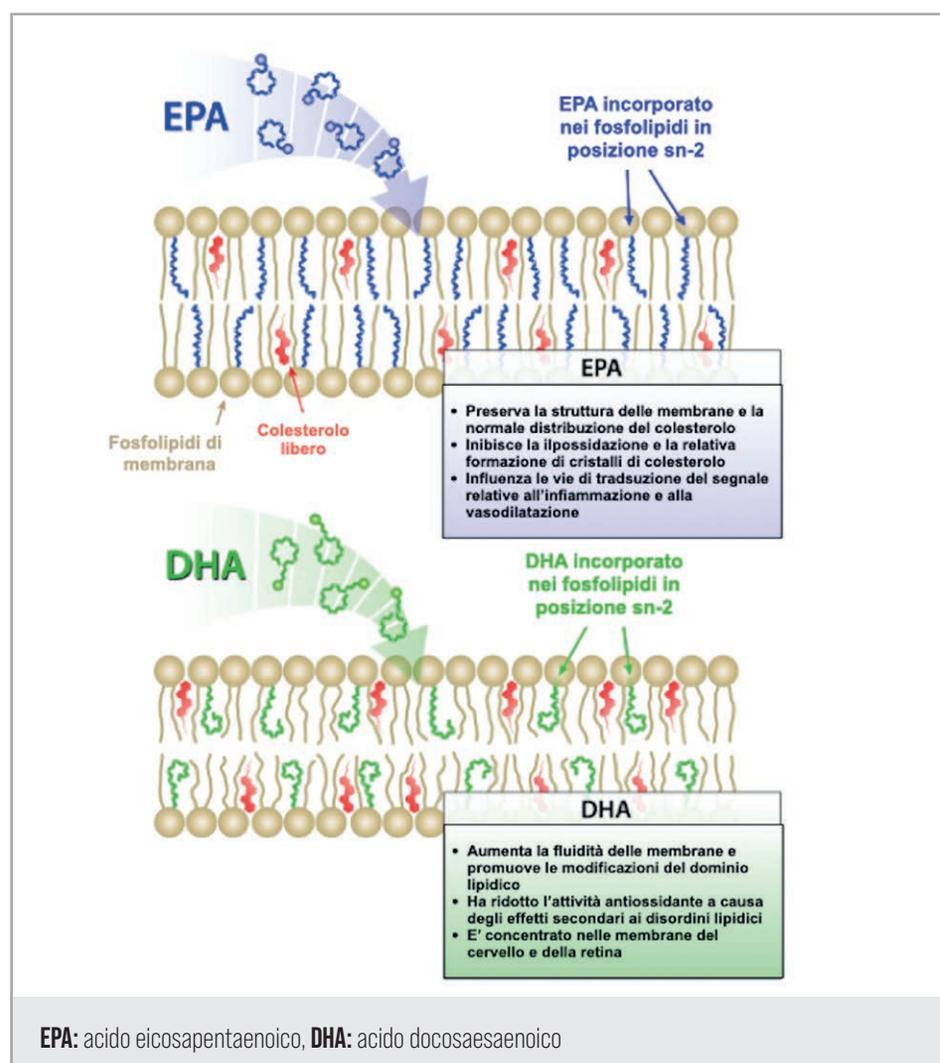


Figura 4. Principali effetti di EPA e DHA

atriale (5.3% contro 3.9% nel gruppo placebo) e di edemi periferici (6.5% contro 5.0% nel gruppo placebo). I meccanismi patogenetici alla base di tali osservazioni sono sconosciuti, ma studi in vitro e su animali hanno dimostrato che i PUFA n-3 possono influenzare i canali ionici del tessuto miocardico. Precedenti studi osservazionali e randomizzati hanno esaminato i potenziali effetti antiaritmici di PUFA n-3, portando a risultati contrastanti. Alcuni studi hanno rilevato una tendenza verso un'aumentata incidenza di fibrillazione atriale con PUFA n-3. Nel *trial* REDUCE-IT<sup>(174)</sup>, l'aumentata incidenza di fibrillazione atriale nel gruppo trattato con EPA non è risultata associata ad un'aumentata incidenza di scompenso cardiaco o di ictus. Sono, quindi, necessari ulteriori studi per esaminare altre potenziali conseguenze legate alla fibrillazione atriale durante il trattamento con EPA.

Sia nello studio JELIS<sup>(177)</sup> che nel REDUCE-IT<sup>(174)</sup> sono stati osservati modesti aumenti degli episodi di emorragia nel gruppo in trattamento con EPA rispetto ai controlli. I tassi di emorragia sono risultati inferiori nello JELIS (1,1% con EPA; 0,6% nei controlli) rispetto al REDUCE-IT (2,7% con EPA; 2,1% con placebo); al basale, la terapia antiaggregante era presente nel 13% e nel 14% dei rispettivi gruppi di trattamento in JELIS, rispetto al 79,7% e al 79,1% dei rispettivi gruppi nel REDUCE-IT. Sebbene non siano stati osservati gravi eventi emorragici in REDUCE-IT o in altri studi clinici con PUFA n-3, anche in coloro i quali erano in terapia con aspirina o warfarin e in coloro che avevano subito un intervento chirurgico o per via percutanea, la potenziale interazione tra EPA e farmaci antitrombotici merita ulteriori indagini. Non è noto se i pazienti con allergie ai pesci e/o ai molluschi siano a maggior rischio di reazioni allergiche ai PUFA n-3. Quindi queste formulazioni devono essere utilizzate con cautela nei pazienti con ipersensibilità nota ai pesci e/o ai molluschi<sup>(162)</sup>.

## Differenze rispetto a integratori alimentari a base di PUFA n-3

Gli integratori alimentari a base di PUFA n-3 sono ampiamente utilizzati e sono tra gli integratori alimentari più popolari in tutto il mondo. Tuttavia, essi non sono soggetti alle norme rigorose richieste per i farmaci soggetti a prescrizione medica. Di conseguenza, il contenuto di EPA e DHA degli integratori alimentari può essere variabile e insufficiente<sup>(162)</sup>.

Spesso vengono erroneamente considerati adeguati ed affidabili gli integratori alimentari a base di PUFA n-3. Tuttavia, una recente analisi dei singoli integratori a base di olio di pesce ha dimostrato come essi contengano una dose inadeguata di EPA e DHA, in media equivalente a solo il 68% di quella richiesta. La stessa analisi ha rilevato che la maggior parte degli integratori supera i livelli raccomandati di *marker* dell'ossidazione. Il processo di ossidazione subito dai PUFA n-3 ne determina una riduzione progressiva di concentrazione, con conseguente riduzione di efficacia. Uno studio ha dimostrato che era necessaria un'assunzione mediana di 11 porzioni di integratori alimentari di olio di pesce al giorno per ottenere una dose di 3,4 g/giorno di PUFA n-3. Lo stesso studio ha evidenziato che gli integratori alimentari contengono spesso altri grassi e colesterolo e che il loro contenuto varia ampiamente tra i diversi prodotti. Tale variabilità può essere fonte di confusione per i pazienti, ma anche per i medici, comportando l'assunzione di un dosaggio impreciso di farmaco, potenzialmente inadeguato per ridurre efficacemente i TG sierici nei pazienti con ipertrigliceridemia<sup>(182)</sup>.

Sulla base di queste evidenze dobbiamo concludere che, a tutt'oggi, i benefici dei nutraceutici a base di PUFA n-3 risultano incerti e il loro utilizzo controverso<sup>(162)</sup>.

## Studi controllati di diverse formulazioni di PUFA n-3

### Efficacia sul profilo lipidico ed eventi CV

**GISSI-Prevenzione trial (1999).** Studio multicentrico<sup>(183)</sup> “open label”; ha valutato 11.324 pazienti con IM acuto recente (<3 mesi) randomizzati in quattro gruppi di trattamento: gruppo 1, PUFA n-3 (850-882 mg di EPA e DHA come esteri etilici in rapporto EPA/DHA 1:2); gruppo 2, vitamina E (300 mg, in 1 cp di α-tocoferolo sintetico); gruppo 3, PUFA n-3 + vitamina E; gruppo 4 di controllo (nessun supplemento). *Endpoint* primario combinato di efficacia rappresentato dal tasso cumulativo di mortalità per tutte le cause, IM non fatale e ictus non fatale; e il tasso cumulativo di morte per cause CV, IM non fatale e ictus non fatale. Sono state eseguite analisi secondarie per ciascuna componente degli endpoint primari e per le principali cause di morte.

Il trattamento con PUFA n-3, ma non con vitamina E, ha ridotto significativamente l'*endpoint* primario (riduzione RR del 10% (95% CI 1-18) con analisi della varianza *two-way* e del 15% (2-26) con analisi *four-way*). I benefici sono stati attribuiti alla riduzione del rischio di morte (14% (3-24) con *two-way*, 20% (6-33) *four-way*) e della morte per cause CV (17% (3-29) *two-way*, 30% (13-44) *four-way*). Non è stata osservata modificazione significativa dei valori di colesterolo (totale, HDL, LDL) né del fibrinogeno in tutti i gruppi. In confronto con il gruppo di controllo, la lieve riduzione della trigliceridemia è stata evidenziata con maggiore frequenza nei pazienti trattati con PUFA n-3. Gli effetti del trattamento combinato sono risultati simili a quelli osservati nel trattamento con soli PUFA n-3, sia per l'*endpoint* primario (14% (1-26)), che per gli eventi fatali (20% (5-33)).

I risultati ottenuti dimostrano i benefici clinici, statisticamente significativi, della supplementazione alimentare con PUFA n-3, laddove la supplementazione con vitamina E non ha dimostrato alcun beneficio.

**JELIS (Japan EPA Lipid Intervention Study; 2007).** *Trial* randomizzato “open label”, con analisi degli endpoint in cieco che ha valutato gli effetti di prevenzione a lungo termine dell'EPA degli eventi coronarici maggiori in pazienti con ipercolesterolemia<sup>(177)</sup>. Nell'arco di 3 anni sono stati arruolati 18.645 pazienti (60% donne; età media 61 anni) affetti da coronaropatia (accertata angina pectoris, interventi coronarici, pregresso IM; n=3664) o esenti da coronaropatia (n=14.981), con valore basale di C totale >250 mg/dL (corrispondente a LDL >170 mg/dL).

La terapia di prima linea per tutti i pazienti consisteva in pravastatina 10 mg o simvastatina 5 mg una volta al giorno (20 mg di pravastatina e 10 mg di simvastatina in caso di ipercolesterolemia grave). *Endpoint* primari erano gli eventi coronarici maggiori: morte cardiaca improvvisa, IM fatale e non fatale e eventi non fatali, come sviluppo di angina instabile, CABG, angioplastica e/o stenting coronarico. I pazienti sono stati randomizzati a trattamento con EPA (EPA+statina) o sola statina (controlli). Dopo un *follow-up* medio di 4.6 anni, l'*endpoint* primario si è verificato in 262 pazienti (2.8%) del gruppo EPA e 324 pazienti (3.5%) del gruppo di controllo, con una relativa riduzione del 19% di eventi coronarici maggiori (p=0.011). La riduzione del 25% del colesterolo LDL in entrambi i gruppi dopo il trattamento non è risultato essere un fattore significativo nella riduzione del rischio di eventi. Il rischio di angina instabile e di eventi coronarici non fatali si è ridotto del 19% nel gruppo EPA, mentre la morte

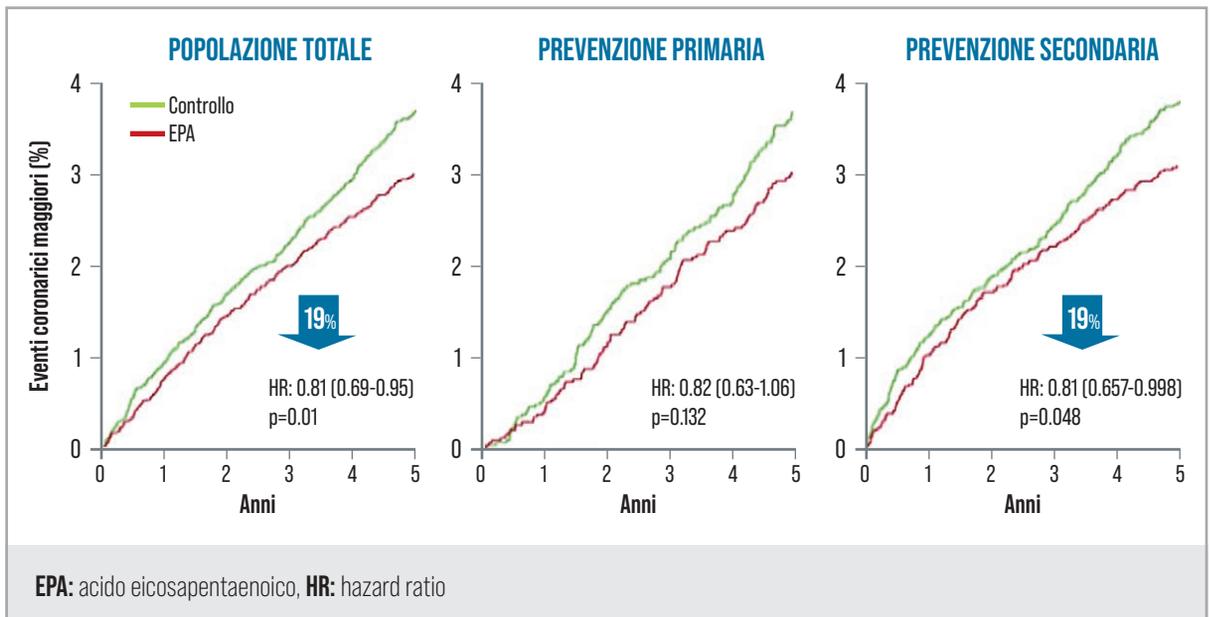


Figura 5. Risultati dello studio JELIS (Modificata da ref #177)

cardiaca improvvisa e la morte per cause coronariche sono risultate sovrapponibili nei 2 gruppi.

Nei pazienti con coronaropatia (prevenzione secondaria), l'EPA ha ridotto gli eventi coronarici maggiori del 19% rispetto ai controlli (8.7% vs. 10.7%;  $p=0.048$ ). Nei pazienti esenti da coronaropatia l'EPA ha ridotto in misura non significativa gli eventi coronarici maggiori (-18%; 1.4% vs. 1.7% dei controlli;  $p=0.132$ ).

I risultati dello studio fecero ipotizzare che EPA fosse un trattamento promettente per la prevenzione primaria e secondaria degli eventi coronarici maggiori, specialmente per quelli non fatali (Figura 5).

Una sotto-analisi del JELIS del 2012, evidenziando la riduzione del 38% ( $p=0.007$ ) degli eventi coronarici nei pazienti che non raggiungevano i valori target di LDL e colesterolo non-HDL, concludeva che la supplementazione con EPA era anche più efficace nei pazienti che non raggiungevano i valori target di colesterolemia.

**GISSI-HF (2008).** Studio randomizzato, multicentrico, in doppio cieco<sup>(184)</sup>, che ha arruolato pazienti affetti da scompenso cardiaco cronico (classe NYHA II-IV), in assenza di un criterio di ingresso relativo all'eziologia o al valore di frazione di eiezione, randomizzati a ricevere PUFA n-3 1 g/die ( $n=3494$ ) o placebo ( $n=3481$ ), seguiti per un *follow-up* mediano di 3,9 anni. Gli *endpoint* primari erano rappresentati dal tempo di morte e dal tempo di morte o di ospedalizzazione per cause CV; è stata effettuata una analisi "*intention-to-treat*". L'uso di PUFA n-3 ha determinato una lieve, ma significativa riduzione del rischio di mortalità totale rispetto al placebo, 27% vs. 29%, rispettivamente (HR 0.91, 95% CI 0.83-0.99;  $p=0.041$ ) e dell'*endpoint* combinato di morte o di ospedalizzazione per cause CV, 57% vs. 59%, rispettivamente (HR 0.92, 99% CI 0.84-0.99;  $p=0.009$ ), fornendo un dato interessante in ambito di insufficienza cardiaca con un trattamento semplice e sicuro. Relativamente al profilo di sicurezza, in entrambi i gruppi i disturbi gastrointestinali sono stati l'evento avverso più comune [96 pazienti (3%) trattati con PUFA n-3 vs. 92 (3%) di quelli trattati con placebo] e non clinicamente significativo.

**ALPHA OMEGA (2010).** Studio randomizzato, multicentrico, in doppio cieco <sup>(185)</sup>, che ha arruolato 4837 pazienti con storia di IM acuto nei 10 anni precedenti l'arruolamento, in terapia medica ottimizzata, randomizzati a ricevere per 40 mesi una delle 4 formulazioni di margarina previste dallo studio: supplementata con una combinazione di EPA e DHA (400 mg/die di EPA-DHA), supplementata con ALA (2 g/die di ALA), supplementata con EPA-DHA e ALA, o margarina placebo. L'*endpoint* primario dello studio era il tasso di eventi CV maggiori (eventi CV fatali e non fatali, rivascolarizzazione coronarica percutaneo o chirurgica). Lo studio ha dato un risultato neutro, in quanto né la combinazione EPA-DHA né ALA hanno ridotto l'*endpoint* primario (HR con EPA-DHA 1.01, 95% CI 0.87-1.17; p=0.93; HR con ALA 0.91, 95% CI 0.78-1.05; p=0.20). Il tasso di eventi avversi non è stato differente tra i vari gruppi esaminati. Il risultato non significativo del *trial* Alpha Omega, a differenza degli studi precedentemente citati, può essere attribuito da un lato al progressivo miglioramento nel tempo della terapia farmacologica del paziente con sindrome coronarica cronica (85% in terapia con statine), dall'altro alle caratteristiche della popolazione arruolata, di circa 10 anni più anziana rispetto a GISSI-Prevention, GISSI-HF e JELIS, in prevalenza di sesso maschile (78%) rispetto al JELIS (40%), con storia di IM nei 10 anni precedenti rispetto al recente IM (<3 mesi) del GISSI-Prevention e alla storia di scompenso cardiaco del GISSI-HF.

**REDUCE-IT (2019).** Studio multicentrico, randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco <sup>(174)</sup>, che ha valutato gli effetti dell'èstere etilico di EPA sugli eventi CV in pazienti con elevati livelli di trigliceridemia. Il *trial* ha arruolato e seguito in media per 4,9 anni, 8179 pazienti con diagnosi di malattia CV (70.7%; prevenzione secondaria) o con diabete mellito e altri fattori di rischio in terapia con statina. I pazienti dovevano presentare al basale una trigliceridemia compresa tra 135 e 499 mg/dL e un valore di LDL compreso tra 41 e 100 mg/dL. I pazienti sono stati randomizzati a ricevere 2 g dell'èstere etilico di EPA due volte al giorno (con una dose complessiva di 4 g) o placebo (olio minerale). L'*endpoint* composito primario era rappresentato dall'associazione di morte CV, IM non fatale, ictus non fatale, rivascolarizzazione coronarica o angina instabile. Gli *endpoint* secondari chiave erano rappresentati dall'associazione di morte CV, IM non fatale e ictus non fatale. L'*endpoint* primario si è verificato nel 17.2% dei pazienti del gruppo EPA, rispetto al 22% dei controlli (HR 0.75, 95% CI 0.68-0.83; p<0.001) (Figura 6). Gli *endpoint* secondari sono stati osservati, rispettivamente, nell'11.2% dei pazienti con EPA e nel 14.8% dei pazienti con placebo (HR 0.74, 95% CI 0.65-0.83; p<0.001). Il tasso di eventi ischemici è risultato significativamente inferiore nel gruppo EPA rispetto al gruppo placebo, così come il tasso di mortalità per cause CV (4.3% vs. 5.2%; HR 0.80, 95% CI 0.66-0.98; p=0.03).

Per quanto concerne il profilo di sicurezza è stato osservato un aumento dei casi di *flutter* o fibrillazione atriale nei pazienti trattati con EPA rispetto al gruppo di controllo (3.1% vs. 2.1%; p=0.004). Eventi emorragici gravi si sono verificati nel 2.7% dei pazienti con EPA e nel 2.1% dei controlli (p=0.06).

Il beneficio prognostico di EPA nei confronti degli eventi CV osservato nel *trial* REDUCE-IT deriverebbe da diversi meccanismi, che vanno oltre la semplice riduzione dei livelli di TG. La stimolazione della produzione di prostanoidi con attività anti-aggregante e vasodilatatoria, come la prostaciclina, agirebbe contro i fenomeni di trombosi e vasospasmo; la capacità dei PUFA n-3 di integrarsi nella membrana plasmatica e mitocondriale, determina una resistenza nei confronti dei

fenomeni di ossidazione; omega-3 e prostanoidi da essi derivati posseggono attività anti-infiammatoria, così come gli omega-3 possono fornire precursori di mediatori che combattono gli stati di infiammazione cronica.

**STRENGTH (2020).** Studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco<sup>(178)</sup>, che ha valutato gli effetti della CA di EPA e di DHA sugli eventi CV in pazienti in terapia con statine da almeno 4 settimane e con un elevato rischio CV, definito dalla presenza di:

- Malattia aterosclerotica a livello coronarico, carotideo, aortico o periferico (prevenzione secondaria);
- Diabete mellito tipo I o tipo II (età >40 anni per gli uomini e >50 anni per le donne) e almeno un fattore di rischio aggiuntivo: tabagismo, ipertensione arteriosa, PCR >2 mg/L o moderata albuminuria;
- Pazienti ad alto rischio (età >50 anni per gli uomini e >60 anni per le donne) con almeno un fattore di rischio, tra cui: familiarità per coronaropatia, tabagismo cronico, PCR >2 mg/L, alterata funzionalità renale o un calcium score coronarico >300 unità di Agatston (prevenzione primaria).

Sono stati arruolati 13.078 pazienti in 675 ospedali comunitari e universitari e in 22 stati in Nord America, Europa, Sud America, Asia, Australia, Nuova Zelanda e Sud Africa. Tutti i pazienti inclusi presentavano valori elevati di TG (tra 180 e 499 mg/dL) e bassi valori di HDL (<42 mg/dL negli uomini, <47 mg/dL nelle donne). Oltre il 50% era in prevenzione secondaria. I pazienti sono stati randomizzati a ricevere 4 g/die di CA di PUFA n-3 (n=6539) oppure placebo a base di olio di mais (n=6539), in associazione alla terapia medica usuale.

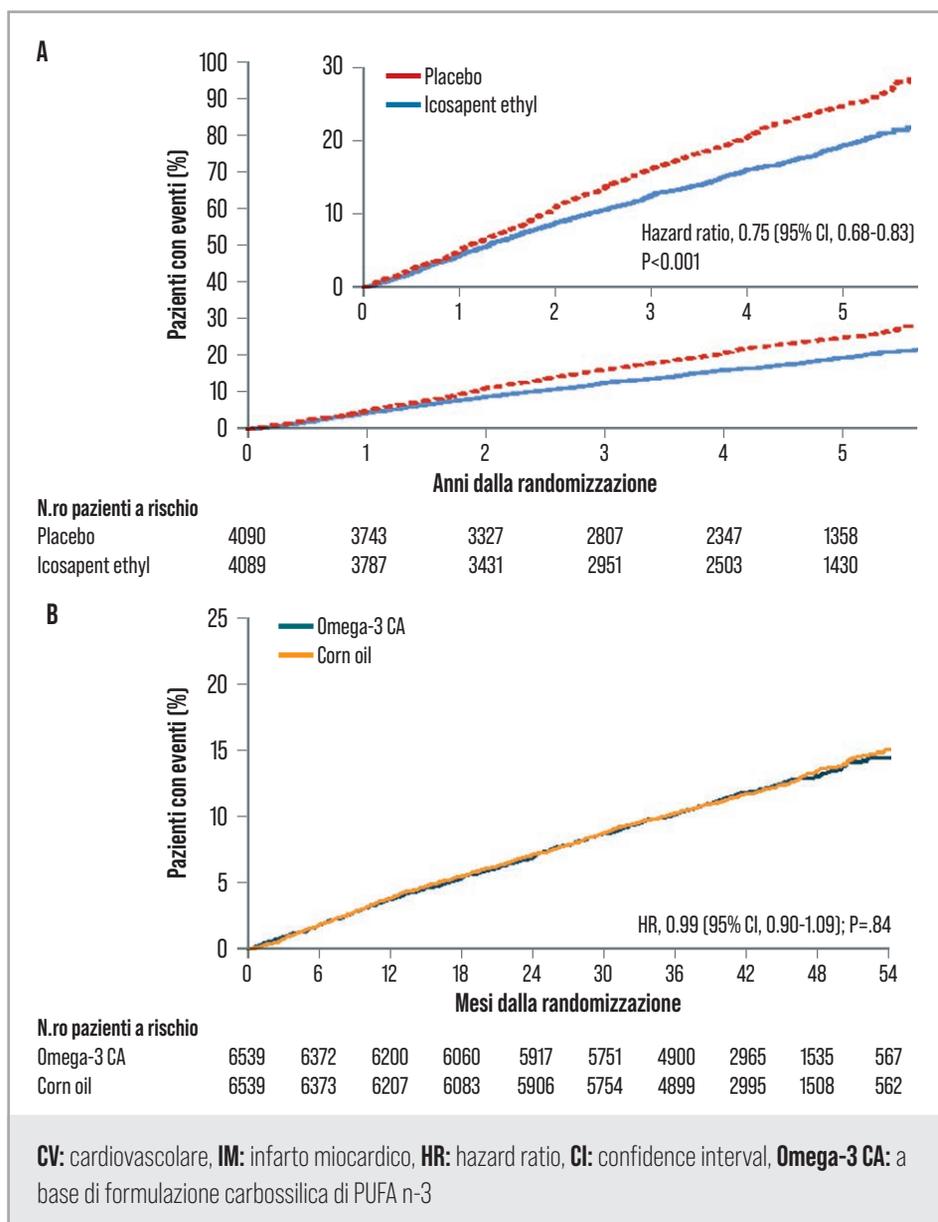
L'*endpoint* composito primario di efficacia era rappresentato da morte CV, IM non fatale, ictus non fatale, rivascolarizzazione coronarica e ospedalizzazione per angina instabile. Quando 1384 pazienti hanno sviluppato un evento dell'*endpoint* primario (rispetto ai 1600 previsti), il *trial* è stato interrotto precocemente sulla base di un'analisi parziale dei dati, da cui era emersa una bassa probabilità di beneficio clinico del CA di PUFA n-3 rispetto al placebo.

Rispetto ai 13.078 pazienti trattati (età media 62.5+9.0 anni; 35% donne; 70% con diabete; LDL mediano 75.0 mg/dL; livelli mediani di TG 240 mg/dL; livelli mediani di HDL 36 mg/dL e PCR mediano 2.1 mg/L), 12.633 (96.6%) avevano completato il *trial* con possibilità di valutazione dell'*endpoint* primario. Quest'ultimo si è verificato in 785 pazienti (12.0%) trattati con CA di PUFA n-3 rispetto a 795 (12.2%) trattati con olio di mais (HR 0.99, 95% CI 0.90-1.09; p=0.84) (Figura 6). È stato, inoltre, registrato un significativo aumento di eventi avversi gastrointestinali nel gruppo trattato con CA di PUFA n-3 (24.7% vs. 14.7%). I risultati di questo studio non supportano, quindi, l'utilizzo di formulazioni a base di PUFA n-3 per la riduzione degli eventi CV in pazienti ad alto rischio CV e in terapia con statine.

## Sul risultato conflittuale dei trials REDUCE-IT e STRENGTH

Diverse ipotesi sono state elaborate per interpretare le ragioni dei risultati contrastanti osservati nei trials REDUCE-IT e STRENGTH, due studi di elevata qualità e che hanno, entrambi, impiegato dosi piene di PUFA n-3.

Una possibile spiegazione teorizza che nello studio REDUCE-IT l'EPA non abbia ridotto il rischio di eventi CV, ma che il suo comparatore (olio minerale) lo abbia aumentato. Un incremento di LDL, ApoB e PCR associato con l'olio minerale sembra supportare questa interpretazione. Tuttavia, una revisione dell'FDA sui risultati del



**Figura 6.** Endpoint primario (morte CV, IM non fatale, ictus non fatale, rivascolarizzazione coronarica o ospedalizzazione per angina instabile) del trial REDUCE-IT (A) e del trial STRENGTH (B) (Modificata da ref #174 e #178)

REDUCE-IT ha concluso che tale ipotesi potrebbe spiegare solo in parte la differenza evidenziata tra EPA e olio minerale.

Una seconda considerazione riguarda l'utilizzo nello STRENGTH della formulazione di CA di PUFA n-3 composta sia da EPA che da DHA, a differenza degli studi condotti con EPA purificato. Tuttavia, sebbene i livelli di EPA nel plasma e nei globuli rossi fossero più alti nel REDUCE-IT rispetto allo STRENGTH, non è chiaro se queste differenze siano sufficienti a spiegare i risultati osservati. Tale dubbio è accentuato dal fatto che nello STRENGTH non si è verificata una riduzione significativa del rischio di eventi CV nei pazienti con livelli maggiori di EPA, rispetto a quelli con livelli minori. Inoltre, la riduzione dei TG dopo 12 mesi è stata del 18% in entrambi i *trial*, suggerendo un effetto simile delle formulazioni utilizzate.

Motivo di riflessione è anche il fatto che lo STRENGTH sia stato interrotto durante la prima fase della pandemia da COVID-19 e che le visite “*end-of-treatment*” siano state condotte tramite contatto telefonico, al fine di consentire di terminare il *trial* il più precocemente e ordinatamente possibile. Ciò può aver compromesso l'integrità dello studio stesso.

Per risolvere le discrepanze fra STRENGTH e REDUCE-IT, le agenzie del farmaco come l'FDA potrebbero autorizzare un trial clinico post-marketing di confronto fra alte dosi di EPA vs. olio di mais in pazienti a rischio di eventi CV.

## Real World Data

**TG-REAL (2020).** Recente e rilevante studio di coorte longitudinale, retrospettivo, che ha utilizzato 3 database amministrativi di 3 realtà sanitarie locali italiane<sup>(186)</sup> ed ha incluso in totale 158.042 individui con disponibilità di almeno un dosaggio dei TG sierici tra gennaio 2010 e dicembre 2015. I soggetti con valori normali di TG (<150 mg/dL; n=142.289) sono stati confrontati con pazienti con valori elevati (150-500 mg/dL; n=15.558) e con coloro con valori molto elevati (>500 mg/dL; n=195).

Gli *outcome* valutati sono stati gli eventi CV aterosclerotici e la mortalità per tutte le cause. In complesso, le incidenze di eventi CV e di mortalità per tutte le cause sono state del 7.2 e del 17.1 per 1000 individui-anno, rispettivamente. Dopo correzione multivariata per potenziali fattori confondenti, negli individui con valori elevati o molto elevati di TG si è evidenziato un significativo incremento del rischio di mortalità per tutte le cause (HR 1.49, 95% CI 1.36–1.63; p<0.001, e HR 3.08, 95% CI 1.46–6.50; p<0.01, rispettivamente), e dell'incidenza di eventi aterosclerotici (HR 1.61, 95% CI 1.43–1.82; p<0.001 e HR 2.30, 95% CI 1.02–5.18; p<0.05, rispettivamente).

Lo studio TG-REAL ha consentito di acquisire dati dalla pratica clinica reale, in una coorte ampia di pazienti con rischio CV basso-moderato, dimostrando come valori da moderati a gravemente elevati di TG si associno a un significativo incremento di malattia aterosclerotica e del rischio di morte per tutte le cause.

## Considerazioni finali sugli AG

Dopo i risultati del trial clinico REDUCE-IT, le principali agenzie del farmaco hanno dato la approvazione all'utilizzo dei PUFA n-3 nei pazienti ad elevato rischio CV, allo scopo di ridurre gli eventi su base aterosclerotica. Il confronto fra le indicazioni all'utilizzo dei PUFA n-3 nelle principali Linee Guida europee e statunitensi è rappresentato in Tabella 2.

Si è ora in attesa di un adeguamento delle raccomandazioni anche da parte delle società scientifiche italiane ed europee. Infatti nelle Linee Guida della *European Society of Cardiology* (ESC) del 2019<sup>(10)</sup> la raccomandazione all'utilizzo dei PUFA n-3 nei pazienti ad alto rischio con ipertrigliceridemia è ancora di classe IIa, nonostante i risultati positivi emersi recentemente dai trial clinici presenti in letteratura.

Ancora oggi, vi sono importanti *gaps* da colmare riguardo alla prescrivibilità e rimborsabilità dei PUFA n-3 in Italia. La nota AIFA 13, su cui si basano attualmente i criteri di rimborsabilità dei PUFA n-3 in Italia, prevede che essi vengano rimborsati dal SSN in tre soli casi:

- 1) Iperlipemia familiare combinata già in terapia con statine nel caso permangono elevati i livelli di TG
- 2) Forme familiari con TG molto elevati: iperchilomicronemie e gravi ipertrigliceridemie

**Tabella 4.** Linee guida europee e statunitensi nel periodo post REDUCE-IT

Società scientifica	Data	Linee guida / Standards / Statements
American Diabetes Association (ADA)	Marzo 2019	<p>“ADA’s Standards of Medical Care updates Section 10, Treatment of Other Lipoprotein Fractions or Targets”:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• In pazienti con patologia cardiovascolare aterosclerotica o altri fattori di rischio cardiaci in terapia con una statina, colesterolo LDL controllato e trigliceridi elevati, l'aggiunta di Icosapentaetile dovrebbe essere presa in considerazione per ridurre il rischio CV - Livello A</li> <li>• Si dovrebbe notare che i dati sono carenti con gli altri n-3 PUFA e i risultati del REDUCE-IT non dovrebbero essere estesi ad altri prodotti</li> <li>• La terapia di combinazione (Statine/Fibrati) non ha dimostrato di migliorare la cardiopatia aterosclerotica e non è, generalmente, raccomandata - Livello A</li> <li>• La terapia di combinazione (statina/Niacina) non ha dimostrato di fornire effetti benefici addizionali rispetto alla sola terapia statinica, può incrementare il rischio di stroke con ulteriori effetti collaterali ed è generalmente non raccomandata - Livello A</li> </ul>
American Heart Association AHA Science Advisory	Agosto 2019	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'uso di n-3 PUFA (4 g/die) per migliorare il rischio di malattia aterosclerotica in pazienti con ipertrigliceridemia è supportata da una riduzione del 25% dei MACE nel REDUCE-IT</li> <li>• La potenza, la qualità e l'efficacia dei supplementi dietetici non è stata sottoposta a revisione o approvata, ne è stata conseguentemente monitorata dall'FDA; pertanto, tali formulazioni non sono indicate come terapia</li> <li>• Nel trattamento di pazienti con livelli di trigliceridi molto alti con 4 g/die, EPA + DHA riducono i trigliceridi di circa il 30% con un contestuale aumento delle LDL, mentre il solo EPA non incrementerebbe le LDL in pazienti con livelli molto elevati di trigliceridi</li> </ul>
European Atherosclerosis Society/European Society of Cardiology (EAS/ESC)	Agosto 2019	<ul style="list-style-type: none"> <li>• In pazienti ad alto rischio con Trigliceridi tra 135 e 499 mg/di nonostante trattamento con statine, gli n-3 PUFA (icosapentaetile 2 x 2 g/die) dovrebbero essere presi in considerazione in combinazione con le statine - Classe IIa, Livello B</li> </ul>
National Lipid Association (NLA)	Settembre 2019	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Per pazienti di età <math>\geq 45</math> anni con malattia aterosclerotica clinica, o di età <math>\geq 50</math> anni con diabete mellito tipo 2 in terapia and <math>\geq 1</math> fattore di rischio addizionale, e trigliceridi a digiuno compresi tra 135 e 499 mg/di nonostante trattamento con statina alla massima dose tollerata, con o senza ezetimibe, il trattamento con icosapentaetile è raccomandato per la riduzione della malattia cardiovascolare aterosclerotica - Classe I, Livello B-R</li> </ul>
American Heart Association Scientific Statement	Aprile 2020	<p>L' AHA raccomanda di prendere in considerazione l'icosapentaetile in pazienti con diabete mellito tipo 2 per un'ulteriore riduzione del rischio cardiovascolare quando i livelli di trigliceridi rimangono elevati nonostante statina alla massima dose tollerata assunta per il controllo della cardiopatia ischemica</p>
Nuova indicazione approvata dell'FDA per la riduzione dei livelli di trigliceridi	Dicembre 2019	<p>L'icosapentaetile è indicato in aggiunta alla statina alla massima dose tollerata per ridurre il rischio di IMA, Stroke, rivascolarizzazione coronarica, e angina instabile con necessità di ospedalizzazione in pazienti adulti con livelli elevati di trigliceridi (<math>\geq 150</math> mg/di) e patologia cardiovascolare diagnosticata o diabete mellito and <math>\geq 2</math> fattori di rischio addizionali per patologia cardiovascolare</p>

### 3) Pazienti con insufficienza renale moderata e grave con TG >500 mg/dL

La nota 13, inoltre, non riporta esplicitamente i limiti di LDL e/o di TG che autorizzino la rimborsabilità di tali formulazioni. In altri stati europei, i risultati del *trial* clinico REDUCE-IT sono stati recepiti e sono stati inclusi nelle linee guida nazionali<sup>(10)</sup>.

Attualmente, la strategia per la gestione e la prevenzione delle patologie CV segue il cosiddetto schema “ABCDEF”. In tale strategia:

- A corrisponde alla valutazione del rischio CV (*Assessment of risk*), alla necessità di impostare una terapia antiaggregante (*Antiplatelet therapy*), e alla necessità di gestire la fibrillazione atriale (*Atrial fibrillation management*),
- B corrisponde alla gestione della pressione arteriosa (*Blood pressure management*)
- C corrisponde alla gestione del colesterolo (*Cholesterol management*) e alla cessazione del fumo di sigaretta,

- D corrisponde alla dieta e alle modifiche dello stile di vita, oltre alla gestione del diabete,
- E corrisponde all'esercizio fisico,
- F alla gestione dello scompenso cardiaco.

Sulla base delle attuali evidenze, si ritiene che alla lettera “E”, insieme all'esercizio fisico, andrebbero considerate come “*new entry*” anche l'assunzione di EPA ed IPE, anziché di integratori alimentari a base di olio di pesce.

È importante sottolineare, inoltre, che gli studi precedenti sui PUFA n-3 non hanno dato risultati concordanti relativamente alla riduzione degli eventi CV. Tali discrepanze sembrano attribuibili a vari fattori, fra cui l'utilizzo frequente di posologie inadeguate di farmaco, l'impiego di formulazioni differenti e/o una selezione non adeguata della popolazione *target*.

È tuttavia importante sottolineare che la terapia con IPE si è dimostrata altamente efficace nella riduzione di eventi CV maggiori e della mortalità CV in pazienti affetti da ASCVD o con diabete mellito di tipo II e altri fattori di rischio CV in prevenzione primaria, già in terapia con statina e con livelli di LDL ben controllati soprattutto in questo ultimo gruppo. Tali evidenze supportano un'indicazione preferenziale all'uso di IPE rispetto alle formulazioni attualmente in commercio.

## Fibrati

I fibrati sono antagonisti dei PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*), specialmente della sottoclasse alfa (PPAR- $\alpha$ ), che giocano un ruolo chiave nell'adipogenesi e nel metabolismo dei lipidi. In particolare, l'attivazione dei PPAR induce l'espressione di geni che intervengono nel metabolismo lipidico e i fibrati, attraverso PPAR, regolano la beta ossidazione dei lipidi. Di conseguenza, i fibrati hanno una buona efficacia nella riduzione dei valori di TG che può arrivare fino al 50%, così come dei TG post-prandiali e delle TRL. Riducono, inoltre, per una quota  $\leq 20\%$  il valore di LDL e determinano un aumento  $\leq 20\%$  dei livelli di HDL, dati molto dipendenti dai valori basali di lipidi plasmatici e meno evidenti in soggetti con valori molto elevati di TG.

## Effetti sulla mortalità e morbilità CV

Gli effetti clinici dei fibrati sono stati studiati in numerosi RCT che hanno, però, fornito risultati contrastanti in termini di outcome CV. Lo studio HHS (*Helsinki Heart Study*)<sup>(187)</sup> ha riportato una riduzione significativa di eventi coronarici con gemfibrozil in 4081 pazienti in prevenzione primaria, diversamente né il trial FIELD (*Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes*)<sup>(188)</sup> né l'ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*)<sup>(189)</sup>, entrambi con fenofibrato, hanno confermato tale dato, così come lo studio LEADER (*Lower Extremity Arterial Disease Event Reduction*)<sup>(190)</sup> non ha dimostrato un'efficacia del bezafibrato in pazienti con arteriopatia periferica sugli eventi CV. Per tali motivi, l'efficacia dei fibrati sugli eventi CV maggiori è ancora molto discussa e le evidenze sono molto meno robuste che per le statine. Il pemafibrato, un nuovo modulatore di PPAR- $\alpha$  con un miglior profilo rischio/beneficio rispetto agli altri fibrati, è in corso di studio nel trial PROMINENT (*Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides IN Patients With Diabetes*)<sup>(191)</sup> in soggetti dislipidemici con diabete di tipo 2.

In caso di dislipidemia mista, i fibrati (bezafibrato o fenofibrato) possono essere

considerati, con cautela, in associazione alle statine in pazienti in prevenzione primaria con buon controllo di LDL e valori di TG >200 mg/dL (Classe di Raccomandazione IIb)<sup>(10)</sup>.

## **Effetti avversi**

I fibrati sono generalmente ben tollerati con un'occorrenza di effetti collaterali gastro-intestinali <5% e di rash cutaneo di circa il 2%, possono determinare un aumento di creatinina plasmatica e sono associati ad un rischio lievemente aumentato di pancreatite. Gli effetti collaterali più temuti sono l'aumento di enzimi epatici e la miopatia, il cui rischio è superiore a quello del trattamento con statine di circa 5.5 volte (soprattutto con gemfibrozil) ed è amplificato da eventuale terapia di associazione.



# Il Ruolo dell'acido bempedoico, un inibitore dell'ATP citrato liasi, nella pratica clinica

Roberto Pedrinelli, Pasquale Perrone Filardi

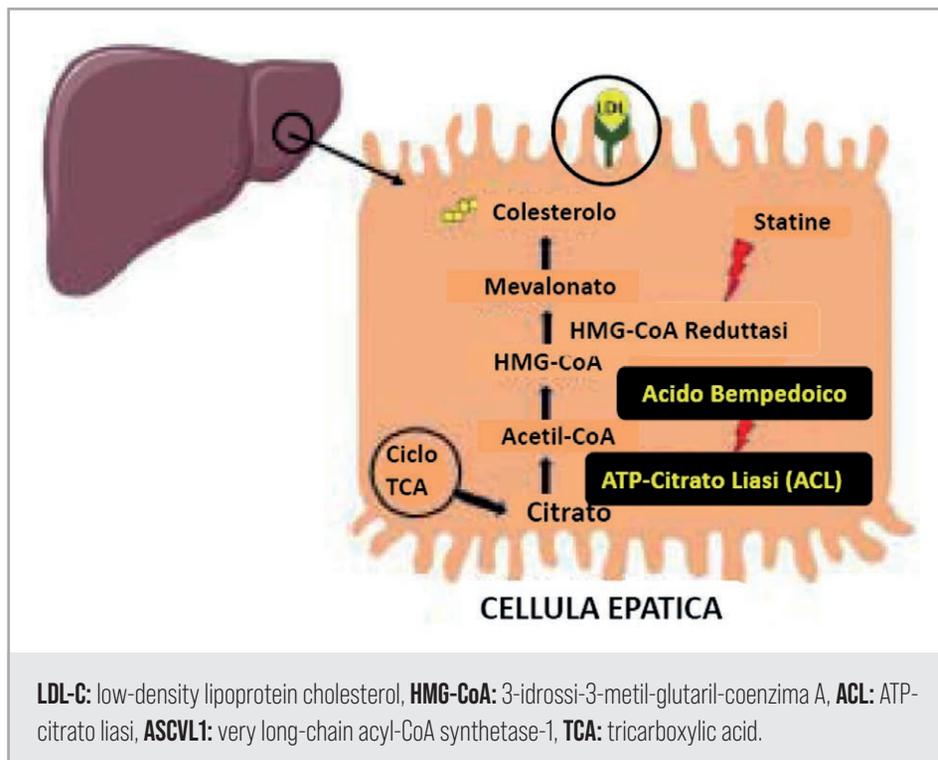
## Introduzione

Nonostante gli enormi benefici clinici ricavati dalla assunzione di statine, una grande percentuale della popolazione a rischio di eventi cardiovascolari (CV) non raggiunge i target terapeutici di LDL raccomandati dalle Linee Guida più recenti<sup>(10)</sup>. Sviate ragioni sono alla base di questo insuccesso terapeutico, fra cui livelli di lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins, LDL) superiori alla capacità delle statine di ridurli efficacemente<sup>(10)</sup> e/o la comparsa di mialgie ed altri disturbi muscolari che frequentemente obbligano all'interruzione della loro somministrazione o all'interruzione della titolazione<sup>(192)</sup>. La disponibilità dell'ezetimibe, un inibitore dell'assorbimento intestinale di colesterolo<sup>(193, 194)</sup> e, più recentemente, di farmaci ipocolesterolemizzanti con meccanismi d'azione diversi dalle statine<sup>(195)</sup> ha fornito alternative terapeutiche al loro uso. Esiste pertanto una relativamente ampia porzione di popolazione ipercolesterolemica e/o affetta da patologie CV su base aterosclerotica (*atherosclerotic cardiovascular disease*, ASCVD) in cui esiste un bisogno non soddisfatto di terapie innovative, ben tollerate ed efficaci nel ridurre gli eventi e le morti per ASCVD. L'acido bempedoico (acido ETC-1002 o 8-idrossi-2,2,14,14-tetrametilpentadecandioico), è un nuovo farmaco ipocolesterolemizzante che agisce attraverso meccanismi farmacologici diversi rispetto a quello di tutte le altre categorie di terapie ipolipidizzanti attualmente disponibili. Il farmaco è stato approvato negli Stati Uniti e nell'Unione Europea come terapia finalizzata a ridurre il colesterolo LDL nei pazienti con patologia CV aterosclerotica o ipercolesterolemia familiare eterozigote (*Heterozygous Familial Hypercholesterolemia*, HeFH) in cui la terapia con statine a dosi massimali non abbia raggiunto il target previsto dalle Linee Guida. Inoltre, l'acido bempedoico è approvato nell'Unione Europea per pazienti intolleranti alle statine o quelli nei quali la statina è controindicata.

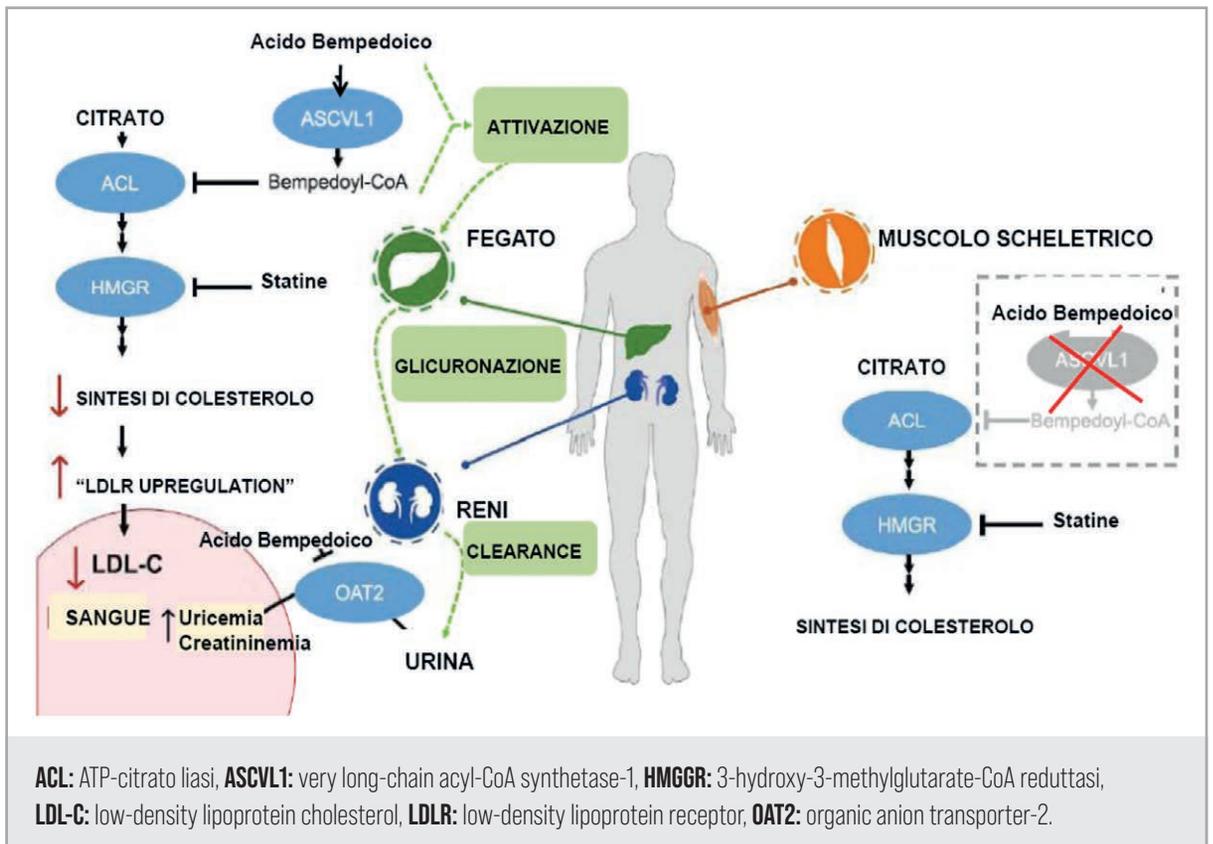
## Farmacologia dell'acido bempedoico

L'acido bempedoico è il prototipo di una nuova classe di farmaci ipolipidizzanti che inibiscono l'adenosina trifosfato-citrato liasi (ACL), un enzima chiave nella catena biosintetica del colesterolo. In quanto profarmaco, l'acido bempedoico richiede un preliminare processo di attivazione enzimatica che viene effettuato a livello epatico

tramite l'acil-CoA grasso sintasi 1 a lunga catena (*very long-chain acyl-CoA synthetase-1*, *ACVSL1*) che consente alla molecola di inibire l'ACL<sup>(196)</sup>, un enzima citosolico epatico che scinde il citrato mitocondriale in ossalacetato e acetil-CoA. La riduzione della sintesi di acetil-CoA, un substrato indispensabile per la biosintesi epatica di colesterolo ne riduce la sintesi epatica con conseguente aumento della trascrizione di recettori LDL epatici tramite i quali si riduce il livello di LDL circolanti, un meccanismo d'azione finale che non differisce in questo riguardo dalle statine (Figura 1)<sup>(197)</sup>. Tuttavia poiché l'inibizione dell'acido bempedoico si esercita su un enzima che agisce a monte dell'enzima 3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMGCoA) reductasi nella catena biosintetica del colesterolo epatico, la somministrazione combinata del farmaco determina un effetto ipocolesterolemizzante additivo (Figura 2). Da notare che il muscolo scheletrico non è in grado di attivare l'acido bempedoico a causa dell'assenza dell'ACVSL-1 che converte il profarmaco in composto attivo<sup>(196)</sup>, una peculiarità biologica che può contribuire a limitare lo sviluppo di mialgie che complicano frequentemente la terapia con statine<sup>(192)</sup>. Studi di randomizzazione mendeliana sull'associazione fra varianti genetiche che determinano diminuiti livelli di ACL e rischio di eventi CV, confermano il ruolo patogenetico dell'ACL nello sviluppo di malattia aterosclerotica<sup>(198)</sup> e supportano indirettamente la plausibilità biologica della sua inibizione tramite acido bempedoico. Negli stessi studi<sup>(198)</sup> è emerso che il profilo lipidemico associato ad ACL ha affinità con quello osservato per HMGCoA reductasi, il target delle statine, e quello della proteina Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), il bersaglio di ezetimibe<sup>(193)</sup>. Studi *in-vitro* e nell'animale da esperimento hanno inoltre dimostrato che l'acido bempedoico,



**Figura 1.** Sito e meccanismo d'azione dell'acido bempedoico. Dopo la sua assunzione per via orale, l'acido bempedoico è convertito a livello epatico da parte dell'ASCVL1 nel suo metabolita attivo bempedoyl-CoA. Il bempedoyl-CoA a sua volta inibisce l'ACL che converte il citrato in acetil-CoA determinando l'upregulation dei recettori epatici delle LDL.



**Figura 2.** Meccanismo ipocolesterolemizzante additivo di acido bempedoico e statine. Stante la sua posizione a monte dell'HMG-CoA reductasi (HMGCR in figura) nella via biosintetica del colesterolo, ciò consente di associare il farmaco alle statine e di ottenere un effetto ipocolesterolemizzante additivo. L'assenza di ASCVL1 nel muscolo impedisce la conversione del farmaco nel metabolita attivo a quel livello. La glicuronazione dell'acido bempedoico e del suo metabolita attivo ne consente l'eliminazione per via renale. L'acido bempedoico è anche un inibitore debole OAT2 che potrebbe causare incrementi di lieve entità della creatinina e dell'uricemia e lo sviluppo nelle persone predisposte ad attacchi gottosi

attivando la via metabolica della chinasi attivata dall'AMP (AMPK), riduce l'attività di enzimi chiave nella sintesi degli acidi grassi e dei carboidrati<sup>(199)</sup> ma al momento la rilevanza clinica di quest'effetto farmacologico non appare definita<sup>(200)</sup>.

## Studi Clinici di Fase 2

Successivamente all'identificazione del meccanismo d'azione farmacologico e della sua attività *in vitro* e nell'animale da esperimento ed alla dimostrazione dell'assenza di effetti avversi di rilievo dell'acido bempedoico dopo somministrazione unica giornaliera per os<sup>(200)</sup>, studi di Fase 2 pubblicati a partire dal 2013, condotti in pazienti ipercolesterolemici, hanno evidenziato la capacità del farmaco di ridurre i livelli di LDL ed altri parametri lipidici e confermarne la sicurezza sia in monoterapia che in associazione con altri farmaci ipocolesterolemizzanti.

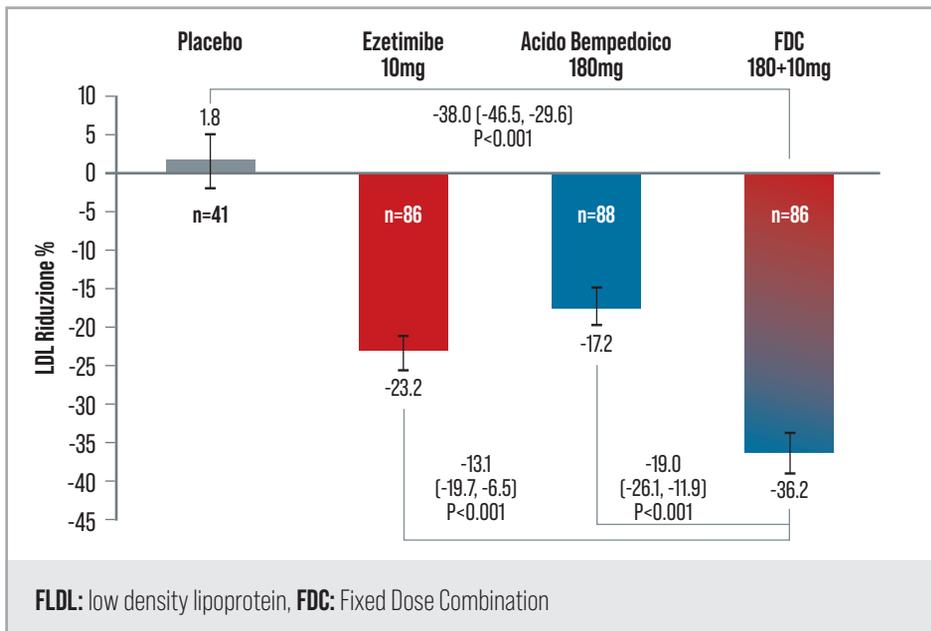
## Acido bempedoico in monoterapia

Ballantyne et al.<sup>(201)</sup> sono stati i primi a testare dosi incrementali di acido bempedoico per os (40, 80 o 120 mg qd vs. placebo x 12 settimane) in 177 pazienti ipercolesterolemici

(LDL 130-220 mg/dL) in prevenzione primaria, stratificati per livelli di trigliceridi (TG) circolanti <150 mg/dL o superiori a 150 mg/dL (fino a 400 mg/dL). Lo studio ha dimostrato l'efficacia del farmaco sui livelli circolanti di LDL già dopo 2 settimane di trattamento con il raggiungimento di un *plateau* fra 80 e 120 mg/die (-17.9%, -25.0% e -26.6% rispettivamente per le 3 dosi vs -2.1% nel placebo;  $p < 0.0001$ ). Colesterolo non-HDL, apolipoproteina B (ApoB) e numero di particelle LDL si modificavano consensualmente al valore di LDL, mentre proteina C-reattiva (PCR), TG, HDL e pressione arteriosa non si modificavano in modo statisticamente significativo. L'efficacia del farmaco era sovrapponibile in presenza di valori di TG normali o elevati. Sette pazienti in trattamento attivo hanno sviluppato mialgie<sup>(201)</sup>. Questi risultati sono stati poi confermati da Thompson et al.<sup>(202)</sup> in 56 pazienti ipercolesterolemici (LDL 100-220 mg/dL) con profilo di rischio variabile ed intolleranti alle statine in cui il farmaco a dosi incrementali di 60, 120, 180, 240 mg qd per 2 settimane ciascuna riduceva le LDL (-32% vs. -3.2% nel gruppo placebo;  $p < 0.0001$ ), gli altri parametri lipidici ad esso correlati (non-HDL, ApoB e colesterolo totale) e PCR senza eventi avversi che richiedessero la sospensione della terapia<sup>(202)</sup>. L'effetto della monoterapia con acido bempedoico è stato ulteriormente valutato da Gutierrez et al.<sup>(203)</sup> in 60 soggetti diabetici di tipo 2 nei quali il farmaco (80 mg qd per 2 settimane seguito da 120 mg qd per altre 2 settimane) riduceva LDL e PCR (-43% e -41% rispettivamente). La cefalea era l'effetto collaterale più frequente, ma mialgie e parametri di laboratorio non si modificavano ed il controllo glicemico dimostrava una tendenza alla riduzione, seppur non significativa; la pressione arteriosa non si modificava.

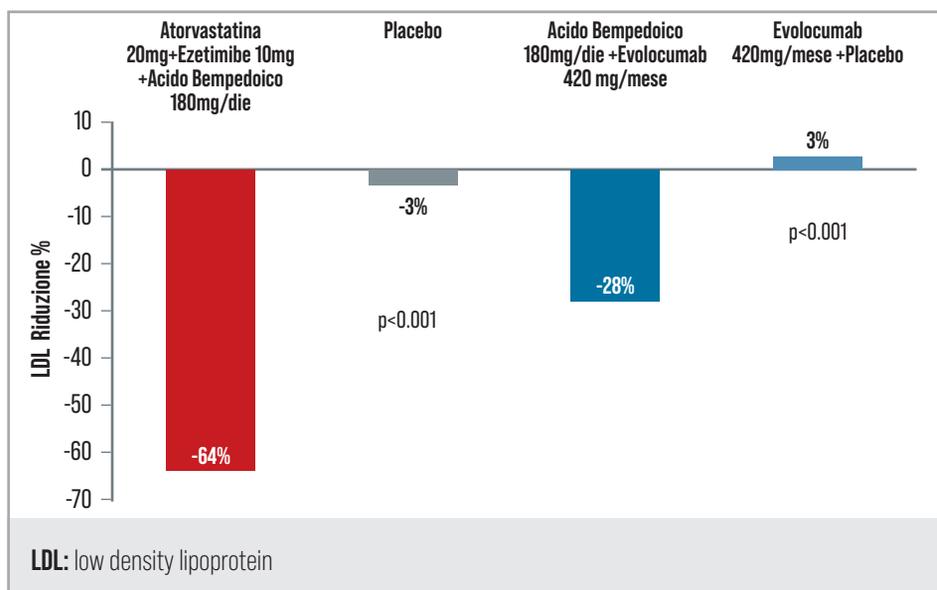
## Acido bempedoico in terapia di combinazione

L'associazione fra statine ed acido bempedoico 120 mg o 180 mg/die per 12 settimane è stata valutata da Ballantyne et al. in 134 pazienti in trattamento con statine a dosi basse-moderate (atorvastatina 10-20 mg, simvastatina 5-20 mg, rosuvastatina 5-10 mg, pravastatina 10-40 mg) per almeno 3 mesi prima dell'arruolamento nello studio e con colesterolo LDL persistentemente elevato (115-220 mg/dL)<sup>(204)</sup>. Alla fine del periodo di trattamento combinato, l'acido bempedoico ha dimostrato un'ulteriore riduzione del colesterolo LDL (120 mg -17.3%,  $p = 0.0055$ ; 180 mg -24.3%,  $p < 0.0001$ ; placebo -4.2%). In accordo con gli studi precedenti, ambedue le dosi di farmaco riducevano ApoB, non-HDL, colesterolo totale e PCR senza modificazioni significative dei TG. Gli eventi avversi muscolari erano meno frequenti con acido bempedoico rispetto al placebo e nessun paziente ha interrotto il trattamento per eventi avversi a carico del muscolo striato<sup>(204)</sup>. Thompson *et al.*<sup>(205)</sup> hanno, invece, valutato l'associazione di acido bempedoico (120 mg o 180 mg/die) ed ezetimibe (10 mg) in 348 pazienti ipercolesterolemici (LDL >130 mg/dL) con (n=177) o senza (n=171) intolleranza a varie statine, definita come incapacità di tollerare 2 o più statine per mialgia, debolezza muscolare, crampi risoltisi dopo interruzione del trattamento. Lo studio ha dimostrato l'effetto additivo dello schema terapeutico combinato rispetto al solo ezetimibe (-43% e -48%, rispettivamente ai due dosaggi, vs. -21% in ezetimibe;  $p < 0.0001$ ). Gli eventi avversi muscolari sono stati numericamente inferiori nel gruppo in monoterapia con acido bempedoico (120 mg n=3 e 180 mg n=1) rispetto al gruppo ezetimibe (10 mg, n=6)<sup>(205)</sup>. Tali dati sono stati confermati da un secondo studio con acido bempedoico 180 mg in combinazione ad ezetimibe 10 mg tramite l'uso dei due farmaci in combinazione a dose fissa (*fixed dose combination*, FDC) in 301 pazienti ad alto rischio CV con ipercolesterolemia (LDL >100 mg/dL in presenza di nota malattia



**Figura 3.** Riduzione percentuale di LDL con ezetimibe, acido bempedoico o combinazione ezetimibe/acido bempedoico dopo 12 settimane di trattamento rispetto ai valori basali. Le differenze fra gruppi rappresentano medie e limiti di confidenza al 95%. [Modificata da ref #206]

aterosclerotica e/o HeFH o >130 mg/dL in presenza di più fattori di rischio CV)<sup>(206)</sup>. Il disegno sperimentale prevedeva la comparazione della FDC con acido bempedoico da solo, ezetimibe da solo o placebo per 12 settimane. Come mostrato in Figura 3, la FDC riduceva il livello di LDL più dei due farmaci da soli con LDL <100 mg/dL e 70 mg/dL nel 67.5% e 31.3% dei pazienti rispetto ai pazienti in monoterapia (ezetimibe nel 42.5% e 10%, rispettivamente; acido bempedoico nel 43.9% e 6.1%, rispettivamente). Inoltre, i livelli di LDL circolanti si dimezzavano nel 34% dei pazienti nel gruppo FDC rispetto al 5% ed il 3.7% di quelli in monoterapia. Solo l'acido bempedoico riduceva in modo sostanziale la PCR (FDC -35.1%, acido bempedoico -31.9%, ezetimibe -8.2%, placebo +21.6%), a suggerire uno specifico effetto antiinfiammatorio del farmaco. Mialgie di severa entità si sono manifestate in 3 pazienti in monoterapia con acido bempedoico, in 1 con ezetimibe e in nessuno nel gruppo in FDC. Complessivamente, il 2.4% dei pazienti ha manifestato aumento dell'uricemia, costipazione, affaticamento e spasmi<sup>(206)</sup>. L'effetto ipolipidemizzante dell'acido bempedoico, in associazione ad altre terapie ipolipidemizzanti, è stato ulteriormente valutato comparando la sua associazione con atorvastina ed ezetimibe (180+20+10mg/die, n=43) rispetto al solo placebo (n=20) in pazienti ipercolesterolemici (LDL 130-189 mg/dL) in prevenzione primaria<sup>(207)</sup>. Alla fine delle 6 settimane di trattamento previste dal disegno sperimentale, la tripla terapia ha ridotto il livello di LDL del 64% rispetto al placebo (p<0.001) (Figura 4, sinistra); LDL <70 mg/dL nel 90% dei casi e <55mg/dL nel 59% dei pazienti trattati, con livelli circolanti dimezzati nel 95% dei casi. In accordo con i risultati degli studi precedenti, colesterolo non-HDL, apoB, colesterolo totale e PCR si riducevano significativamente. Meno attesa è stata la riduzione dei TG circolanti (-36.3%, p<0.001), mai evidenziata negli studi precedenti. Gli effetti avversi non differivano fra i due gruppi di trattamento<sup>(207)</sup>. Recente è anche la dimostrazione dell'effetto additivo dell'acido bempedoico associato ad evolocumab, un inibitore di PCSK9<sup>(208)</sup>, in 57 pazienti con LDL >100 mg/dL dopo 3 mesi di trattamento con evolocumab 420 mg/mese (n=28) rispetto al gruppo di pazienti



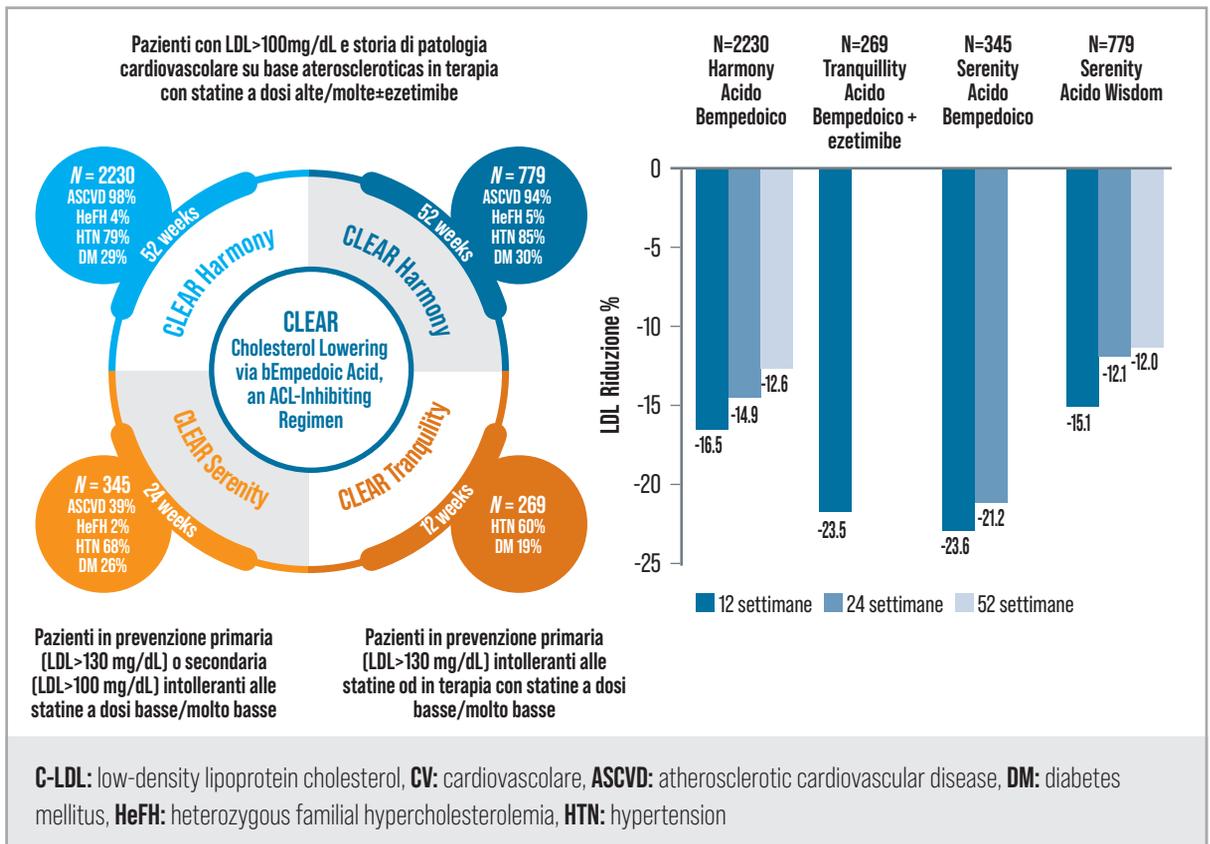
**Figura 4.** Riduzione percentuale delle LDL in pazienti trattati con la tripla associazione [acido bempedoico, atorvastatina ed ezetimibe] post-6 settimane di trattamento o evolocumab, un inibitore di PCSK9. (Modificata da ref #207 e #208)

trattati con il solo inibitore del PCSK9 (n=31) (Figura 4, destra). Il calo delle LDL del 31% era accompagnato da attesa riduzione di ApoB, colesterolo non-HDL, colesterolo totale e PCR. Gli effetti collaterali erano sovrapponibili a quelli del gruppo placebo. Gli studi clinici di Fase 2 hanno, quindi, dimostrato una significativa efficacia dell'acido bempedoico nella riduzione dei livelli di LDL e di parametri correlati, in monoterapia ed in terapia di combinazione, in pazienti in varie classi di rischio CV. Tali risultati hanno dato il via ad un fitto programma di studi di Fase 3 che ne ha confermato i benefici in differenti *setting*, come di seguito descritto.

## Studi Clinici di Fase 3: il programma CLEAR

Quattro studi clinici di Fase 3 multicentrici, randomizzati e controllati del programma registrativo CLEAR (*Cholesterol Lowering via bEmpedoic Acid, an ACL-Inhibiting Regimen*) hanno valutato l'effetto dell'acido bempedoico. Gli studi hanno coinvolto complessivamente 3623 pazienti con vari profili di rischio, i cui criteri di inclusione nelle varie fasi del programma sono riassunti nella Figura 5. Due degli studi (*CLEAR Harmony* e *CLEAR Wisdom*, n=3009) sono stati condotti in pazienti ad alto rischio CV trattati con statine a dosi massimali e due (*CLEAR Serenity* and *CLEAR Tranquillity*, n=614) in pazienti non trattati con statine per intolleranza o tolleranti solo a dosi basse/molto basse<sup>(209-212)</sup>.

Lo studio CLEAR Harmony ha studiato primariamente la sicurezza a lungo termine dell'acido bempedoico rispetto al placebo in pazienti con storia di patologia vascolare aterosclerotica o HeFH o entrambi con LDL  $\geq 70$  mg/dL, in trattamento con statine a dosaggi massimamente tollerati, in combinazione o meno con altre terapie ipocolesterolemizzanti<sup>(209)</sup>. Lo studio, che ha arruolato 2230 pazienti randomizzati (rapporto 2:1) a ricevere acido bempedoico 180 mg o placebo per 52 settimane, ha dimostrato un'incidenza di eventi avversi analoga tra i gruppi. In particolare, la percentuale di mialgie (6.0% vs. 6.1%) e spasmi muscolari è stata bassa in termini assoluti



**Figura 5.** Sinossi del programma CLEAR. La dizione “dosi basse di statina” si riferisce a rosuvastatina 5 mg, atorvastatina 10 mg, simvastatina 10 mg, lovastatina 20 mg, pravastatina 40 mg, fluvastatina 40 mg, o pitavastatina 2 mg e la dizione “dosi molto basse” si riferisce a dosi giornaliere inferiori a quelle sopra citate

senza differenze tra i due gruppi. Il gruppo trattato ha mostrato aumenti statisticamente significativi, ma di lieve entità dell'uricemia (0,7 mg/dL) associati ad attacchi gottosi (1.2% vs. 0.3%) e della creatinemia (0,02 mg/dL). La riduzione percentuale delle LDL rispetto ai valori basali, che rappresentava un endpoint secondario dello studio, era del 16.5% alla 12ma settimana (differenza vs. placebo in variazione rispetto al basale -18.1%; 95% CI -20.0 -16.1;  $p < 0.001$ ) senza modificazioni significative alla 24ma e 52ma settimana di trattamento (Figura 5, riquadro destro). In accordo con studi precedenti, la riduzione del colesterolo LDL plasmatico si accompagnava ad una parallela diminuzione di colesterolo non-HDL, colesterolo totale, ApoB e PCR (-13.3%, -11.1%, -11.9% e -21.5%, rispettivamente;  $p < 0.001$  per tutti).

Lo studio CLEAR Wisdom ha valutato l'efficacia dell'effetto ipocolesteromizzante dell'acido bempedoico a 12 settimane, oltre che la sua efficacia e sicurezza a lungo termine, in 799 pazienti con storia di patologia vascolare aterosclerotica, HeFH o entrambi che ricevevano statine alla massima dose tollerata con o senza altri trattamenti ipocolesterolemizzanti e LDL  $\geq 100$  mg/dL. Il disegno dello studio prevedeva la randomizzazione dei pazienti in proporzione 2:1 ad acido bempedoico 180 mg o placebo per 52 settimane<sup>(210)</sup>. Dopo 12 settimane di trattamento l'acido bempedoico riduceva il livello di LDL del 15.1% rispetto al placebo (98 vs. 123mg/dL in valore assoluto,  $p < 0.001$ ), endpoint primario dello studio. Alla settimana 24 la riduzione percentuale rispetto ai valori basali era del 12.1% e si manteneva alla 52esima (Figura 5, riquadro destro) con un comportamento analogo del colesterolo non-HDL e totale,

ApoB e PCR. La comparsa di mialgie (2.9% vs. 3.1%) e debolezza muscolare (0.4% per entrambi i gruppi) era sovrapponibile nei due gruppi così come il diabete incidente o il suo peggioramento (circa il 7% in entrambi i gruppi) e gli eventi cardiaci avversi maggiori (6.1% nel gruppo acido bempedoico vs. 8.2% nel gruppo placebo). Gotta ed iperuricemia sono stati riscontrati nel 2.1% e nel 2.7% dei soggetti in trattamento con acido bempedoico vs. 0.8% e 0.4% del gruppo placebo.

L'efficacia e sicurezza di acido bempedoico in associazione ad ezetimibe è stata valutata nello studio CLEAR Tranquility in 269 pazienti con LDL >100 mg/dL e storia di intolleranza alle statine<sup>(211)</sup>. Il disegno dello studio prevedeva la randomizzazione in rapporto 2:1 ad acido bempedoico 180 mg+ezetimibe 10 mg o placebo+ezetimibe 10 mg per un periodo di 12 settimane. Terapie ipocolesterolemizzanti aggiuntive venivano assunte dal 47.5% dei soggetti nel gruppo acido bempedoico e dal 39.1% dei soggetti nel gruppo placebo (di cui il 32.6% ed il 27.6%, rispettivamente, in trattamento con statine). I risultati dello studio hanno dimostrato una maggiore riduzione delle LDL del 28.5% vs. placebo (96,2 vs. 128,8 mg/dL,  $p<0.001$ ) oltre che del colesterolo non HDL (-18.4% vs. 5.2%), totale (-15.1% vs. 2.9%), ApoB (-14.6% vs. 4.7%) e PCR (32.5% vs. 2.1%). La riduzione del valore di LDL in risposta all'acido bempedoico è stata maggiore nei soggetti non trattati con statine o senza terapia di base rispetto a quelli che assumevano statine (-34.7% vs. -20.5%, rispettivamente). Eventi avversi muscolari si sono verificati con simile frequenza nei due gruppi di trattamento (3.3% e 3.4% in acido bempedoico/ezetimibe e placebo/ezetimibe, rispettivamente) così come i tassi d'interruzione del trattamento per eventi avversi (6.1% vs. 5.7%, rispettivamente), dei quali solo una netta minoranza per eventi avversi muscolari (n=2 nel gruppo acido bempedoico in terapia concomitante con statine e n=1 nel gruppo placebo). Un aumento dell'uricemia è stato osservato nel 7.7% di pazienti randomizzati ad acido bempedoico e 2.3% nel gruppo placebo.

Lo studio CLEAR Serenity ha, infine, valutato l'efficacia e la sicurezza dell'acido bempedoico in pazienti intolleranti alle statine, con LDL  $\geq 130$  mg/dL se in prevenzione primaria e LDL  $\geq 100$  mg/dL se soggetti con HeFH o patologie vascolari pregresse. Un totale di 354 soggetti sono stati randomizzati 2:1 a ricevere acido bempedoico 180 mg o placebo una volta al giorno per 24 settimane<sup>(212)</sup>. Al termine delle prime 12 settimane di trattamento, la riduzione percentuale dei livelli di LDL rispetto al basale era di -23.6% con analoghi comportamenti di non HDL (-19%), colesterolo totale (-16.1%), ApoB (-15.0%), PCR (-25.4%) senza modifiche significative di TG e HDL. La riduzione delle LDL indotta dall'acido bempedoico è stata maggiore nei soggetti che non ricevevano altre terapie ipocolesterolemizzanti. Eventi avversi di natura muscolare si sono verificati con eguale frequenza nei due gruppi (22.2% e 25.2% acido bempedoico e placebo, rispettivamente) con comparsa di mialgia nel 4.7% nel gruppo acido bempedoico e 7.2% nel placebo. Iperglicemia di nuova insorgenza o peggioramento di diabete preesistente si sono verificati meno frequentemente nel gruppo acido bempedoico rispetto al placebo (2.1 vs. 4.5%), mentre livelli di uricemia >7 mg/dL sono stati riscontrati più frequentemente in acido bempedoico con comparsa di sintomi gottosi comunque bassa (1.7%).

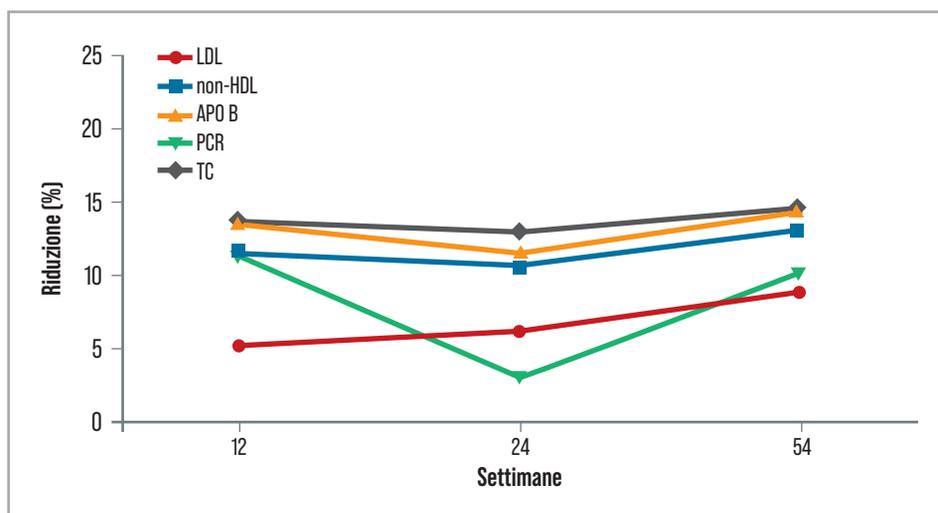
Complessivamente, iperuricemia, gotta, aumento delle transaminasi epatiche, riduzione del filtrato glomerulare, sono stati gli eventi avversi, seppure scarsamente rilevanti dal punto di vista clinico, più frequentemente associati all'uso di acido bempedoico nei 4 studi del programma CLEAR, riportati analiticamente in Tabella 1<sup>(213)</sup>. In particolare, l'aumento dell'uricemia è stato attribuito all'inibizione da parte del farmaco di OATP2

**Tabella 1.** Eventi avversi di acido bempedoico vs. placebo riscontrati nel programma CLEAR. (Modificata da ref #204)

EFFETTI AVVERSI	ACIDO BEMPEDOICO	CONTROLLI
Mialgia	118 (4.9%)	63 (5.3%)
Dolori acrali	89 (3.7%)	31 (2.6%)
Debolezza muscolare	13 (0.5%)	7 (0.6%)
Nuovo diabete o suo peggioramento	96 (4%), p=0.03	67 (5.6%)
Aumento dell'uricemia	51 (2.1%), p<0.001	6 (0.5%)
Iperuricemia	40 (1.7%), p=0.007	7 (0.6%)
Gotta	33 (1.4%), p=0.008	5 (0.4%)
Aumento della creatinemia	19 (0.8%)	4 (0.3%)
Riduzione del filtrato glomerulare	16 (0.7%), p=0.02	1 (<0.1%)
Aumento di AST o ALT	67 (2.8%), p=0.004	15 (1.3%)
≥3 volte	18 (0.7%)	3 (0.3%)
≥5 volte	6 (0.2%)	2 (0.2%)
Disordini neuro cognitivi	16 (0.7%)	9 (0.8%)
Riduzione di emoglobina	69 (2.8%)	22 (1.8%)
Anemia	60 (2.5%)	19 (1.6%)
Riduzione di emoglobina	9 (0.4%)	3 (0.3%)
Riduzione di ematocrito	2 (<0.1%)	3 (0.3%)
Rottura tendinea	6 (0.2%)	0
AVVENTI AVVERSI CON INTERRUZIONE DELLO STUDIO		
Mialgia	31 (1.3%)	21 (1.8%)
Contratture muscolari	18 (0.7%)	3 (0.3%)
Cefalea	11 (0.5%)	3 (0.3%)
Diarrea	11 (0.5%)	1 (<0.1%)

(*organic anion transporter-2*)<sup>(214)</sup> senza escludere altri meccanismi che richiedono valutazioni più precise<sup>(215)</sup>. Questi effetti avversi sono controbilanciati dall'assenza di mialgie ed altri sintomi muscolari che talora complicano il trattamento con statine e ne causano la sospensione<sup>(192)</sup>, cui potrebbe contribuire l'incapacità del muscolo striato di attivare l'acido bempedoico per l'assenza di ASCVL1. Di interesse è anche il favorevole profilo metabolico dell'acido bempedoico che si associa a meno frequente comparsa di diabete e tassi meno elevati di peggioramento del controllo metabolico in soggetti già diabetici<sup>(213,216)</sup>. Questo profilo farmacodinamico si differenzia dall'effetto pro-diabetogeno delle statine, peraltro quantitativamente non elevato<sup>(217)</sup> e comunque largamente sopravanzato dai loro effetti benefici<sup>(218)</sup>. Inoltre, a differenza degli inibitori del PCSK9<sup>(219)</sup> e simile in questo alle statine<sup>(220)</sup>, l'acido bempedoico riduce la PCR (Figura 6), un effetto antinfiammatorio che potrebbe avere importanti conseguenze cliniche in termini di prevenzione degli eventi CV su base aterosclerotica<sup>(220)</sup>.

In conclusione, i risultati degli studi di Fase 2 e di Fase 3 attualmente disponibili hanno dimostrato la sicurezza dell'acido bempedoico alla dose di 180 mg/die e la sua efficacia nel ridurre i livelli circolanti di LDL ed i parametri lipidici ad esse correlati (Figura 6). Lo studio CLEAR Outcome, attualmente in corso, sta valutando l'efficacia di acido



**Figura 6.** Riduzione percentuale della proteina C reattiva (PCR) ad alta sensibilità durante il trattamento con acido bempedoico in studi di Fase 2 e 3. La figura mostra anche il comportamento del colesterolo totale (TC), lipoproteine a bassa densità (LDL), colesterolo non ad alta densità (non-HDL) e apolipoproteina B (ApoB). (Modificata da ref #220)

bempedoico in pazienti ad alto rischio CV intolleranti alle statine, rappresentando il primo studio di outcome clinico CV dedicato a questo importante gruppo di pazienti<sup>(221)</sup>.

In conclusione, l'uso dell'acido bempedoico e della associazione bempedoico/ezetimibe può essere considerato in pazienti con differenti profili di rischio CV e/o HeFH in trattamento con statine o ad esse intolleranti i cui livelli di LDL rimangono sopra quelli suggeriti dalle Linee Guida più recenti<sup>(10)</sup>.



# Opzioni terapeutiche nell'ipercolesterolemia familiare omozigote: il ruolo di lomitapide

Maurizio Averna, Alberico L. Catapano

## Introduzione

L'ipercolesterolemia autosomica dominante (*autosomal dominant hypercholesterolemia*, ADH), riferita più generalmente come ipercolesterolemia familiare (*familial hypercholesterolemia*, FH), è un raro disordine del metabolismo lipoproteico caratterizzato da livelli molto elevati di lipoproteine a bassa densità (*low density lipoprotein*, LDL) che se non trattati sono responsabili di manifestazioni precoci di malattie cardiovascolari (CV) su base aterosclerotica. Difetti genetici nei geni coinvolti nel metabolismo intracellulare del colesterolo sono responsabili di questo disordine (Figura 1). Mutazioni con perdita di funzione nel gene codificante per il recettore delle LDL (*LDL receptor*, LDLR) ne rappresentano la causa principale (ADH-1). Come risultato di diversi tipi di mutazioni, l'attività di LDLR può variare, caratterizzando così sia mutazioni recettore-negative che mutazioni recettore-difettive sulla base dell'attività recettoriale residua (<2% o >2% della funzione fisiologica, rispettivamente). Più raramente ADH è causata da mutazioni a carico del gene APOB (ADH-2, o apolipoproteina B familiare difettiva – *familial defective apolipoprotein B*, FDB) o mutazioni con guadagno di funzione della proteina convertasi subtilisina-kexina tipo 9 (PCSK9) (ADH-3)<sup>(222)</sup>.

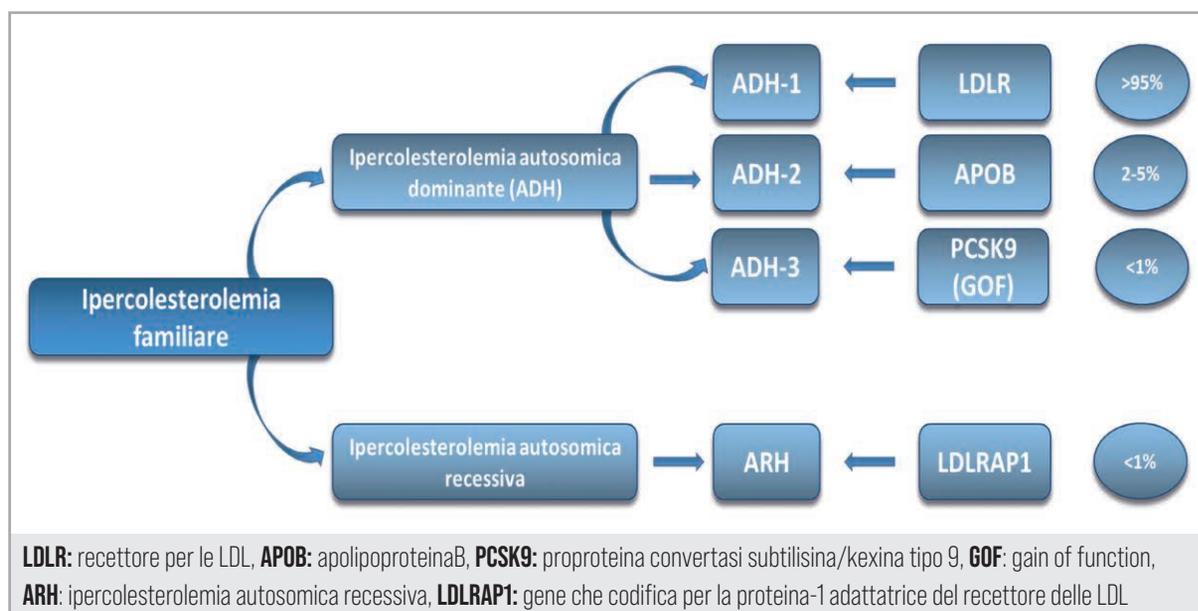
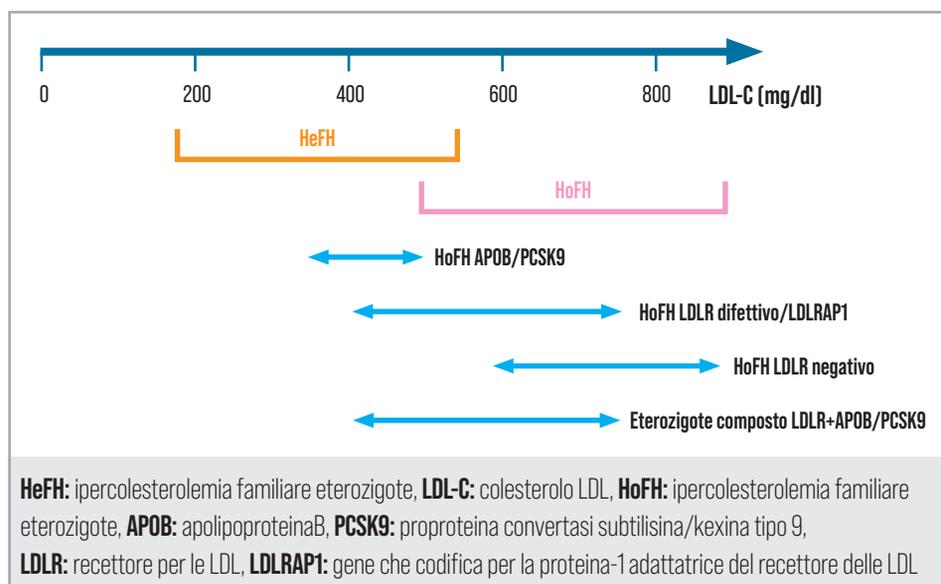


Figura 1. Cause genetiche dell'ipercolesterolemia familiare

I pazienti portatori della stessa mutazione su due alleli dello stesso gene sono omozigoti veri (*Homozygous FH*, HoFH) e si distinguono dai portatori di due diverse mutazioni nello stesso gene (eterozigote composto) e soggetti portatori di due diverse mutazioni in due geni candidati (doppio eterozigote). Un'altra rara forma di FH è quella recessiva, causata da mutazioni nel gene *LDLRAP1* che codifica per la proteina-1 adattatrice del recettore delle LDL (autosomal recessive hypercholesterolemia, ARH), coinvolta nel meccanismo di endocitosi di LDLR<sup>(223)</sup>. La prevalenza di HoFH è di 1:160.000-300.000. Le manifestazioni cliniche della HoFH sono eterogenee e dipendono dall'attività residua di LDLR. I soggetti affetti solitamente hanno livelli plasmatici molto elevati di LDL (500-1000 mg/dL) (Figura 2), xantomi tendinei, xantomi cutanei e malattia CV su base aterosclerotica ad esordio precoce (prima-seconda decade di vita) che coinvolge principalmente le arterie coronarie e la valvola aortica<sup>(224)</sup>. I pazienti HoFH con attività recettoriale di LDLR residua variabile mostrano una ampia variabilità di livelli plasmatici di LDL (Figura 2) e di manifestazioni cliniche CV<sup>(225)</sup>.

Sebbene la terapia ipolipemizzante convenzionale, inclusa la LDL-afesi, abbia notevolmente migliorato la gestione terapeutica dei pazienti HoFH, il controllo a lungo termine degli eventi CV rappresenta ancora una sfida aperta e pertanto sono necessari ulteriori approcci terapeutici.

L'avanzamento delle conoscenze sui meccanismi di regolazione dei livelli di LDL ha aperto nuovi scenari per la gestione della HoFH. La proteina di trasferimento microsomiale dei trigliceridi (*microsomal triglyceride transfer protein*, MTP) svolge un ruolo centrale nell'assemblaggio e nella secrezione delle lipoproteine a densità molto bassa (*very low density lipoprotein*, VLDL) nel fegato e dei chilomicroni nell'intestino e la sua inibizione è quindi un target farmacologico. Lomitapide è un inibitore selettivo di MTP approvato dalle autorità regolatorie del farmaco in 35 Paesi per il trattamento dell'HoFH. L'efficacia e la sicurezza di lomitapide sono state valutate e confermate in studi clinici di Fase 2 e 3 ed il suo uso nella pratica clinica ha mostrato una riduzione dei livelli plasmatici di LDL superiore al 50%. Obiettivo di questo capitolo è discutere brevemente le terapie disponibili o in corso di valutazione per il trattamento della HoFH, focalizzando l'attenzione su lomitapide.



**Figura 2.** Variabilità dei livelli plasmatici di LDL nei pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare

## Trattamento dei pazienti HoFH

I pazienti HoFH necessitano di una terapia ipolipemizzante intensiva, basata sul trattamento farmacologico convenzionale associato a LDL-afèresi<sup>(226)</sup>. Il trattamento intensivo con statine ad alta efficacia (rosuvastatina o atorvastatina) in associazione ad ezetimibe non consente tuttavia di raggiungere i *target* di LDL raccomandati dalle Linee Guida in base alla categoria di rischio CV<sup>(10)</sup> e la maggior parte dei pazienti HoFH ha la necessità di sottoporsi a procedure di LDL-afèresi a cadenza settimanale o bisettimanale, che però non è disponibile in tutti i Paesi e diversi fattori possono ostacolarne l'uso (ad esempio i costi, la presenza di personale sanitario qualificato per eseguire la procedura, la necessità di mantenere un accesso vascolare adeguato). Inoltre, circa il 50% dei pazienti mostra comunque progressione dell'aterosclerosi ed eventi CV maggiori. Sono quindi necessari ulteriori approcci per la gestione a lungo termine dei pazienti HoFH; recentemente sono state sviluppate nuove terapie per il trattamento dell'ipercolesterolemia che possono essere applicate anche a pazienti con HoFH e che si basano sull'inibizione di PCSK9 mediante anticorpi monoclonali (alirocumab ed evolocumab) o un oligonucleotide antisense (inclisiran), inibizione di apolipoproteina B (ApoB) con un oligonucleotide antisense (mipomersen), inibizione di *angiopoietin-like protein 3* (ANGPTL3) mediante un anticorpo monoclonale (evinacumab) e inibizione di MTP (lomitapide), che rappresenta il fulcro principale di questo capitolo (Tabella 1).

**Tabella 1.** Farmaci per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare omozigote

Farmaco	Meccanismo d'azione	Riduzione % LDL	Eventi avversi
Lomitapide	Inibizione di MTP con conseguente ridotta secrezione di lipoproteine contenenti ApoB	50%	<ul style="list-style-type: none"><li>· Steatosi epatica</li><li>· Disturbi gastrointestinali</li><li>· Incremento degli indici di funzionalità epatica</li></ul>
Evolocumab-Alirocumab	Inibizione di PCSK9 mediante MAb	20%-30%	<ul style="list-style-type: none"><li>· Reazioni nel sito di iniezione</li><li>· Sintomi simil-influenzali</li></ul>
Mipomersen	Inibizione della sintesi di ApoB	20%-50%	<ul style="list-style-type: none"><li>· Reazioni nel sito di iniezione</li><li>· Sintomi simil-influenzali</li><li>· Incremento degli indici di funzionalità epatica</li><li>· Steatosi epatica</li></ul>
Inclisiran	Inibizione di PCSK9 mediante siRNA	12%-37%	<ul style="list-style-type: none"><li>· Reazioni nel sito di iniezione</li></ul>
Evinacumab	Inibizione di ANGPTL3	~47%	<ul style="list-style-type: none"><li>· Sintomi simil-influenzali</li></ul>

**ApoB:** apolipoproteina B; **MTP:** proteina di trasferimento microsomiale di trigliceridi; **Mab:** anticorpi monoclonali;

**ANGPTL3:** angiopoietin-like protein; **siRNA:** small interfering RNA

## Inibitori di PCSK9

PCSK9 è una serino-proteasi espressa negli epatociti, nelle cellule mesenchimali renali, nell'intestino e nei neuroni telencefalici embrionali<sup>(227)</sup>. PCSK9 gioca un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo inducendo la degradazione di LDLR. Mutazioni con guadagno di funzione nel gene PCSK9 sono causa di FH, determinano elevate concentrazioni plasmatiche di LDL fin dalla nascita e aumentato rischio CV, mentre varianti con perdita di funzione sono associate ad ipocolesterolemia e riduzione del rischio CV. Il ruolo chiave di PCSK9 nella degradazione di LDLR ha indirizzato l'interesse scientifico sullo sviluppo di farmaci per ridurre i livelli di LDL. L'uso di anticorpi monoclonali anti-PCSK9 ha eccezionalmente migliorato la gestione dell'ipercolesterolemia. Due anticorpi interamente umanizzati anti-PCSK9, evolocumab ed alirocumab, riducono efficacemente i livelli di LDL e il rischio CV in diversi gruppi di pazienti (pazienti FH, soggetti non

adeguatamente controllati dalla massima dose tollerata di statina, soggetti intolleranti alle statine). Lo studio TESLA (*Trial Evaluating PCSK9 Antibody in Subjects With LDL Receptor Abnormalities*)<sup>(228)</sup> è stato disegnato per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia di evolocumab nei pazienti HoFH. Otto pazienti HoFH con mutazioni nulle o difettive di LDLR sono stati trattati con evolocumab (420 mg ogni 4 settimane) e dopo 12 settimane di trattamento hanno mostrato una riduzione media di LDL del 16.5% rispetto al basale. I pazienti che hanno mostrato una maggiore e significativa riduzione di LDL (fino al 43.6%) erano portatori di mutazioni difettive nel gene LDLR mentre i pazienti portatori di mutazioni nulle (pazienti recettore-negativi) non hanno risposto al trattamento. Nello studio TAUSSIG (*Trial Assessing Long Term Use of PCSK9 Inhibition in Subjects With Genetic LDL Disorders*)<sup>(229)</sup>, un gruppo di 106 pazienti HoFH trattati con evolocumab in aggiunta al trattamento ipolipemizzante standard con o senza LDL-afèresi ha mostrato una riduzione media di colesterolo LDL del 21.1%. Anche in questo studio, i pazienti che hanno mostrato una significativa riduzione di LDL erano portatori di mutazioni difettive nel gene LDLR, mentre i pazienti portatori di mutazioni recettore-negative ed i pazienti ARH hanno risposto poco al trattamento. Nello studio ODYSSEY HoFH<sup>(230)</sup>, il trattamento di pazienti HoFH con alirocumab (150 mg ogni 2 settimane) ha determinato una sostanziale riduzione dei livelli di LDL (differenza rispetto al placebo: -35.6%). Alla fine della fase in doppio cieco, tutti i pazienti sono entrati in un periodo di trattamento in aperto per altre 12 settimane, mostrando una riduzione media di LDL rispetto al basale del 27.3% (-67.9 mg/dL). I pazienti che avevano ricevuto alirocumab durante la fase in doppio cieco hanno riportato riduzioni di LDL maggiori rispetto a quelli che avevano ricevuto placebo (30.7% vs. 20.6%). Le variazioni di LDL sono risultate altamente variabili, ma per lo più basse o assenti nei pazienti portatori di mutazioni LDLR nulle. Questi risultati suggeriscono che gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 possono essere utili nel ridurre i livelli di LDL in pazienti HoFH portatori di mutazioni difettive del gene LDLR.

## Mipomersen

Mipomersen è un inibitore della sintesi dell'apoB approvato dall'FDA nel 2013 per il trattamento della HoFH alla dose di 200 mg/settimana per via sottocutanea come terapia aggiuntiva a quella ipolipemizzante convenzionale. Mipomersen è un oligonucleotide antisense (*AntiSense Oligonucleotides*, ASO) di seconda generazione che si lega all'mRNA di ApoB, prevenendo così la sua traduzione e la conseguente produzione della proteina ApoB. Molti studi clinici hanno mostrato la capacità di mipomersen di ridurre significativamente ApoB, LDL e colesterolo non-HDL, ma ha evidenziato eventi avversi caratterizzati da reazioni anche severe nel sito di iniezione e sintomi simil-influenzali in circa il 70% dei pazienti trattati. Inoltre, molti soggetti hanno mostrato steatosi epatica e gli effetti a lungo termine sono ancora sconosciuti. Per tale motivo l'EMA non ha approvato l'utilizzo di mipomersen in Europa.

## Strategie farmacologiche emergenti per ridurre le LDL nella HoFH

### Inibitore di ANGPTL-3 (Evinacumab)

ANGPTL-3 è una proteina secreta dal fegato che inibisce la lipasi lipoproteica e la lipasi endoteliale, due enzimi coinvolti nel metabolismo dei trigliceridi e delle lipoproteine ad alta densità (high density lipoprotein, HDL). Studi di randomizzazione mendeliana

hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di LDL associata a varianti di ANGPTL3 è correlata ad una minore prevalenza della malattia CV su base aterosclerotica. L'inibizione di ANGPTL3 con un anticorpo monoclonale (evinacumab) può rappresentare una strategia terapeutica innovativa per la riduzione di LDL con un meccanismo indipendente da LDLR. Un recente studio ha dimostrato l'efficacia di evinacumab nel ridurre significativamente i livelli di LDL (~50%) in pazienti HoFH già in trattamento con la massima dose di terapia ipolipemizzante; grazie all'attività indipendente da LDLR, evinacumab è altamente efficace anche in pazienti con mutazioni nulle nel gene LDLR<sup>(231)</sup>.

## Silenziamento genico di PCSK9 (Inclisiran)

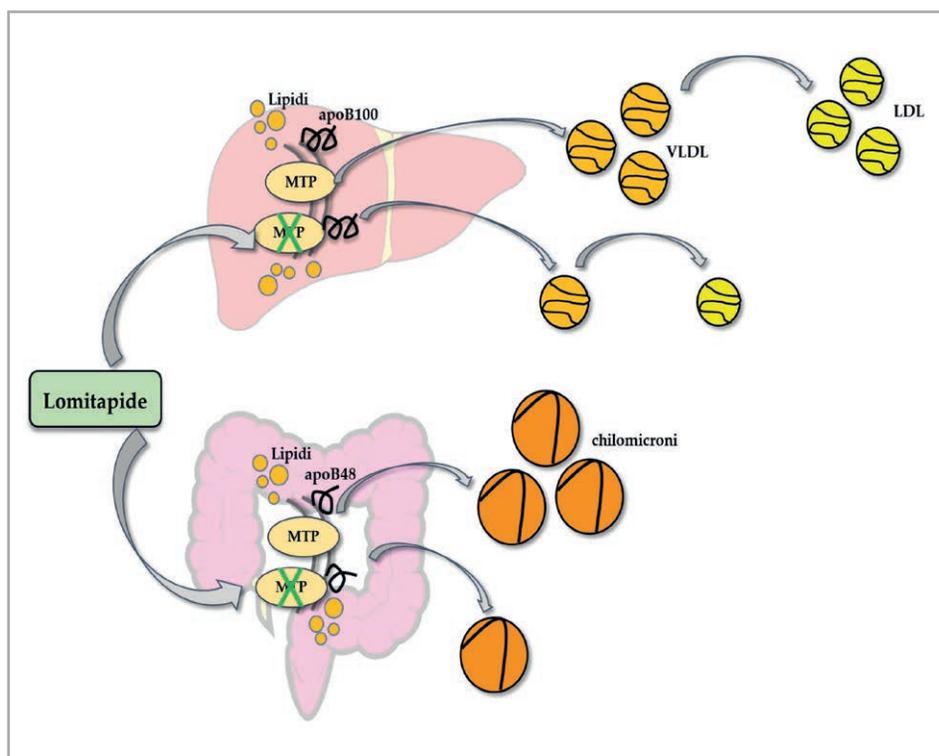
Inclisiran è un oligonucleotide sintetico di RNA a doppio filamento (small interfering RNA, siRNA) disegnato per silenziare in modo selettivo PCSK9 a livello epatico. Studi di Fase 1 condotti in volontari sani con livelli plasmatici di LDL  $\geq 100$  mg/dL hanno mostrato che il trattamento con inclisiran per 3 mesi riduce significativamente i livelli di PCSK9 (~70% con dosaggi >300 mg) e LDL (~50% con dosaggi >100 mg). Durante il periodo di trattamento non sono stati riportati eventi avversi clinicamente rilevanti. Successivamente, inclisiran è stato testato in pazienti a rischio CV molto alto in prevenzione secondaria e con livelli di LDL >70 mg/dL o >100 mg/dL in assenza di malattia CV. È interessante sottolineare che la riduzione dei livelli di LDL si è mantenuta fino a 240 giorni dopo la prima somministrazione del farmaco. Lo studio ORION-2 (studio pilota multicentrico di Fase 3, in aperto, a braccio singolo) ha valutato l'efficacia e la sicurezza di inclisiran nei pazienti HoFH in aggiunta alla massima dose tollerata di terapia ipolipemizzante (statina/ezetimibe): si è assistito ad una riduzione media di LDL di circa il 30%<sup>(232)</sup>. Attualmente è in corso uno studio di Fase 3 che sta valutando l'effetto ipocolesterolemizzante di inclisiran in pazienti HoFH (ORION-5).

Una differenza importante di inclisiran rispetto agli anticorpi monoclonali è che il farmaco riduce sia i livelli circolanti che quelli intracellulari (epatici) di PCSK9; l'effetto sui livelli intracellulari potrebbe contribuire a migliorare l'efficacia ma potrebbe anche smascherare effetti inattesi legati al blocco di PCSK9. Gli studi in corso saranno cruciali per rispondere a tali quesiti.

## Lomitapide

Lomitapide è un inibitore selettivo di MTP autorizzato dalle autorità internazionali regolatorie come terapia aggiuntiva alla dieta ipolipidica e al trattamento ipolipemizzante convenzionale per il trattamento dei pazienti adulti affetti da HoFH. MTP è una proteina coinvolta nell'assemblaggio e la secrezione delle VLDL nel fegato e dei chilomicroni nell'intestino (Figura 3)<sup>(233)</sup>. Il ruolo di MTP è stato chiarito grazie agli studi sulla abetalipoproteinemia, una malattia ereditaria rara caratterizzata dalla assenza di lipoproteine contenenti ApoB, accumulo di grassi nel fegato e nell'intestino associato a malassorbimento dei grassi, vitamine liposolubili e a steatorrea. Il deficit delle vitamine A ed E è responsabile di neuropatie periferiche, degenerazione spinale-cerebellare e retinite pigmentosa e quindi la supplementazione di vitamine liposolubili in questa rara malattia è altamente raccomandata<sup>(233)</sup>. L'inibizione di MTP è emersa come possibile approccio per ridurre i livelli lipidici plasmatici attraverso l'inibizione dell'assemblaggio e secrezione delle VLDL e dei chilomicroni. Studi in vitro in cellule HepG2 hanno evidenziato una riduzione della secrezione di lipoproteine dopo trattamento con lomitapide.

Queste osservazioni preliminari hanno suggerito che l'inibizione di MTP può



**Figura 3.** Meccanismo d'azione di lomitapide. La proteina di trasferimento microsomiale dei trigliceridi (MTP) media il trasferimento di lipidi all'apolipoproteina B (ApoB), con conseguente sintesi di VLDL (nel fegato) e chilomicroni (nell'intestino). Lomitapide inibisce l'attività di MTP riducendo così la produzione di lipoproteine contenenti apoB con conseguente riduzione dei livelli circolanti di LDL-C

representare un eccellente candidato per la riduzione dei livelli di LDL in modo indipendente da LDLR. L'inibizione di MTP nell'intestino può tuttavia indurre problemi gastrointestinali come diarrea e steatorrea<sup>(233)</sup>. L'efficacia e la sicurezza di lomitapide sono stati valutati in uno studio di Fase 3, a singolo braccio, in aperto in pazienti HoFH, che sono stati trattati con graduali incrementi di dose di lomitapide in aggiunta alla terapia ipolipemizzante in corso (inclusa l'aferesi). Lomitapide ha significativamente ridotto i livelli di LDL (50% di riduzione dopo 26 settimane di trattamento in 23 HoFH che hanno completato lo studio). Un sottogruppo di questi pazienti (19 su 23) ha proseguito il trattamento nello studio di estensione confermando l'efficacia associata a una buona tollerabilità e profilo di sicurezza<sup>(234)</sup>. I livelli di proteina C reattiva (PCR) ad alta sensibilità si sono ridotti progressivamente di circa il 60% per tutta la durata dello studio. Un'esperienza clinica di "real-world" in Italia ha confermato l'efficacia e la sicurezza del trattamento con lomitapide in 15 pazienti HoFH seguiti in diversi Centri Italiani per lo studio delle dislipidemie<sup>(235)</sup>. L'aggiunta di lomitapide alla terapia ipolipemizzante convenzionale ad un dosaggio più basso che nello studio di Fase 3 (19 mg/die) ha ridotto i livelli di LDL del 68.2±24.8% e ha consentito nel 60% dei pazienti di raggiungere valori di LDL <100 mg/dL e nel 46.6% <70 mg/dL. Inoltre, durante il periodo di *follow-up*, 8 pazienti su 10 che praticavano LDL-aferesi (80%) hanno potuto sospendere tale trattamento. È importante notare che la riduzione di LDL non si correla con il genotipo suggerendo che lomitapide può essere usata in tutti i pazienti HoFH, inclusi coloro che hanno mutazioni nulle nel gene LDLR<sup>(235)</sup>. Simili risultati di efficacia e sicurezza sono stati ottenuti in altri studi clinici di "real-world".

Eventi avversi comuni della lomitapide sono disturbi gastrointestinali come nausea, vomito, crampi addominali, diarrea; tuttavia questi sintomi diventano progressivamente meno frequenti in termini di severità e di intensità dopo la fase di incremento della dose del farmaco, con l'aderenza alla dieta ipolipidica (<20% dell'apporto calorico giornaliero derivante dai grassi) e la supplementazione di omega-mix e di vitamine liposolubili<sup>(233)</sup>. In alcuni casi la riduzione di dose di lomitapide rappresenta una valida strategia per mantenere un ragionevole equilibrio tra efficacia e sicurezza. Il trattamento con lomitapide può inoltre causare steatosi epatica e/o incremento delle transaminasi<sup>(233)</sup>. Gli effetti del trattamento a lungo termine con lomitapide sulla possibile evoluzione della steatosi epatica in steatoepatite/fibrosi e potenzialmente in cirrosi sono ancora sconosciuti e necessitano di una attenta valutazione in studi *post-marketing*. Lomitapide è metabolizzata in massima parte nel fegato tramite il citocromo P-450 (CYP) isoenzima 3A4 e l'aggiustamento della dose è necessaria quando è somministrata contemporaneamente a substrati del CYP3A4 come le statine (atorvastatina e simvastatina) o warfarin. La dose iniziale raccomandata è 5 mg una volta al giorno, seguita da un incremento della dose (fino a 60 mg) in base alla efficacia e tollerabilità. Lomitapide non è raccomandata in gravidanza e pertanto viene raccomandato l'uso della contraccezione nelle pazienti HoFH in età fertile. Sebbene l'efficacia e la sicurezza di lomitapide siano ben documentate, esistono pochi dati sugli *outcome* CV a lungo termine e sull'impatto sulla sopravvivenza. Un'analisi derivante da studi osservazionali e di intervento su 149 pazienti HoFH sudafricani ha mostrato i benefici della terapia con lomitapide in aggiunta alla terapia ipolipemizzante convenzionale in termini di sopravvivenza e di riduzione di rischio di eventi CV maggiori<sup>(236)</sup>. In base ai dati di efficacia e sicurezza disponibili, la lomitapide può essere considerata un farmaco di prima linea sia nel trattamento delle forme autosomiche dominanti che di quelle recessive di HoFH in aggiunta al trattamento ipolipemizzante massimale e/o alla LDL-afèresi.

### **LOWER: un registro sull'uso clinico di lomitapide**

Recentemente è stato ritenuto necessario acquisire informazioni sui pazienti HoFH trattati con lomitapide nella pratica clinica quotidiana. Le informazioni acquisite possono aiutare a valutare l'efficacia e la sicurezza a lungo termine della lomitapide, gli eventuali *outcome* su eventuali gravidanze e attuare pertanto interventi indirizzati a ridurre potenziali rischi derivanti dal trattamento. Al fine di raggiungere questi obiettivi, le autorità internazionali regolatorie del farmaco hanno richiesto l'istituzione di un registro dei soggetti trattati con lomitapide. In Europa, il registro LOWER sta rendendo disponibili dati di efficacia e sicurezza a lungo termine nella pratica clinica, facilitando così l'approccio a pazienti HoFH. L'analisi dei dati di 5 anni ha dimostrato che, ad una dose mediana di 10 mg, lomitapide determina una riduzione media del 33% dei livelli di LDL (riduzione assoluta ~71 mg/dL); il 64.5% dei pazienti trattati raggiunge livelli di LDL <100 mg/dL e il 41.1% livelli <70 mg/dL (237). È stata riportata un'incidenza degli eventi avversi inferiore rispetto a quella osservata negli studi clinici, probabilmente dovuta alla dose mediana inferiore<sup>(237)</sup>. Un sottostudio del LOWER (CAPTURE – *Effects of Lomitapide on Carotid and Aortic Atherosclerosis in Patients Treated with Lomitapide in Usual Care*) sta valutando l'efficacia della lomitapide sugli *outcome* vascolari come la riduzione e/o la stabilizzazione delle placche aterosclerotiche carotidiche ed aortiche. È stato istituito anche un registro indipendente per valutare gli effetti della lomitapide in donne che vanno incontro a una gravidanza durante il trattamento.

## Lomitapide e varianti geniche di MTP

Nella pratica clinica, i pazienti HoFH trattati con lomitapide in aggiunta alla terapia ipolipemizzante standard, inclusa l'aferesi, mostrano una risposta variabile alla terapia. È stato dimostrato che alcuni pazienti con risposta più marcata (*iper-responders*) possono ottenere una riduzione maggiore di LDL rispetto agli altri (*ipo-responders*) (>50% vs. <50% di riduzione di LDL). È stato suggerito un possibile ruolo di varianti geniche di MTP (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) nella risposta al trattamento con lomitapide. Sono state identificate 36 diverse varianti tramite sequenziamento diretto dei 26 esoni e delle regioni non codificanti del gene MTP. I soggetti *iper-responders* condividono sei SNPs di MTP, che non sono presenti negli *ipo-responders*. È stato ipotizzato che gli SNPs del gene MTP possano modulare le funzioni della proteina MTP attraverso interazioni tra gene ed ambiente e/o gene-gene<sup>(238)</sup>. Questa ipotesi potrebbe spiegare la variabilità della risposta alla terapia con lomitapide e potrebbe fornire informazioni sui pazienti che meglio beneficerebbero del trattamento con lomitapide. Ulteriori dati sono comunque necessari per supportare questa ipotesi.

## Considerazioni finali

Lomitapide è stato approvato come farmaco per il trattamento di pazienti HoFH adulti e come terapia aggiuntiva alla terapia ipolipemizzante standard. L'efficacia e tollerabilità di lomitapide sono state ampiamente documentate, ma è necessaria un'attenta valutazione a lungo termine della sicurezza. Mentre l'intensità dei disturbi gastrointestinali si riduce progressivamente con la titolazione della dose e con una stretta aderenza alla dieta ipolipidica, la possibilità di sviluppare steatosi epatica e la sua eventuale progressione verso stadi più avanzati di malattia quali steatoepatite, fibrosi e/o cirrosi non devono essere sottostimati nella gestione a lungo termine dei pazienti trattati con lomitapide. I dati raccolti nei registri *post-marketing* saranno utili nella valutazione degli *outcome* a lungo termine. L'uso di lomitapide in gravidanza e durante l'allattamento è ancora in corso di valutazione, e anche per questo aspetto i dati raccolti nei registri potranno rispondere a domande riguardanti questo specifico gruppo di pazienti. Inoltre, la lomitapide non è stata testata nella popolazione HoFH pediatrica. La disponibilità di dati clinici e la valutazione di efficacia, sicurezza, tollerabilità e outcome clinici nei bambini con HoFH potrebbe essere un tema interessante per future ricerche. Probabilmente l'uso di lomitapide nei bambini dovrebbe essere considerato superando le limitazioni all'uso derivanti dall'età al fine di impattare sulla prevenzione delle complicanze CV precoci che possono derivare dalla indisponibilità di efficaci trattamenti ipolipemizzanti. Un altro interessante argomento di discussione è l'osservazione che SNPs di MTP possono influenzare la risposta al trattamento con lomitapide. Questa ipotesi potrebbe essere meglio analizzata estendendo lo studio ad un gruppo più numeroso di HoFH. In questo modo la decisione terapeutica dei clinici potrebbe essere facilitata nella selezione dei pazienti da trattare con lomitapide. In conclusione, la terapia ipolipemizzante convenzionale per il trattamento della HoFH rappresenta una sfida. Sulla base dei dati disponibili, lomitapide rappresenta un trattamento aggiuntivo efficace e sicuro per la gestione dei pazienti HoFH. Sono necessari ulteriori dati sulla sicurezza a lungo termine.



# Anticorpi monoclonali: inibitori di PCSK9 ed evinacumab

# C10

Gianfranco Sinagra, Maddalena Rossi, Massimo Mancone

Una delle più recenti strategie farmacologiche nell'ambito della terapia delle dislipidemie è rappresentata dagli anticorpi monoclonali. A questa innovativa classe di farmaci appartengono da un lato gli inibitori della Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9 (PCSK9), il cui ruolo terapeutico è già stato chiaramente definito nelle Linee Guida della *European Society of Cardiology* e *European Atherosclerosis Society* (ESC/EAS) del 2019<sup>(10)</sup>, dall'altro evinacumab, inibitore della proteina *angiopoietin-like 3* (ANGPTL3), una nuova promettente opzione per la terapia dell'ipercolesterolemia familiare omozigote (*Homozygous Familial Hypercholesterolemia*, HoFH).

## Inibitori di PCSK9: alirocumab ed evolocumab

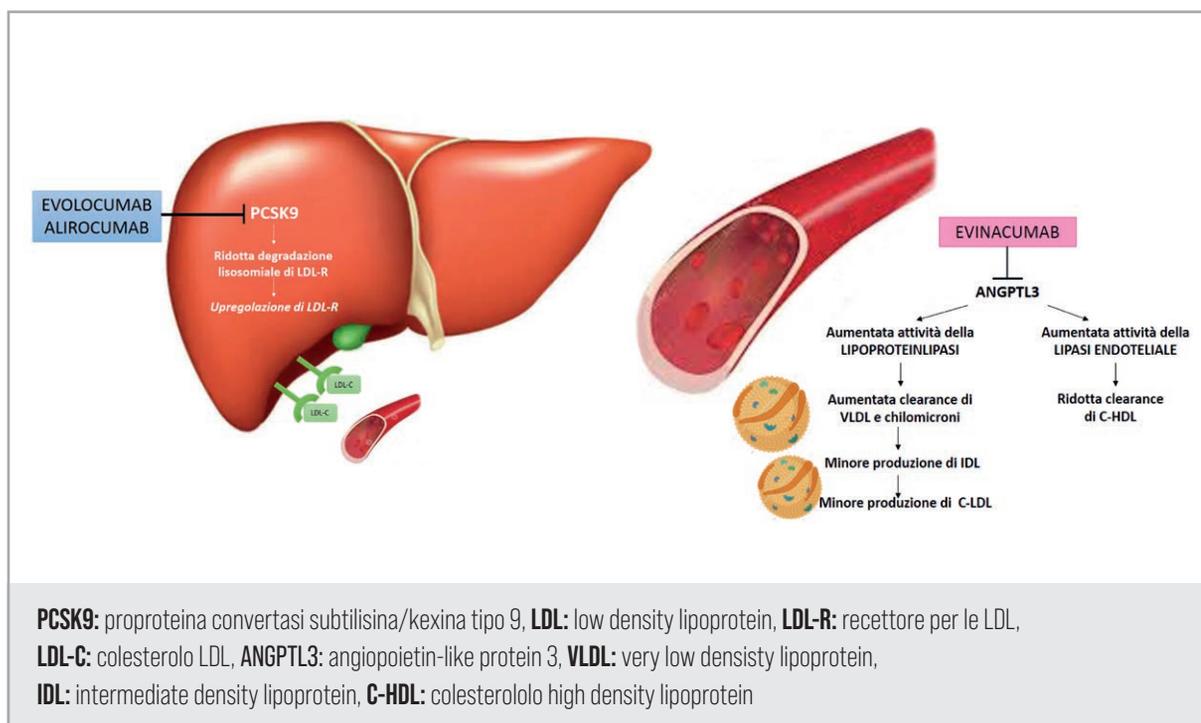
Nel 2003 Abifadel *et al.* descrissero per la prima volta una forma severa di ipercolesterolemia familiare a trasmissione autosomica dominante dovuta ad una mutazione *gain-of-function* del gene codificante per la proteina PCSK9 e, in maniera speculare, un gruppo di individui con mutazioni *loss-of-function* dello stesso enzima con livelli ematici molto bassi di colesterolo *low-density-lipoprotein* (LDL) e, contestualmente, una bassa prevalenza di malattia coronarica aterosclerotica<sup>(239)</sup>.

Studi successivi hanno confermato che PCSK9 svolge un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo del colesterolo, favorendo un'intensa attività di ricerca e rendendo questa proteina uno dei principali *target* per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento dell'ipercolesterolemia.

L'approccio più avanzato da un punto di vista clinico è rappresentato oggi dagli anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9, alirocumab ed evolocumab, che, con la loro notevole efficacia, hanno inaugurato una nuova era nel mondo degli ipolipemizzanti.

## Meccanismo d'azione

PCSK9 è una serin-proteasi di 692 amminoacidi sintetizzata nel fegato e poi secreta nel circolo sanguigno, che regola l'emivita dei recettori epatici le LDL (LDLR) i quali, legandosi al colesterolo LDL circolante, lo rimuovono dal torrente ematico favorendone il catabolismo. PCSK9 è in grado di legare LDLR sia a livello intracellulare che sulla superficie della membrana plasmatica degli epatociti, promuovendone, attraverso una modifica conformazionale e l'internalizzazione nel citoplasma, la degradazione lisosomiale. Il principale fattore in grado di regolare l'espressione genica di PCSK9 è rappresentato dalla concentrazione di steroli intracellulari, in una complessa



**Figura 1.** Meccanismo d'azione di alirocumab, evolocumab ed evinacumab

interazione fra LDL, LDLR e PCSK9 deputata a mantenere la colesterolemia nei limiti di normalità<sup>(240)</sup>. Alirocumab ed evolocumab sono due anticorpi monoclonali di sottotipo IgG completamente umani che si legano, in un rapporto stechiometrico 1:1, alla proteina PCSK9 circolante, inibendone l'interazione con i recettori epatici per le LDL. Ne deriva un'aumentata espressione degli stessi sulla superficie epatocitaria e, conseguentemente, un'aumentata clearance del colesterolo LDL circolante (Figura 1).

## Effetto ipolipemizzante

Fra i farmaci ipolipemizzanti attualmente disponibili, gli anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9 sono quelli che hanno dimostrato la maggiore efficacia. Nei *trials* clinici di Fase 3 il trattamento con alirocumab od evolocumab è stato associato ad una riduzione dei livelli di LDL circolanti del 60% circa, indipendentemente dalla terapia ipolipemizzante di *background*<sup>(240)</sup> (Tabella 1) (Figura 2). Quando aggiunti ad una statina ad alta intensità (i.e. atorvastatina 40-80 mg/die) essi garantiscono una riduzione di LDL del 46-73% rispetto al placebo e del 30% rispetto all'ezetimibe, mentre l'associazione di statina ad alta intensità, ezetimibe ed inibitori di PCSK9 assicura una riduzione di LDL dell'85% circa (vedi Tabella 1 Capitolo 6).

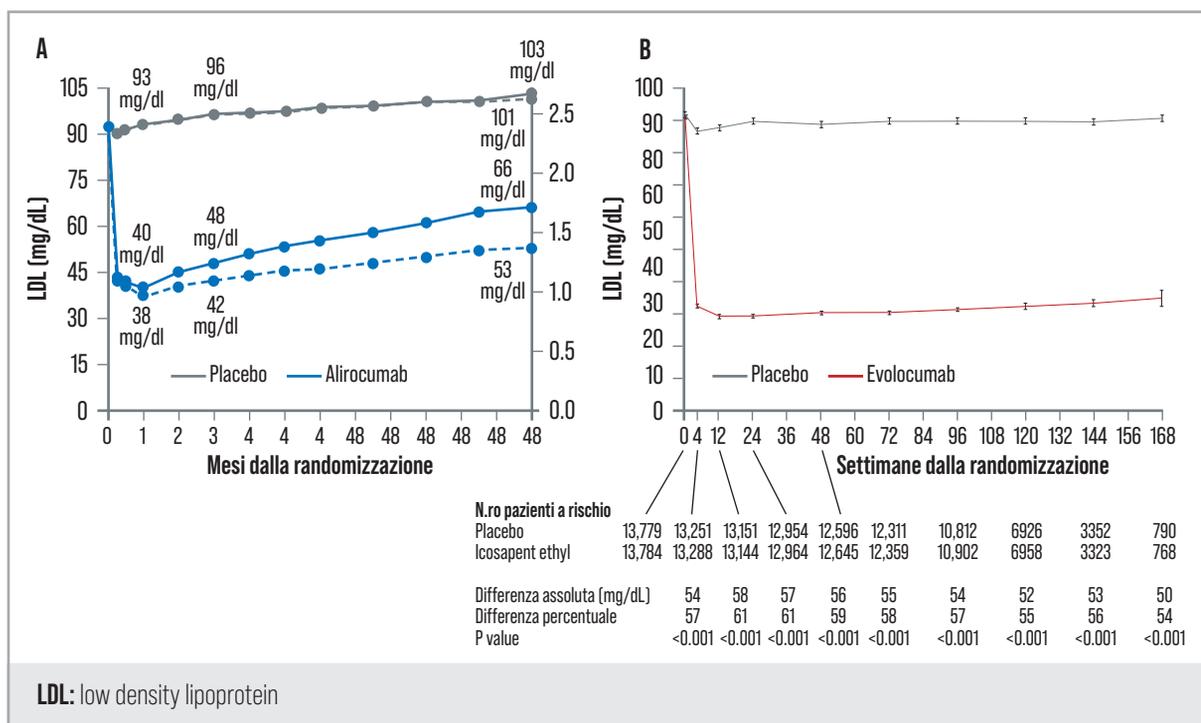
Inoltre, nei pazienti intolleranti alle statine, che rappresentano una categoria di difficile gestione terapeutica, gli inibitori di PCSK9, usati come terapia di prima linea, determinano una riduzione di LDL circolanti del 45-56%<sup>(240)</sup> (Tabella 2). In considerazione del loro meccanismo d'azione, l'efficacia di questa classe di farmaci dipende dall'espressione epatica di LDLR, per cui nei pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote, spesso correlata a mutazioni *loss of function* del gene codificante per i recettori delle LDL, il loro uso è condizionato dalla valutazione dell'espressione residua di tali recettori. In uno studio randomizzato controllato con placebo, la terapia con evolocumab si è associata ad una riduzione media di LDL del 31%, con un *range* estremamente variabile: dal 47%

**Tabella 1.** Studi di Fase 3 con alirocumab ed evolocumab.

Trial	Popolazione	N. Pazienti	Riduzione LDL
<b>ALIROCUMAB</b>			
Odyssey mono	Ipercolesterolemia con o senza statine	103	47.2%
Odyssey alternative	Intolleranza alle statine; ipercolesterolemia primitiva e rischio CV moderato, alto o molto alto	251	52.2%
Odyssey options I	Ipercolesterolemia primitiva non adeguatamente controllata da atorvastatina, con o senza altri agenti ipolipemizzanti, ed alto rischio CV	183	44% - 54%
Odyssey options II	Ipercolesterolemia non adeguatamente controllata da rosuvastatina con o senza altri agenti ipolipemizzanti, ed alto rischio CV	415	36% - 51%
Odyssey combo I	Ipercolesterolemia non adeguatamente controllata da statine a dose massima con o senza altri agenti ipolipemizzanti, ed alto rischio CV	316	48%
Odyssey high HF	FH eterozigote non adeguatamente controllata dalla terapia ipolipemizzante in atto	107	46%
Odyssey long term	Ipercolesterolemia non adeguatamente controllata dalla terapia ipolipemizzante in atto, ed alto rischio CV	3109	61%
Odyssey combo II	Ipercolesterolemia non adeguatamente controllata da statine a dose massima con o senza altri agenti ipolipemizzanti, ed alto rischio CV	720	50%
Odyssey choice II	Ipercolesterolemia non controllata in pazienti intolleranti alle statine	233	51.7% - 53.5%
Odyssey FH I	FH eterozigote non adeguatamente controllata dalla terapia ipolipemizzante in atto	486	57,9%
Odyssey FH II	FH eterozigote non adeguatamente controllata dalla massima dose di statina tollerata con o senza altri agenti ipolipemizzanti	249	51,4%
Odyssey outcomes*	Recente ospedalizzazione per SCA (1-12 mesi prima) e LDL $\geq$ 70 mg/dL nonostante terapia con statina	18924	55%
<b>EVOLOCUMAB</b>			
Mendel-2	Rischio secondo Framingham $\leq$ 10% e LDL $\geq$ 100 mg/dL	614	58%
Gauss-2	Ipercolesterolemia in pazienti intolleranti alle statine	307	54%
Descartes	LDL $\geq$ 85 mg/dL e/o LDL fuori target in terapia ipolipemizzante massimale	901	55%
Laplace-2	Ipercolesterolemia primaria o dislipidemia mista in terapia con statine con o senza ezetimibe	2067	70%
Rutherford-2	FH eterozigote e LDL $\geq$ 100 mg/dL nonostante terapia con statina	331	56%
Tesla	FH omozigote e LDL $\geq$ 130 mg/dL nonostante terapia ipolipemizzante massimale	50	23,1%
Osler 1 e 2	Ipercolesterolemia o dislipidemia mista (studio di estensione)	4465	61%
Glagov	Malattia coronarica; LDL $\geq$ 80 mg/dL o fra 60 e 80 mg/dL in presenza di fattori di rischio CV	968	-56 mg/dL
Fourier*	Malattia CV aterosclerotica e LDL $\geq$ 70 mg/dL nonostante terapia con statina	27564	59%

\*CV outcomes. **LDL**: low density lipoproteins, **CV**: cardiovascolare, **SCA**: sindrome coronarica acuta, **FH**: ipercolesterolemia familiare

in pazienti *receptor-defective* (attività residua 2-25%) al 25% in pazienti *receptor-negative* (attività residua <2%) fino all'inefficacia in pazienti con due alleli negativi<sup>(241)</sup>. Recenti studi hanno evidenziato che PCSK9 gioca un ruolo chiave in processi indipendenti dall'attività sui recettori delle LDL, potendosi legare anche al recettore delle *very low density lipoproteins* (VLDL) e a CD36, recettore coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi, favorendone la degradazione. A conferma di ciò l'effetto degli inibitori di PCSK9 si esplica anche sulle altre componenti lipidiche: come già dimostrato per le statine, essi si associano ad una riduzione dei livelli ematici di trigliceridi (TG) del 26% circa e di apolipoproteina B (ApoB), componente essenziale di tutti i lipidi aterogenici, del 50% ad alte dosi. Inoltre alirocumab ed evolocumab, a differenza delle statine, sono in grado di ridurre i livelli plasmatici di lipoproteina(a) del 25% circa, anche se i risvolti terapeutici di tale effetto appaiono ad oggi non chiari (Tabella 3).



**Figura 2.** Riduzione del valore di LDL nel trial ODISEY Outcomes con alirocumab (pannello A) e nel trial FOURIER con evolocumab (pannello B) (Modificata da ref #244 e #243)

**Tabella 2.** Riduzione percentuale dei livelli di LDL in terapia con anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9 (ref #240)

	In monoterapia in pazienti intolleranti alle statine	In aggiunta alla terapia con statine	In pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote	In pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote
Alirocumab	55-57%	63-75%	60-66%	31%
Evolocumab	45%	46-51%	58%	ND

**Tabella 3.** Effetto di statine ad alta intensità, inibitori di PCSK9 ed evinacumab

	LDL	HDL	TG	ApoB	Lp(a)
Statine ad alta intensità	-50/60%	+5/10%	-25/35%	-40/50%	Neutro
Inibitori di PCSK9	-60%	+5/10%	-26%	-50%	-25%
Evinacumab	-47%	-30%	-55%	-41%	ND

LDL: low density lipoproteins, HDL: high density lipoproteins, TG: trigliceridi, ApoB: apolipoproteina B, Lp(a) lipoproteina a, PCSK9: propeptina convertasi subtilisina/kexina tipo 9

## Via e frequenza di somministrazione

Gli inibitori di PCSK9 vengono somministrati per via sottocutanea con cadenza mensile o bisettimanale. Una sola iniezione introduce in circolo una quantità di anticorpi nettamente superiore rispetto al *target* (rapporto stimato 100:1) che già nelle prime ore “cattura” l'intero *pool* di PCSK9 circolante, garantendo poi una riduzione stabile nel tempo. Alirocumab è disponibile in tre dosaggi: 75 o 150 mg una volta ogni due settimane oppure 300 mg una volta al mese; il dosaggio iniziale viene scelto in base ai livelli di LDL di partenza, considerando che con 75 mg ci si aspetta una riduzione degli stessi del 45% circa mentre con la dose di 150 mg la riduzione attesa

sale al 60%. Evolocumab, invece, può essere somministrato ad un dosaggio di 140 mg ogni due settimane oppure di 420 mg ogni quattro settimane, garantendo una riduzione di LDL di circa il 60% in entrambi i casi.

## Farmacocinetica ed interazioni con altri farmaci

Alirocumab ed evolocumab hanno una biodisponibilità assoluta dell'85% e del 72%, rispettivamente. Dopo somministrazione di una singola dose le concentrazioni sieriche massime sono raggiunte in 3-4 giorni, tuttavia l'azione di inibizione di PCSK9 inizia già dopo 4-6 ore. Il volume di distribuzione medio allo *steady-state* è pari a circa tre litri, indicando una limitata distribuzione di tali farmaci nei tessuti<sup>(242)</sup>. L'emivita effettiva stimata è compresa tra 11 e 17 giorni per evolocumab e 17-20 giorni per alirocumab. Poiché queste molecole, come le immunoglobuline naturali, sono composte esclusivamente da aminoacidi e carboidrati, la loro eliminazione non coinvolge *pathways* epatici né renali ma avviene tramite degradazione in piccoli peptidi e singoli aminoacidi<sup>(242)</sup>. Non è quindi necessario alcun aggiustamento di dosaggio in pazienti con insufficienza epatica o renale, tuttavia, poiché nei *trial* di Fase 3 su evolocumab ed alirocumab sono stati esclusi, rispettivamente, pazienti con velocità di filtrazione glomerulare minore di 20 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> e 30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, essi devono essere usati con cautela in caso di disfunzione renale severa<sup>(243,244)</sup>. Inoltre, non sono state descritte interazioni con il sistema del citocromo P450 né interazioni degne di nota con altri farmaci assunti per os.

## Effetti sulla morbilità e sulla mortalità cardiovascolare

Il razionale dell'uso di farmaci ipolipemizzanti deriva dalla dimostrazione della loro efficacia nella diminuzione dei livelli circolanti di colesterolo LDL ma soprattutto dall'effettiva correlazione con i fenomeni di regressione del processo aterosclerotico e dalla conseguente riduzione degli eventi ischemici. Nel 2016 lo studio GLAGOV (*Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients*)<sup>(245)</sup> ha chiaramente documentato che, in pazienti con malattia coronarica, la terapia con evolocumab in aggiunta a statina si associava ad una riduzione significativa della percentuale di volume della placca aterosclerotica. L'ipotesi avanzata indirettamente dagli studi sull'*imaging* coronarico che tanto più si riducono i livelli assoluti e percentuali di LDL e si induce regressione dell'ateroma, tanto più si prevencono gli eventi cardiovascolari (CV) è stata successivamente confermata da due ampi *trials* clinici randomizzati controllati con placebo: lo studio ODISSEY Outcomes (*Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome During Treatment With Alirocumab*)<sup>(244)</sup> e lo studio FOURIER (*Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subjects with Elevated Risk*)<sup>(243)</sup> (Tabella 4).

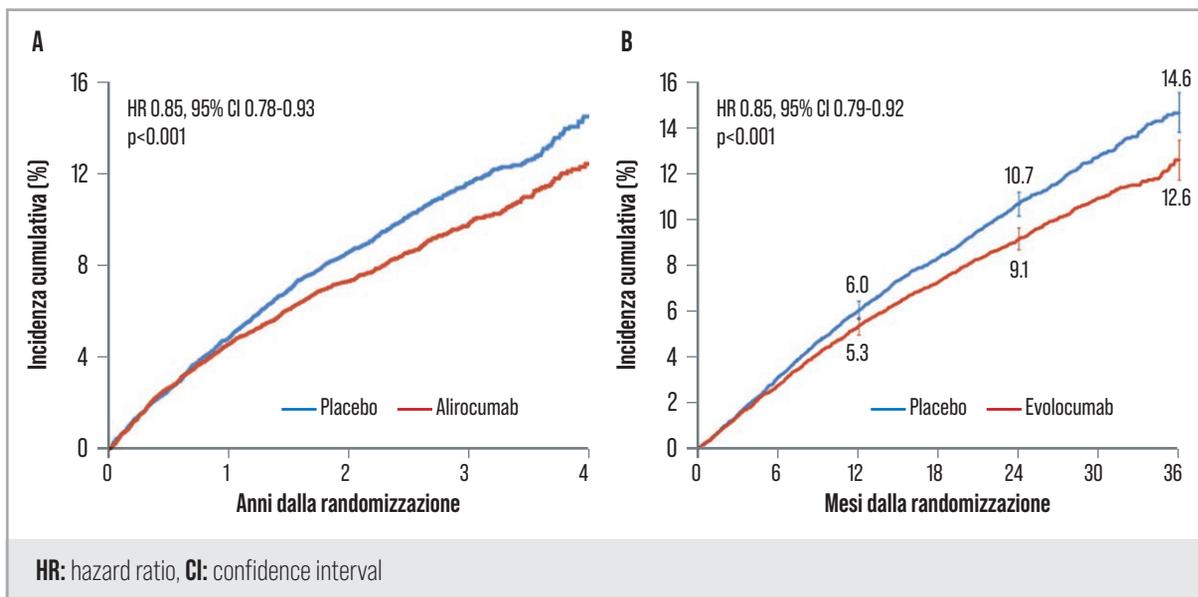
In entrambi i *trials* gli inibitori di PCSK9 venivano somministrati in prevenzione secondaria in pazienti con livelli di LDL  $\geq 70$  mg/dL, il *target* al tempo da raggiungere in tali pazienti, nonostante terapia con statina. Tuttavia, mentre lo studio ODISSEY Outcomes<sup>(244)</sup> ha arruolato pazienti ospedalizzati per sindrome coronarica acuta (SCA) nei precedenti 1-12 mesi, il FOURIER<sup>(243)</sup> ha arruolato pazienti con malattia aterosclerotica stabile (cardiopatía ischemica cronica, ictus o arteriopatia periferica sintomatica) (Tabella 4). Nell'ODISSEY Outcomes<sup>(244)</sup> la terapia con alirocumab ha determinato una riduzione del 15% del rischio relativo dell'*endpoint* primario composito di morte CV, infarto del miocardio (IM) non fatale, ictus ischemico fatale e non fatale od ospedalizzazione per angina instabile (HR 0.85, 95% CI 0.78-0.93;  $p=0.0003$ ), dopo un *follow-up* medio di 2,8 anni (Figura 3A).

**Tabella 4.** ODYSSEY Outcomes vs. FOURIER: trial a confronto

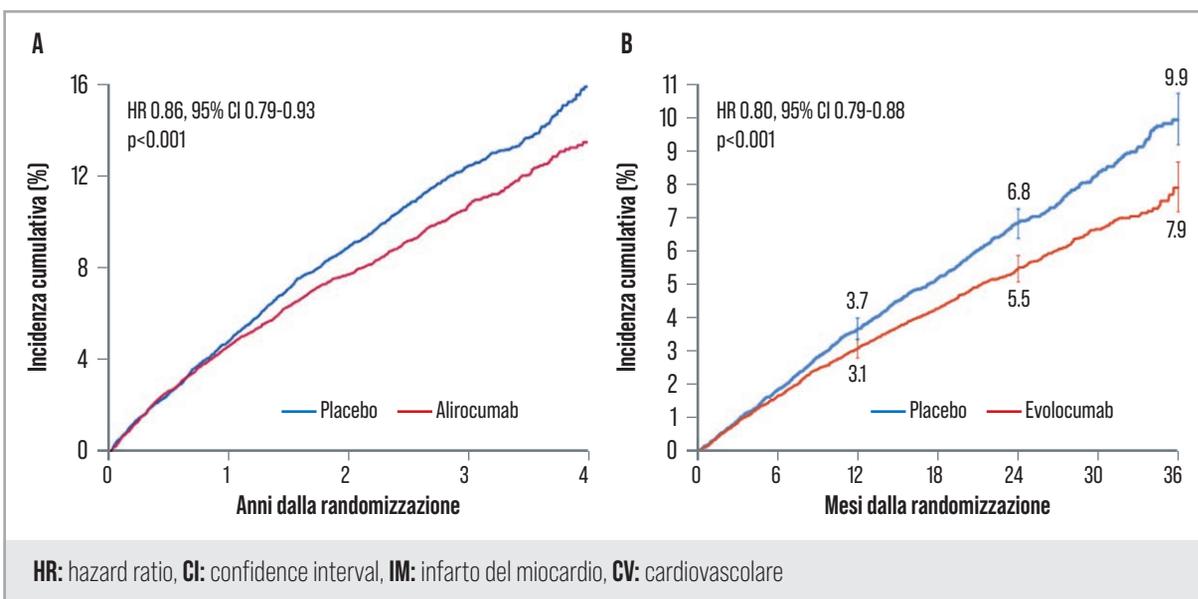
	Odyssey outcomes (ref #244)	Fourier (Ref #243)
Criteri di arruolamento	- ≥40 anni - Ospedalizzazione per SCA (IM o angina instabile) da 1 a 12 mesi precedenti - Scarso controllo lipidico, definito da uno dei seguenti: LDL ≥70 mg/dL, non-HDL ≥100 mg/dL o ApoB ≥80 mg/dL - In trattamento ipolipemizzante ottimizzato (atorvastatina 40-80 mg, rosuvastatina 20-40 mg o la massima dose tollerata di tali statine, inclusa no statina in caso di documentati effetti collaterali)	- 40-85 anni - Storia di malattia CV aterosclerotica (pregresso IM, stroke non emorragico, arteriopatia periferica sintomatica, - Scarso controllo lipidico, definito da uno dei seguenti: LDL ≥70 mg/dL o non-HDL ≥100 mg/dL - TG ≤400 mg/dL In trattamento ipolipemizzante ottimizzato (preferibilmente statina ad alta intensità, ma necessariamente atorvastatina 20 mg o equivalenti con o senza ezetimibe)
Endpoint primario	Morte per causa CV; IM non fatale; stroke ischemico fatale e non fatale; angina instabile con necessità di ospedalizzazione	Morte per causa CV; IM; stroke; ospedalizzazione per angina instabile; rivascolarizzazione coronarica
Pazienti, n	18.924	27.564
Età, anni	58.5±9.3	62.5±9.0
Sesso femminile	25.2%	24.5%
Pregresso IM	83%	81.1%
LDL baseline	92 mg/dL	92 mg/dL
Pazienti in terapia con statina ad alta intensità	89%	69%
Pazienti in terapia con ezetimibe	3%	5%
Follow-up	2,8 anni	2,2 anni
Riduzione assoluta di LDL	-48 mg/dL	56 mg/dL
Riduzione % di LDL	-55%	-59%
Riduzione % di TG	-10%	-16%
Riduzione % di Lp(a)	-24%	-27%
Riduzione relativa dell'endpoint primario	15%	15%

**SCA:** sindrome coronarica acuta, **CV:** cardiovascolare, **LDL:** low density lipoproteins, **HDL:** high density lipoprotein, **ApoB:** apolipoproteina B, **TG:** trigliceridi, **IM:** infarto del miocardio, **Lp(a):** lipoproteina a

Dati simili sono emersi dal FOURIER, in cui nel braccio di trattamento con evolocumab, dopo un *follow-up* medio di 2,2 anni, si è osservata una riduzione del 15% del rischio relativo dell'outcome primario di morte CV, IM, ictus ischemico, ospedalizzazione per angina instabile o rivascolarizzazione coronarica (HR 0.85, 95% CI 0.79-0.92; p<0.001) (Figura 3B). In particolare, il trattamento con evolocumab ha determinato una riduzione del rischio relativo di IM del 27%, di ictus del 21% e di rivascolarizzazione coronarica del 22%<sup>(243)</sup>. In entrambi gli studi l'analisi delle diverse componenti dell'*endpoint* primario non ha dimostrato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di trattamento e quello di controllo in termini di mortalità per tutte le cause o per cause CV, tuttavia un'analisi *time-to-benefit* ha evidenziato che, in maniera simile a quanto noto per le statine, il beneficio clinico della terapia con inibitori di PCSK9 emerge potentemente dopo il primo anno di terapia; è quindi verosimile che il *follow-up* relativamente breve dei due studi abbia determinato una sottostima del reale impatto sulla mortalità di una terapia a lungo termine. In termini di *endpoint* secondari, nello studio ODYSSEY Outcomes<sup>(244)</sup>, alirocumab ha dimostrato



**Figura 3.** Incidenza cumulativa dell'endpoint primario nel trial ODISSEY Outcomes con alirocumab [pannello A] e nel trial FOURIER con evolocumab [pannello B] (Modificata da ref #244 e #243)



**Figura 4.** Incidenza cumulativa dell'endpoint secondario di morte per tutte le cause, IM non fatale o stroke non fatale nel trial ODISSEY Outcomes con alirocumab [pannello A] e dell'endpoint secondario di morte CV, IM o stroke non fatale nel trial FOURIER con evolocumab [pannello B] (Modificata da ref #244 e #243)

di ridurre significativamente rispetto al placebo il combinato di morte per tutte le cause, IM non fatale e *stroke* non fatale (HR 0.86, 95% CI 0.79–0.93; p<0.001) (Figura 4A). Nello studio FOURIER<sup>(243)</sup>, similmente, evolocumab ha significativamente ridotto vs. placebo l'endpoint combinato di morte CV, IM o *stroke* (HR 0.80, 95% CI 0.73–0.88; p<0.001) (Figura 4B). Successive analisi di sottogruppo hanno indagato l'efficacia di tali agenti nelle diverse classi di rischio CV dimostrando che il beneficio in termini di riduzione assoluta di eventi è maggiore nei soggetti a rischio alto o molto alto (pregresso IM, malattia coronarica multivasale, diabete, arteriopatia periferica)<sup>(246)</sup> ed è proporzionale alla riduzione dei valori assoluti di LDL<sup>(247)</sup>.

I pazienti che presentano più alti livelli di LDL al *baseline* sperimentano, quindi, una maggiore riduzione di rischio per ogni dato decremento percentuale di LDL e, infatti, è stato stimato che il *number needed to treat* (NNT) per evitare il primo evento CV è minore di 30 nella classe di pazienti ad alto rischio CV con valori di LDL  $\geq 130$  mg/dL e sarebbe minore di 50 in pazienti con LDL  $\geq 70$  mg/dL. Tale dato si applica all'uso di questi farmaci nella pratica clinica dove dati recenti europei indicano che i livelli di LDL dei pazienti trattati sono intorno ai 160 mg/dL, rispetto ai 90 mg/dL degli studi di Fase 3, lasciando prevedere un beneficio in termini di risparmio di eventi sostanzialmente più ampio di quanto riportato nei due studi registrativi.

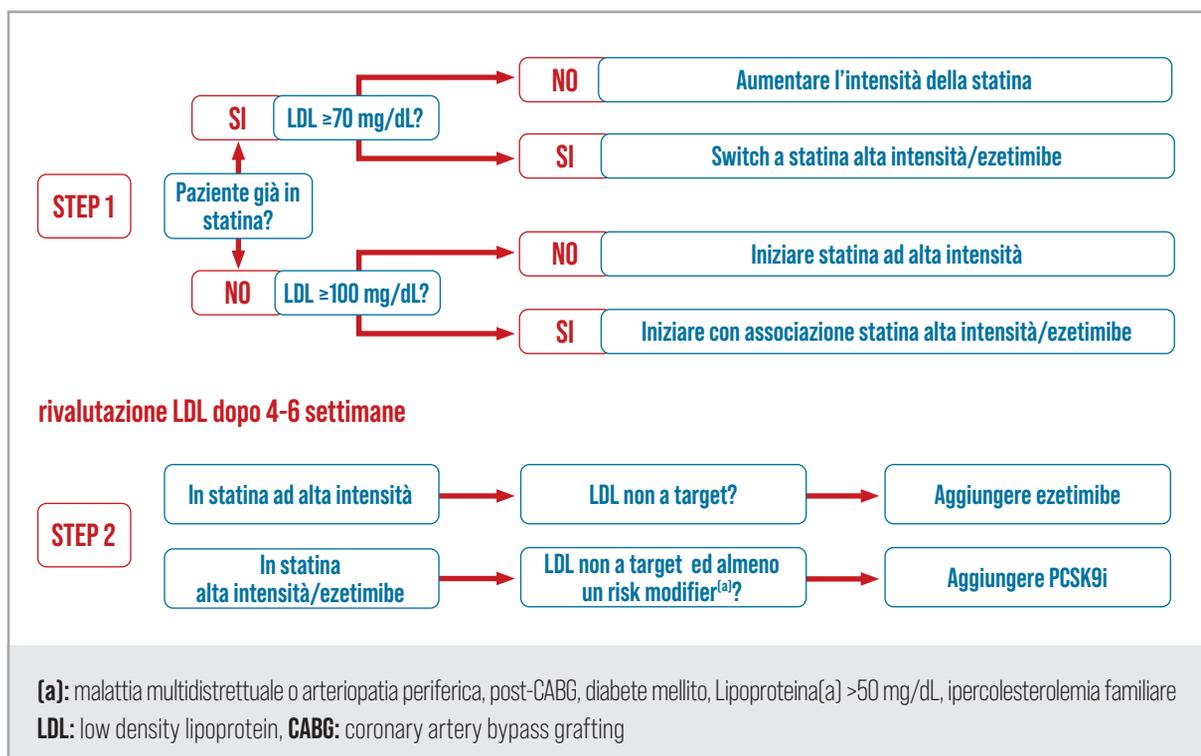
## Sicurezza e tollerabilità

Gli anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9 hanno dimostrato un ottimo profilo di sicurezza, confermando l'ipotesi che tale proteina abbia un ruolo biologico limitato alla regolazione dei livelli di colesterolo. Gli eventi avversi più frequentemente descritti, sia nei *trials* sia nei *report* di farmacovigilanza, sono le reazioni nel sito di iniezione come eritema, prurito, gonfiore, dolore, sanguinamento, usualmente di grado lieve. Relativamente comuni, potendo interessare una persona su dieci trattate, sono anche sintomi simil-influenzali, sensazione di malessere e nausea, mal di schiena ed artralgie. Molto più rare sono invece le manifestazioni di natura allergica, come orticaria e, nei casi più gravi, angioedema (meno di 1 paziente su 1000). In base ai risultati di alcuni piccoli studi era stata inizialmente sospettata un'incidenza significativa di deficit neurocognitivi in corso di terapia con inibitori di PCSK9, tuttavia tale ipotesi è stata poi smentita dai risultati del *trial* EBBINGHAUS (*Evaluating PCSK9 Binding antibody Influence on cognitive HeAlth in High cardiovascular Risk Subjects*) che ha dimostrato l'assenza di differenze statisticamente significative in termini di *working memory* e funzioni psicomotorie fra pazienti trattati con evolocumab e braccio placebo, seguiti per un *follow-up* di 19 mesi<sup>(248)</sup>. Inoltre, nonostante alcuni studi mendeliani avessero suggerito una possibile associazione fra l'inibizione di PCSK9 ed un rischio maggiore di diabete mellito di tipo 2, questa ipotesi non è stata suffragata dai risultati dei *trials*. A conferma di ciò, in una meta-analisi di 20 RCTs con 68.000 pazienti trattati con inibitori di PCSK9 è stato evidenziato un minimo aumento della glicemia a digiuno (1.88 mg/dL), senza tuttavia un significativo maggior rischio di sviluppare diabete<sup>(249)</sup>. Un potenziale problema della terapia a lungo termine con anticorpi monoclonali è rappresentato dalla produzione di anticorpi anti-farmaco; il programma di sviluppo di un terzo anticorpo anti-PCSK9, bococizumab, contenente una breve sequenza murina, è stato precocemente interrotto proprio a causa del riscontro di livelli elevati di anticorpi anti-farmaco, con conseguente progressiva riduzione dell'effetto ipolipemizzante nel tempo e una maggiore incidenza di reazioni avverse nel sito di iniezione<sup>(250)</sup>. Al contrario, alirocumab ed evolocumab sono completamente umani e, infatti, solo pochissimi casi di anticorpi anti-farmaco sono stati riportati, ma a basso titolo e non associati a variazioni significative farmacocinetiche, farmacodinamiche o cliniche. In considerazione della notevole efficacia ipolipemizzante di questa nuova arma terapeutica, iniziale materia di discussione è stata la possibilità di un'eventuale tossicità da livelli troppo bassi di LDL. Da analisi aggregate dei dati degli studi di Fase 2 e 3 emerge che il 37% dei pazienti in terapia con alirocumab ed il 26% dei pazienti in terapia con evolocumab raggiungevano livelli di LDL minori di 25 mg/dL; inoltre nel 9.4% dei pazienti trattati con alirocumab è stato riportato un valore di LDL minore di 15 mg/dL. Tali valori, estremamente bassi, non sono mai stati associati

a reazioni avverse di rilievo od alterazioni metaboliche importanti, confermando quanto ampiamente dimostrato da studi genetici e mendeliani, che non hanno mai evidenziato un valore di soglia al di sotto del quale la riduzione di LDL possa essere ritenuta dannosa.

## **Ruolo degli inibitori di PCSK9 nella gestione clinica dell'ipercolesterolemia**

Nel 2019 ESC/EAS<sup>(10)</sup> hanno rilasciato le nuove Linee Guida per la gestione delle dislipidemie, che hanno “rivisitato” la definizione delle categorie di rischio CV ed identificato nuovi *target* terapeutici per ognuna di esse. La *task force* europea ha basato l'identificazione dei nuovi obiettivi terapeutici sul concetto “*the lower the better*”, enfatizzando la riduzione proporzionale del rischio di eventi CV che si associa alla riduzione assoluta di LDL, con un calo di circa un quinto del rischio per ogni decremento di 38 mg/dL di LDL. In tale ottica è stata ottimizzata anche la gestione farmacologica delle dislipidemie, riconoscendo agli inibitori di PCSK9 un ruolo notevolmente più ampio, sia in prevenzione primaria che in prevenzione secondaria. Nel paziente con valori di LDL non a *target* secondo quanto previsto per la specifica classe di rischio CV, la terapia di prima linea rimane la statina alla massima dose tollerata, con o senza l'associazione con ezetimibe in relazione ai livelli basali di colesterolemia. Secondo modelli statistici un trattamento ideale “a tappeto” con questi due farmaci garantirebbe all'80% dei pazienti con malattia CV aterosclerotica di raggiungere i livelli ottimali di LDL previsti dalle Linee Guida, tuttavia i dati derivanti dai registri indicano che il 70% circa non raggiunge tale risultato. Gli inibitori di PCSK9, che garantiscono un'ulteriore riduzione del 60% di LDL, rispondono proprio a questa necessità terapeutica e il loro uso è previsto, con diverse classi di raccomandazione, in diversi scenari clinici. Nei pazienti a rischio CV molto alto, che non raggiungono il *target* di LDL nonostante trattamento con statina alla massima dose tollerata ed ezetimibe, l'aggiunta di un inibitore di PCSK9 è raccomandata in prevenzione secondaria (classe di raccomandazione I, livello di evidenza A) mentre può essere presa in considerazione in prevenzione primaria (IIb, C)<sup>(10)</sup>. Particolare attenzione è stata riservata allo scenario della recente SCA, poiché sia il FOURIER che l'ODYSSEY Outcomes hanno confermato che in questa categoria di pazienti la terapia con inibitori di PCSK9 si associa ad una riduzione del rischio assoluto di eventi ischemici del 3.7% a tre anni, con un NNT di 27, enfatizzando che peggiore è il profilo di rischio CV, maggiore è il beneficio che si ottiene<sup>(243,244)</sup>. In tal senso, nei pazienti in terapia ipolipemizzante non ottimale al momento dell'evento ischemico acuto l'algoritmo delle Linee Guida ESC/EAS<sup>(10)</sup> raccomanda una terapia con statina ad alte dosi, seguita da una rivalutazione dei livelli ematici di LDL dopo 4-6 settimane che prevede l'introduzione di ezetimibe in caso di mancato raggiungimento del *target*; se anche la terapia combinata non garantisce il raggiungimento dell'obiettivo terapeutico, dopo ulteriori 4-6 settimane l'aggiunta di un inibitore di PCSK9 è raccomandata (I, B). Tuttavia, la pratica clinica, supportata recentemente da un documento di consenso dell'EAS<sup>(126)</sup> (Figura 5), è sempre più orientata all'introduzione in prima istanza della terapia di combinazione fissa statina/ezetimibe nei pazienti nei quali è prevedibile, in relazione ai valori basali di LDL, l'impiego di entrambe le classi di farmaci, al fine di raggiungere velocemente il *target* terapeutico e di ridurre la dispersione dei pazienti dopo la dimissione ospedaliera. La possibilità di impiegare precocemente i PCSK9



**Figura 5.** Algoritmo diagnostico dell'European Atherosclerosis Society (EAS) per il trattamento dei pazienti con nota malattia CV (atherosclerotic CV disease, ASCVD) ed elevati valori di colesterolo LDL (Modificata da ref #126)

inibitori durante la fase acuta di una SCA è stata valutata nello studio EVOPACS (*EVolocumab for early reduction of LDL-cholesterol levels in Patients with Acute Coronary Syndromes*) che ha dimostrato una sostanziale riduzione di LDL con l'introduzione di evolocumab entro 72 ore in pazienti ricoverati per sindrome coronarica acuta senza alcun effetto indesiderato<sup>(251)</sup>; In questo studio ad 8 settimane dall'inizio della terapia il 90% dei pazienti raggiungeva il target di LDL  $<55$ mg/dL. Le ultime Linee Guida consigliano, nel caso di pazienti già in terapia ottimizzata al momento dell'evento acuto, di considerare un inibitore di PCSK9 subito dopo l'evento, se possibile già durante la degenza ospedaliera (IIa, C)<sup>(10)</sup>. Una delle categorie a maggior rischio di malattia CV aterosclerotica è rappresentata dai pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote (*Heterozygous Familial Hypercholesterolemia*, HeFH), che si associa ad eventi ischemici precoci (prima di 55 e 60 anni in uomini e donne, rispettivamente), con un rischio maggiore di 10 volte rispetto alla popolazione generale. In questa popolazione, laddove siano presenti anche altri fattori di rischio, come il diabete, e la terapia con statine/ezetimibe non sia sufficiente, gli inibitori di PCSK9 sono raccomandati (I, C), anche in assenza di storia CV precedente. È attualmente raccomandato dalle Linee Guida ESC/EAS che il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare inizi intorno agli 8-10 anni<sup>(10)</sup>. In questo contesto un recente studio con evolocumab ha arruolato 157 pazienti con HeFH, di età media di 13 anni e con LDL  $\geq 130$  mg/dL e TG  $\leq 400$  mg/dL, randomizzati 2:1 a evolocumab 420 mg/mese o placebo con un *endpoint* primario di variazione percentuale di LDL alla settimana 24. Lo studio ha dimostrato una riduzione percentuale di LDL rispetto al basale pari al 44.5% in evolocumab vs. 6.2% in placebo con una differenza tra gruppi del 38.3% ( $p < 0.001$ ), mantenutasi per tutta la durata del *trial*. Alla settimana 24, il 74%

dei pazienti in evolocumab ha raggiunto un valore di LDL <130 mg/dL vs. 23% del gruppo placebo, con un'efficace riduzione anche di colesterolo non-HDL e apoB ed eventi avversi sovrapponibili nei due gruppi. Più complessa è la gestione terapeutica del paziente con HoFH, in cui gli inibitori di PCSK9 hanno dimostrato un'efficacia ipolipemizzante minore, condizionata dall'espressione residua di LDLR. In questo scenario l'uso di alirocumab ed evolocumab nei soggetti *receptor-defective* o con mutazioni *gain-of function* di PCSK9 offre un approccio terapeutico aggiuntivo, ma non risolutivo, riducendo, ma non azzerando la necessità di aferesi delle LDL. Un altro sottogruppo in cui gli inibitori di PCSK9 hanno dimostrato un notevole impatto clinico sono i pazienti con arteriopatía periferica, che, in relazione al loro alto rischio ischemico di base, beneficiano di una significativa riduzione sia del rischio assoluto di morte CV, IM o *stroke* (3.5% vs. 1.4% in pazienti non affetti), sia del rischio di ischemia acuta degli arti inferiori e amputazioni. Pertanto, in questa categoria, la terapia con inibitori di PCSK9 in associazione a statina/ezetimibe, laddove il paziente non raggiunga il *target* di LDL, è raccomandata (I, A)<sup>(10)</sup>. Gli inibitori di PCSK9 offrono altresì una valida arma terapeutica nella gestione dei pazienti con intolleranza "vera" alle statine, definita come l'incapacità di tollerare la dose di farmaco necessaria per ridurre efficacemente il rischio CV, che interessa il 5-6% circa dei pazienti ed è imputata, nella maggior parte dei casi, agli eventi avversi muscolari. In questo scenario, di impatto epidemiologico rilevante, la terapia con inibitori di PCSK9 in associazione all'ezetimibe, che garantisce una riduzione di LDL del 60%, rappresenta un'ottima alternativa. Nonostante gli inibitori di PCSK9 rappresentino un'opportunità terapeutica di riconosciuta efficacia, il loro utilizzo nella pratica clinica quotidiana è ancora limitato; il tasso di penetrazione, vale a dire la percentuale dei pazienti eleggibili alla terapia ai quali viene effettivamente somministrato il farmaco, si attesta infatti attorno al 15%, principalmente per vari motivi. Il primo limite è rappresentato dall'esiguo numero di "centri prescrittori" sul territorio nazionale e sulla ridotta disponibilità di centri prescrittori sul territorio, generando la necessità di un referral verso i centri abilitati alla prescrizione fortemente limitante all'impiego di questi farmaci. Allo stesso modo il mantenimento di un registro di monitoraggio e la dispensazione sul territorio solo attraverso le farmacie territoriali rende più difficoltoso l'accesso alla terapia nella pratica clinica. Essendo noto che una riduzione del LDL di 38 mg/dL si traduce in una diminuzione del rischio relativo di eventi CV del 20% e di mortalità del 12%, con un beneficio clinico maggiore in pazienti con elevato rischio basale e valori di LDL maggiori di 100 mg/dL<sup>(252)</sup>, l'impiego di inibitori di PCSK9 appare giustificato e sostenibile nei pazienti considerati ad alto rischio di eventi CV aterosclerotici. Il recente registro OSMED 2020 pubblicato da AIFA<sup>(253)</sup> riporta una elevata aderenza al trattamento con inibitori di PCSK9, pari al 57.8% vs. 38.7% di statine in monoterapia; tale dato raggiunge per gli inibitori di PCSK9 il 78% in pazienti con 4 comorbidità rispetto al 52% per le statine. Su queste basi, le determine dell'Agenzia Italiana del Farmaco n. 172/2017 e 256/2017 hanno previsto l'utilizzo di evolocumab e alirocumab in regime di rimborsabilità nei seguenti casi:

- in prevenzione primaria in pazienti di età ≤80 anni con HeFH e LDL ≥130 mg/dL nonostante terapia da almeno 6 mesi con statina alla massima dose tollerata ed ezetimibe oppure con dimostrata intolleranza alle statine;
- in prevenzione secondaria in pazienti di età ≤80 anni con HeFH o ipercolesterolemia non familiare o dislipidemia mista con LDL ≥100 mg/dL nonostante terapia da almeno 6 mesi con statina alla massima dose tollerata ed ezetimibe oppure con dimostrata intolleranza alle statine<sup>(254)</sup>.

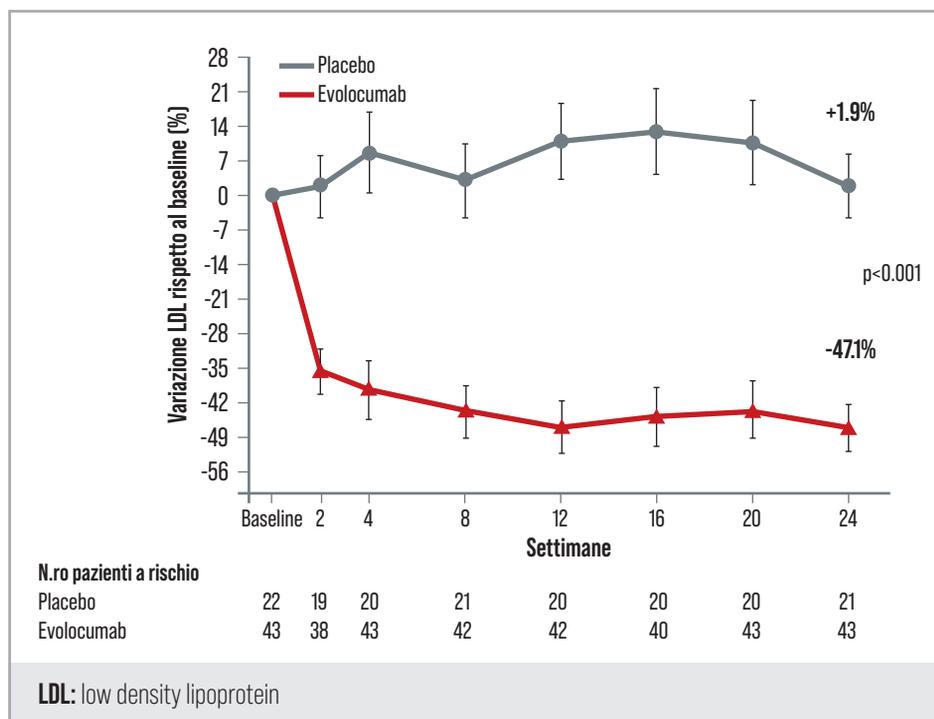
Nel 2019, per allinearsi all'approccio più aggressivo suggerito dalle ultime Linee Guida ESC/EAS, la determina AIFA 1771 ha garantito una sorta di *fast-track* per i pazienti con IM recente (entro 12 mesi) e con un'anamnesi di eventi CV multipli, in cui ad oggi è richiesta una singola valutazione del profilo lipidico che documenti livelli di LDL >100 mg/dL nonostante statina alla massima dose tollerata ed ezetimibe nei 30 giorni che precedono la data di valutazione per poter prescrivere il farmaco con rimborsabilità. Ancora più recentemente (2021), su sollecitazione delle Società Scientifiche Nazionali SIC ed ANMCO, AIFA ha ritenuto ammissibili alla rimborsabilità dei PCSK9 inibitori tutti i pazienti in prevenzione secondaria nei quali i valori di LDL restino >70 mg/dL (ovvero il valore soglia di ingresso negli studi registrativi) nonostante terapia ottimizzata con statina ed ezetimibe, aprendo un nuovo favorevole scenario alla riduzione del rischio CV residuo. Si stima che l'utilizzo di inibitori di PCSK9 in tutti i pazienti eleggibili avrebbe un impatto economico positivo che, solo per gli eventi CV evitati, ammonta a circa 20 milioni di euro a cinque anni.

## Evinacumab

Con una prevalenza di 1:300.000, l'HoFH è una delle più comuni malattie metaboliche ereditarie. È causata da mutazioni a carico dei geni codificanti per LDLR, che ne determinano la perdita o la riduzione della funzionalità, con conseguente innalzamento dei livelli di LDL ed insorgenza prematura di aterosclerosi e cardiovasculopatie. Se non trattata, l'età media del decesso è di 18 anni. In questo *setting* le comuni terapie ipolipemizzanti, che hanno come *target* i recettori per le LDL, sono poco efficaci, e infatti l'aferesi di LDL rappresenta ancora oggi lo *standard of care*. Lomitapide, mipomersen e più recentemente evinacumab hanno arricchito l'armamentario terapeutico a disposizione per il trattamento di questa patologia. Evinacumab è un anticorpo monoclonale completamente umano inibitore della proteina ANGPTL3, che ha richiamato l'attenzione della comunità scientifica quando mutazioni *loss-of-function* a suo carico sono state associate alla ipolipoproteinemia familiare combinata, caratterizzata da bassi livelli di LDL, *high density lipoproteins* (HDL) e TG e da un rischio di malattia coronarica inferiore a quello della popolazione generale del 41% circa<sup>(255)</sup>. Costituita da 431 aminoacidi e strutturalmente analoga alle angiopoietine, ANGPTL-3 viene sintetizzata quasi esclusivamente dal fegato ed è coinvolta nella regolazione del metabolismo lipidico con molteplici meccanismi. Essa inibisce sia la lipoproteina lipasi epatica sia la lipasi endoteliale; il primo enzima è deputato alla *clearance* delle VLDL e dei chilomicroni, mediante l'idrolisi dei TG da essi trasportati, mentre il secondo favorisce la *clearance* delle HDL. L'inibizione dell'azione della ANGPTL-3 si traduce, quindi, in una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di TG e HDL e, poiché le VLDL sono il precursore delle LDL, anche di queste ultime, secondo un meccanismo LDLR indipendente<sup>(255)</sup>.

L'efficacia e la sicurezza di evinacumab sono state indagate nel trial di Fase 3 randomizzato controllato con placebo ELIPSE HoFH (*Evinacumab Lipid Studies in Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia*), che ha randomizzato 65 pazienti con HoFH a ricevere evinacumab 15 mg/kg per via endovenosa o placebo, con cadenza mensile<sup>(231)</sup>. Il livello medio basale di LDL era di 255 mg/dL, nonostante i pazienti fossero già in terapia ipolipemizzante alla massima dose tollerata con statine, ezetimibe, inibitori di PCSK9 o lomitapide (94%; 75%; 77%; 25%, rispettivamente). Riguardo all'*endpoint* primario, ovvero la variazione percentuale di LDL a 24

settimane, nel gruppo trattato con evinacumab si è registrata una riduzione dei livelli di LDL del 47%, con una differenza fra i due gruppi del 49% ( $p < 0.001$ ) (Figura 6), corrispondente ad una riduzione media assoluta di 132 mg/dL. Peraltro, una riduzione significativa dei livelli plasmatici di LDL è stata osservata già dalla seconda settimana di trattamento e si è mantenuta stabile fino alla settimana 48 (fase di estensione *open-label*). È interessante notare che non sono state osservate differenze significative di efficacia in relazione al genotipo, all'espressione residua dei recettori per le LDL o alla terapia ipolipemizzante di *background*. In particolare un'analisi *post-hoc* sugli 8 pazienti *receptor-negative* (attività residua recettoriale  $< 2\%$ ) ha riportato una riduzione percentuale dei livelli di LDL del 53%, con una differenza fra i due gruppi del 72% ( $p < 0.001$ ), pari a 245 mg/dL, risultato sorprendente nella popolazione che meno di tutte risponde alle terapie attualmente disponibili e che quindi presenta un più alto rischio CV. Alla fine del periodo di trattamento solo il 7% dei pazienti necessitava ancora di aferesi. Riduzioni significative sono state osservate anche in altri *endpoint* secondari chiave, come i livelli di ApoB, colesterolo totale, HDL e TG, ridotti del 37%, 48%, 30% e 50%, rispettivamente ( $p < 0.0001$  per tutti). Nell'ambito dell'analisi di sicurezza sono stati riportati sintomi influenzali, gastroenteriti, dispepsia, prurito nel sito di iniezione ma, nel complesso, nel braccio di trattamento si sono verificate meno reazioni avverse rispetto al braccio di controllo (66% vs. 81%). In considerazione della notevole efficacia ipolipemizzante di evinacumab, un altro dei suoi potenziali ambiti di applicazione è l'ipercolesterolemia refrattaria, definita come la persistenza di valori di LDL non ottimali nonostante terapia ipolipemizzante alla massima dose tollerata con statina, ezetimibe ed inibitori di PCSK9, che agiscono, invece, aumentando l'espressione dei recettori per le LDL. Come dimostrato da uno studio di Fase 2 randomizzato controllato con placebo che ha arruolato 272 pazienti



**Figura 6.** Endpoint primario del trial ELIPSE. Variazione percentuale di LDL rispetto al basale in evinacumab vs. placebo (Modificata da ref #231)

con ipercolesterolemia refrattaria, l'associazione di evinacumab, somministrato per via sottocutanea una volta alla settimana o per via endovenosa una volta al mese, alla terapia ipolipemizzante di *background*, produce una riduzione significativa del LDL del 50% circa ( $p < 0.001$ ), con un effetto evidente già alla seconda settimana di trattamento e poi stabile fino al quarto mese, in assenza di reazioni avverse di rilievo<sup>(256)</sup>. Evinacumab potrebbe quindi essere la risposta all'*unmet need* ancora inevaso dei pazienti con livelli di LDL elevati nonostante terapia ottimizzata non solo con statine ed ezetimibe ma anche con inibitori di PCSK9, che da dati di registro costituiscono circa il 60% della popolazione ad alto rischio CV, così come dei pazienti che non hanno i criteri per accedere al trattamento con inibitori di PCSK9. L'azione ipolipemizzante di evinacumab non si esaurisce nella sola riduzione del colesterolo, infatti, come dimostrato in due studi di Fase 1 che hanno arruolato pazienti con ipertrigliceridemia, la terapia con evinacumab si associa anche ad una riduzione dose-dipendente dei livelli plasmatici di TG (fino all'83%)<sup>(257)</sup>. Poiché elevati livelli di TG sono riconosciuti come un fattore di rischio CV indipendente, tale azione potrebbe tradursi in un'ulteriore riduzione del rischio di malattia aterosclerotica. Evinacumab, con la sua azione ipolipemizzante LDLR indipendente, rappresenta quindi una strategia terapeutica innovativa e promettente per il paziente con ipercolesterolemia familiare omozigote, ipercolesterolemia refrattaria od ipertrigliceridemia. Tuttavia, ad oggi, rimangono delle aree grigie da indagare: *in primis* non sono stati condotti studi di *outcome* per cui non è ancora noto il potenziale effetto del farmaco sugli eventi avversi CV; in secondo luogo, in considerazione dell'esiguo numero di pazienti arruolati nei *trials* sopraccitati e della breve durata degli stessi, non è possibile valutare in maniera esaustiva il profilo di sicurezza e tollerabilità di tale terapia. La necessità di somministrazione endovenosa in ambiente medico, che potrebbe inficiare la *compliance* del paziente, non è tuttavia di grande rilievo nello scenario dei pazienti affetti da HoFH, che necessitano di terapie ben più invasive, come l'aferesi di LDL. Nel febbraio 2021, sulla scia dei risultati del trial ELIPSE, l'FDA ha approvato l'uso di evinacumab come *add-on therapy* in pazienti con più di dodici anni affetti da ipercolesterolemia familiare omozigote, già in trattamento con ipolipemizzanti. Contemporaneamente il Comitato per i medicinali per uso umano dell'EMA ha espresso parere positivo, ma il farmaco non è ancora disponibile in Europa.

Negli ultimi dieci anni, grazie ad una fervente ricerca nell'ambito della biologia dei lipidi e delle lipoproteine, l'armamentario terapeutico ipolipemizzante si è arricchito di nuove opzioni farmacologiche. Fra queste, gli anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9 e di ANGPTL-3 sono un'arma estremamente efficace e promettente, soprattutto per i pazienti ad alto rischio CV, intolleranti alle statine o con ipercolesterolemia familiare, che rappresentano tradizionalmente le categorie in cui le soluzioni attuali, per quanto consolidate, si associano a percentuali rilevanti di insuccesso terapeutico.



# Oligonucleotidi antisenso e RNA interfering

C11

Ciro Indolfi, Carmen Spaccarotella, Antonio Curcio

## Introduzione

Le statine sono raccomandate come “*first-line therapy*” nel trattamento delle dislipidemie <sup>(10,258)</sup>; tuttavia, la loro efficacia terapeutica nel ridurre la quota di *low density lipoproteins* (LDL) è controbilanciata dalla stimolazione della produzione di *proprotein convertasi subtilisina-kexina* di tipo 9 (PCSK9) <sup>(259)</sup>, una proteina di origine epatica che riduce l'attività del recettore delle LDL, rendendone difficile la *clearance* dal torrente ematico. A tal proposito, il ruolo terapeutico degli inibitori di PCSK9 <sup>(260)</sup> in alcuni scenari clinici, quali i pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare (soprattutto in omozigosi) che presentano elevati livelli di colesterolo LDL, rimane insufficiente; in aggiunta, il ruolo di nuove particelle aterogene nel processo aterosclerotico <sup>(261)</sup>, tra cui la lipoproteina a (Lp(a)) <sup>(262)</sup>, l'apolipoproteina a (apo[a]) <sup>(263)</sup> e le lipoproteine ricche in trigliceridi <sup>(264)</sup>, hanno spinto la ricerca scientifica e tecnologica verso un *target* un tempo considerato non aggredibile, cioè l'RNA messaggero (mRNA). La terapia genica selettiva ha attraversato numerose difficoltà per giungere alla fattibilità attuale: i meccanismi di controllo usati per regolare l'espressione dei geni umani, infatti, sono molto più complessi di quelli usati dagli altri organismi <sup>(265)</sup> e ciò ha richiesto diversi *step* per il trattamento di svariate patologie ereditarie, arrivando ad ottimi risultati per quanto riguarda il trattamento delle dislipidemie <sup>(266)</sup>.

Ad oggi possiamo quindi considerare il *targeting* dell'mRNA dei geni che codificano per i principali costituenti delle particelle aterogene, in particolare PCSK9, apoCIII, apo[a], ed *angiopoietin-like 3* (ANGPTL-3) come nuovo approccio terapeutico per la riduzione del rischio cardiovascolare (CV).

Dal punto di vista molecolare, l'utilizzo di una sequenza oligonucleotidica “antisenso” capace di ibridizzarsi con uno specifico mRNA *target* (“senso”), rende quest'ultimo non disponibile per la traduzione nella proteina corrispondente e ne induce la degradazione tramite specifiche nucleasi <sup>(267)</sup>. Ciò rappresenta il “silenzamento genico”, un processo post-trascrizionale di controllo dell'espressione, e si realizza mediante oligonucleotidi antisenso (antisense oligonucleotides, ASO) oppure *small interfering RNA* (siRNA, Figura 1).

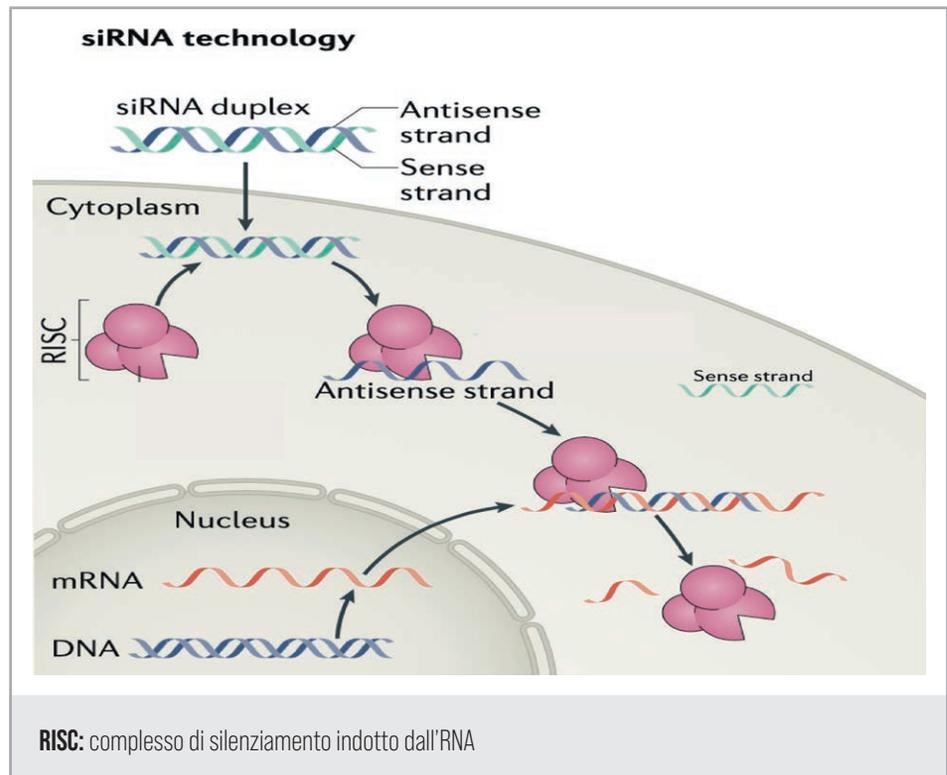


Figura 1. Processo di silenziamento genico attraverso la tecnologia small interfering RNA (siRNA)

## Gli oligonucleotidi antisenso

Gli ASO sono singoli filamenti sintetici di acidi nucleici (tipicamente lunghi 5-25 nucleotidi) progettati per formare ibridi con trascritti *target* che hanno sequenze complementari, secondo l'appaiamento di basi classico di Watson-Crick. Gli ASO sono usati per controllare l'espressione genica mediante un meccanismo di "degradazione" che coinvolge la RNasi H1, un'endoribonucleasi che si lega preferenzialmente all'eteroduplex DNA-RNA a partenza dagli omoduplex RNA-RNA e DNA-DNA<sup>(267)</sup>. Pertanto, l'ibridazione di un determinato ASO a formare il "gapmer ASO" mima l'appaiamento DNA-RNA, che porta all'attivazione della RNasi H1 che idrolizza selettivamente il filamento di RNA del *duplex* ASO-RNA. Il risultato finale è la scissione selettiva del filamento di RNA mentre il DNA sintetico rimane intatto e libero di legare ulteriori mRNA bersaglio. Gli ASO possono anche agire attraverso meccanismi diversi dalla "degradazione" appaiandosi con l'mRNA bersaglio ma, data la struttura, non avviando la degradazione diretta dell'mRNA<sup>(268)</sup>.

L'uso terapeutico degli ASO, tuttavia, ha richiesto una serie di modifiche chimiche al fine di migliorarne la stabilità, la resistenza alle nucleasi, la biodisponibilità e la capacità di raggiungere un preciso compartimento cellulare. Negli ASO di "prima generazione", l'aggiunta di un estremo fosforotioato era la modifica più utilizzata; la sostituzione dell'ossigeno fosfodiesterico con zolfo ha ridotto l'idrofilicità degli ASO, ha migliorato la loro resistenza all'attività nucleasica e ha conferito benefici farmacocinetici, *in primis* un aumento del legame alle proteine plasmatiche, con il risultato netto di minore *clearance* renale e quindi prolungamento dell'emivita. Tuttavia, la capacità di interagire con le proteine plasmatiche ha portato a diversi effetti collaterali, tipici degli ASO di prima generazione, come l'attivazione del complemento, l'inibizione della

via intrinseca della coagulazione e la stimolazione della risposta immunitaria da cui derivava aumentata incidenza di glomerulonefrite e vasculite. Nel tentativo di superare questi effetti collaterali, negli “ASO di seconda generazione” la posizione 2'-idrossile del residuo glicidico è stata implementata con tre nuovi residui: 2'-O-metil (2'-OMe), 2'-O-metossietile (2'-MOE), e 2'-fluoro (2'-F). Queste modifiche hanno conferito agli ASO un'elevata resistenza alla nucleasi, una maggiore affinità di legame al bersaglio mRNA, minore tossicità e una migliorata lipofilità, in particolare favorendo la permeazione del doppio strato lipidico e aumentando l'emivita plasmatica. D'altra parte, l'introduzione di modificazioni chimiche negli ASO spesso interferisce con la loro capacità di indurre RNasi H1, una limitazione superata dall'aggiunta di un nucleo centrale di fosforotioato, affiancato da catene resistenti alla nucleasi costituite da 2'-O-Me o '-oligonucleotidi MOE.

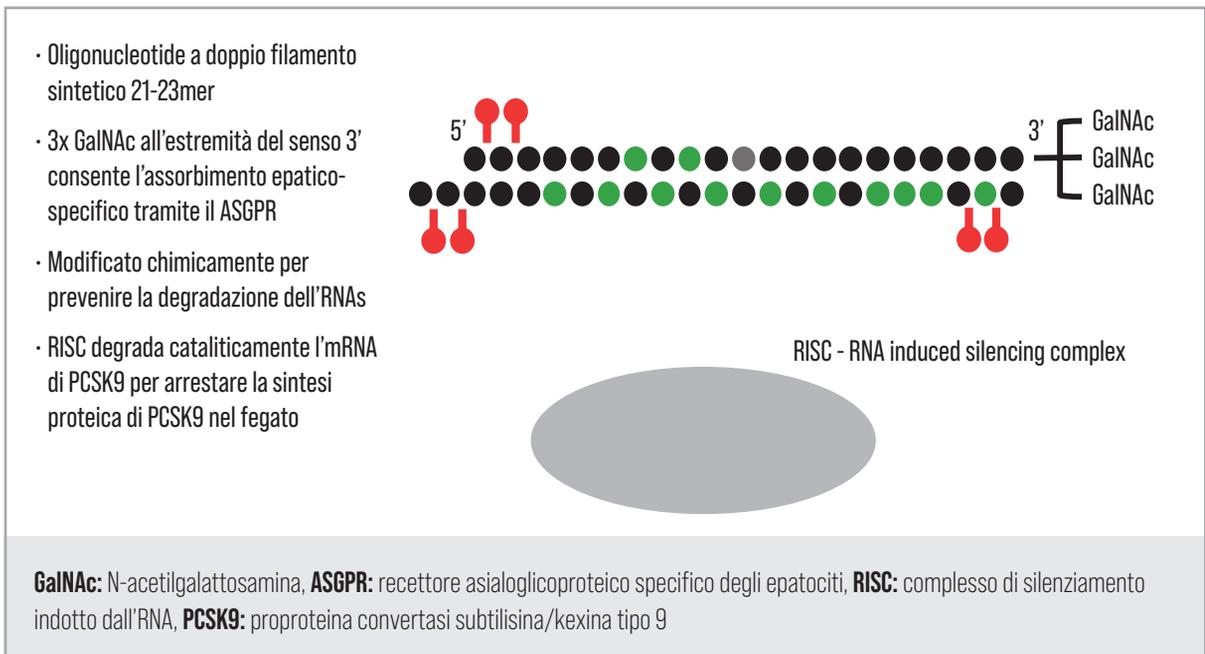
Queste modifiche chimiche influiscono anche sulle proprietà farmacocinetiche degli ASO. Dose e frequenza di somministrazione variano da una volta alla settimana a una volta ogni 4 mesi con una biodisponibilità del 50-100%. Dopo la iniezione sottocutanea, le concentrazioni plasmatiche di picco vengono raggiunte entro 3-4 ore con una rapida clearance plasmatica a causa della rapida distribuzione tissutale e della lenta clearance dai tessuti.

L'emivita terminale di eliminazione è lunga, cioè da 2 settimane a 6 mesi. Inoltre, poiché gli ASO sono metabolizzati dalle nucleasi cellulari e non dal sistema del citocromo P450, possono essere co-somministrati con agenti terapeutici tradizionali con differenti modalità di azione.

Poiché gli ASO mostrano tipicamente un'ampia distribuzione e gli organi con la distribuzione più alta sono il rene e il fegato, la tendenza era di sviluppare ASO principalmente per il trattamento delle dislipidemie dovute a difetto di sintesi nel fegato. Tra queste strategie, la coniugazione con tre antenne di N-acetilgalattosamina (GalNAc) è stata la più utilizzata nel trattamento delle iperlipoproteinemie. GalNAc si lega al recettore asialoglicoproteico specifico degli epatociti (ASGPR) con elevata affinità. L'ASGPR riconosce un'ampia varietà di ligandi contenenti galattosio terminale o residui di GalNAc. Questo legame si verifica a livello dei sinusoidi, dove vi sono circa 500.000 recettori per cellula epatocitica. Una volta interiorizzato, il complesso viene dissociato, consentendo all'ASGPR di tornare alla membrana e all'ASO di essere rilasciato nel compartimento intracellulare.

## RNA interfering

L'RNA *interfering* (RNAi), noto anche come silenziamento genico post-trascrizionale <sup>(269)</sup>, è un procedimento biologico che consente la distruzione di un mRNA in risposta all'RNA a doppio filamento (dsRNA). La reazione di partenza per giungere a RNAi è la scissione di lunghe molecole di dsRNA in piccoli frammenti di siRNA, lunghi 21-23 basi, operata da un tipo di ribonucleasi (RNasi) III, denominato DICER <sup>(270)</sup>. Pertanto, i siRNA sintetici, agiscono silenziando specifici geni bersaglio, nello specifico mimando la struttura dei prodotti del DICER. I siRNA sono composti da due filamenti: il filamento “guida”, contenente le informazioni per il riconoscimento del gene *target*, ed il filamento “passeggero” che supporta il legame stechiometrico per essere caricato nel RISC (complesso di silenziamento indotto dall'RNA, Figura 2). Una volta nel citoplasma, i due filamenti vengono separati: quello “guida” viene caricato nel RISC e quello “passeggero” viene rimosso e degradato. RISC utilizza l'RNA



**Figura 2.** Inibizione della sintesi di PCSK9 tramite siRNA

guida per trovare sequenze di mRNA complementari tramite l'appaiamento di basi secondo Watson-Crick. Allorquando l'mRNA bersaglio complementare si ibridizza con parte del filamento guida, avviene una scissione endonucleasica innescata dalla proteina Argonante 2 (Ago2) uno dei componenti di RISC, a cui appartengono oltre appunto ad Ago2 che ha capacità enzimatiche, anche proteine non catalitiche (Ago1, Ago3 e Ago4). La scissione dell'mRNA avviene tra i nucleotidi 10 e 11 sul filamento antisense complementare, rispetto all'estremità 5'. Nonostante la promettente efficacia dei siRNA, l'applicazione farmacologica ha richiesto modifiche e/o formulazioni chimiche per aumentare la stabilità, ridurre l'immunogenicità e favorire il rilascio ai tessuti bersaglio<sup>(271)</sup>. I siRNA nudi subiscono la degradazione da parte delle nucleasi plasmatiche o vengono filtrati dal glomerulo con una rapida *clearance* renale che porta ad una breve emivita, cioè da 15 min a 1 ora<sup>(272)</sup>. Per migliorare la stabilità, le modifiche più utilizzate sono: la posizione 2' dell'anello glicidico che include 2'-OMe, 2'-F, 2'-MOE<sup>(273)</sup>; l'introduzione di estremità di fosforotioato al posto di legami fosfodiesteri. L'ottimizzazione del rilascio di siRNA consiste nel migliorare il *targeting* tissutale e l'assorbimento cellulare, ad esempio coniugando siRNA a ligandi che promuovono l'assorbimento da parte delle cellule bersaglio. Una svolta nella somministrazione vettore-mediata è stata lo sviluppo del siRNA coniugato con GalNAc, che ha come *target* il recettore ASGPR negli epatociti. Dopo la somministrazione, l'assorbimento è rapido con un'emivita di eliminazione dagli epatociti di diverse settimane. Un'altra strategia che favorisce l'assorbimento epatico di siRNA è stata la coniugazione con molecole lipofile che consente l'assorbimento di siRNA da parte degli epatociti. La bioconiugazione con colesterolo e acidi grassi migliora l'assorbimento della specificità tissutale tramite il recettore LDL e protegge i siRNA dall'attività della nucleasi. Il miglioramento della terapia con siRNA passa attraverso alcune implementazioni, quali: la prevenzione della *clearance* renale, ottenuta mediante l'uso di nanoparticelle con un diametro superiore a 20 nm che impedisce la filtrazione renale; la modifica della carica negativa di siRNA, una caratteristica che non consente a queste molecole

idrofiliiche di permeare la superficie cellulare caricata appunto negativamente<sup>(274)</sup>, la ridotta degradazione ad opera dei lisosomi per fusione con lipidi cationici; infine, le interazioni non specifiche con proteine del siero e cellule non bersaglio. A tal proposito, rivestendo siRNA con il polimero idrofilico polietilenglicole, è possibile ridurre al minimo la captazione da parte dei macrofagi, le interazioni aspecifiche ed il trigger immunitario. Per quanto riguarda il profilo di sicurezza, i siRNA possono causare effetti pleiotropici silenziando geni non intenzionali che hanno una parziale omologia con i geni *target*; possono inoltre indurre un'attivazione non specifica del sistema immunitario innato mediata o meno dai recettori 3/7/8 *Toll-like*. Quest'ultimo punto sembra essere stato sopravanzato grazie all'uso di vettori di nanoparticelle in grado di proteggere il siRNA dall'interazione con i recettori *Toll-like*, prevenendo possibili tossicità immuno-mediate.

## Inclisiran: un siRNA diretto contro PCSK9

Inclisiran, un siRNA diretto contro PCSK9 è stato valutato ed è in corso di valutazione nel programma ORION, composto al momento da 14 studi di Fase 1, 2 e 3, che hanno investigato e continuano a valutare il ruolo del farmaco in termini di farmacocinetica, efficacia su riduzione del colesterolo LDL ed efficacia a lungo termine sulla prevenzione degli eventi CV (Tabella 1). A differenza degli anticorpi

**Tabella 1.** Trials del programma ORION su inclisiran

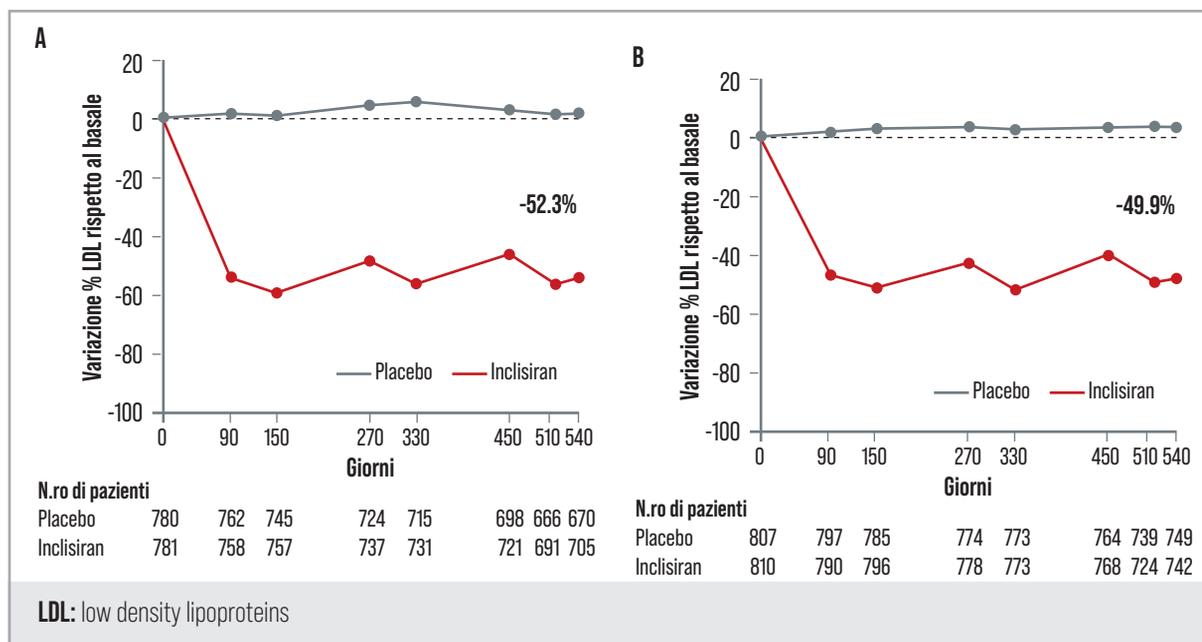
	Fase clinica	Arruolamento (n)	Popolazione	Follow-up	Endpoint primario
ORION-1	2	501	ASCVD o ASCVD-RE	180 giorni	Riduzione LDL
ORION-2	2	4	HoFH	180 giorni	Riduzione LDL
ORION-3	2	374 Ongoing, in fase di follow-up	ASCVD o ASCVD-RE	48 mesi	Riduzione LDL
ORION-4	3	15.000 (stimati) Ongoing, in fase di arruolamento	ASCVD	60 mesi	MACE
ORION-5	3	56 Ongoing, in fase di follow-up	HoFH	24 mesi	Riduzione LDL
ORION-6	1	28	Danno epatico	180 giorni	Farmacocinetica
ORION-7	1	31	Danno renale	60 giorni	Farmacocinetica
ORION-8	3	2991 Ongoing, in fase di follow-up	ASCVD o ASCVD-RE o HeFH/HoFH	36 mesi	Riduzione LDL
ORION-9	3	482	HeFH	18 mesi	Riduzione LDL
ORION-10	3	1561	ASCVD	18 mesi	Riduzione LDL
ORION-11	3	1617	ASCVD o ASCVD-RE	18 mesi	Riduzione LDL
ORION-12	1	48	Volontari sani	180	Effetti ECG e QT
ORION-13	3	15 (stimati) Ongoing, in fase di arruolamento	Adolescenti con HoFH	12 mesi double-blind 12 mesi open-label	Riduzione LDL
ORION-16	3	150 (stimati) Ongoing, in fase di arruolamento	Adolescenti con HeFH	12 mesi double-blind 12 mesi open-label	Riduzione LDL

**ASCVD:** atherosclerotic cardiovascular disease, **ASCVD-RE:** ASCVD-risk equivalent, **LDL:** low density lipoproteins,

**HoFH:** ipercolesterolemia familiare omozigote, **MACE:** major adverse CV events, **HeFH:** ipercolesterolemia familiare eterozigote

che legano la proteina extracellulare, sottraendola all'interazione con il recettore LDL, inclisiran penetra negli epatociti bloccando la traduzione dell'mRNA; in questo modo è sufficiente una singola molecola di siRNA per inibire più molecole di PCSK9. È stato stabilito che l'evento chiave che dà inizio all'aterogenesi è la ritenzione di LDL e delle altre apolipoproteine prima descritte all'interno della parete arteriosa. Gli studi clinici hanno indicato che più bassi sono i valori di LDL raggiunti, minore è il rischio di futuri eventi CV, senza limiti inferiori per i valori di LDL o l'effetto della curva a "J". Inoltre, gli studi sulla sicurezza clinica di valori di LDL molto bassi si sono dimostrati rassicuranti, sebbene sia necessario un monitoraggio per periodi più lunghi<sup>(275)</sup>.

Negli studi di Fase 1 e 2, inclisiran ha ridotto il colesterolo LDL fino al 50% in modo dose-dipendente e con un'efficacia che si raggiunge a partire già dopo le prime due settimane di trattamento, così come ha ridotto *high density lipoproteins* (HDL) e apolipoproteina B. Successivamente, è stato testato in due studi di Fase 3, in pazienti con colesterolo LDL elevato (NCT03399370 e NCT03400800)<sup>(276)</sup>. Il programma ORION ha studiato pazienti con malattia CV aterosclerotica (*trial* ORION-10) e pazienti con malattia aterosclerotica o una caratteristica rischio-equivalente di malattia CV aterosclerotica (*trial* ORION-11)<sup>(275)</sup>, ovvero diabete, ipercolesterolemia familiare o un rischio di eventi CV a 10 anni  $\geq 20\%$  secondo il *Framingham Risk Score for Cardiovascular Disease*, con livelli elevati di colesterolo LDL nonostante terapia con statine alla dose massima tollerata. I pazienti sono stati randomizzati in un rapporto 1:1 a ricevere inclisiran (284 mg) o placebo, somministrato per iniezione sottocutanea il giorno 1, il giorno 90 e successivamente ogni 6 mesi per 540 giorni. Il *co-primary endpoint* in ogni studio era la variazione percentuale, rispetto al placebo, del livello di LDL dal basale al giorno 510 e la variazione percentuale *time-adjusted* del livello di LDL dal basale al giorno 90 e fino al giorno 540. Gli studi ORION-10 e ORION-11<sup>(275)</sup> hanno randomizzato 1561 e 1617 pazienti con livelli medi di LDL al basale di 104.7 $\pm$ 38.3 mg/dL e 105.5 $\pm$ 39.1 mg/dL, rispettivamente. Inclisiran ha ridotto al giorno 510 il colesterolo LDL del 52.3% in ORION-10 e del 49.9% in ORION-11 (Figura 3) ( $p < 0.001$  per tutti i confronti



**Figura 3.** Effetto di inclisiran sui livelli di LDL negli studi ORION-10 (A) e ORION-11 (B) (Modificata da ref #275)

rispetto al placebo), con corrispondenti riduzioni *time-adjusted* del 53.8% e 49.2%, rispettivamente ( $p < 0.001$  per tutti i confronti rispetto al placebo). Inclisiran ha, inoltre determinato una significativa riduzione di colesterolo totale, non-HDL e apoB ( $p < 0.001$  per tutti in entrambi i *trials*), considerati *key secondary endpoints*. Gli eventi avversi e le alterazioni dei parametri di laboratorio sono stati simili nei gruppi inclisiran e placebo in entrambi gli studi e di entità da lieve a moderata. Gli eventi avversi nel sito di iniezione, generalmente lievi e transitori, siano stati più frequenti con inclisiran rispetto al placebo (2.6% vs. 0.9% in ORION-10 e 4.7% vs. 0.5% in ORION-11).

Un'analisi *post-hoc* del *trial* ORION-11 presentata al congresso dell'*American College of Cardiology 2020* ha analizzato gli effetti di inclisiran su un *endpoint* prespecificato esplorativo di eventi CV, dimostrando in particolare un significativo effetto del farmaco su infarto miocardico fatale e non fatale (RR 0.5, 95% CI 0.2-0.9). L'effetto di inclisiran sugli eventi CV è in corso di studio nel *trial* ORION-4 (NCT03705234), in fase di arruolamento, con un *endpoint* primario combinato di morte CV, infarto miocardico, *stroke* ischemico fatale e non fatale o rivascolarizzazione coronarica urgente. Tali risultati, se confermati, forniranno una nuova arma per il trattamento dell'ipercolesterolemia, che avrà non solo un vantaggio in termini di efficacia, ma soprattutto di maneggevolezza del trattamento in termini di dosi da assumere e verosimile migliore aderenza terapeutica.

L'ultimo decennio ha visto l'approvazione di diversi oligonucleotidi per la pratica clinica in diversi campi. In ambito cardiovascolare, l'FDA ha approvato la prima terapia a base di siRNA patisiran da utilizzare in pazienti con amiloidosi mediata da transtiretina. Il recente avvento di inclisiran sta rivoluzionando l'approccio alla terapia ipolipemizzante, mostrando come sia possibile ottenere un'importante e clinicamente significativa riduzione dell'espressione di PCSK9 con un approccio terapeutico sempre più semplificato<sup>(276)</sup>. Inclisiran è stato approvato da FDA ed EMA, ed è già disponibile in USA ed in alcuni paesi europei, con una previsione di disponibilità in Italia già a partire dal 2022.

## ASO in corso di studio

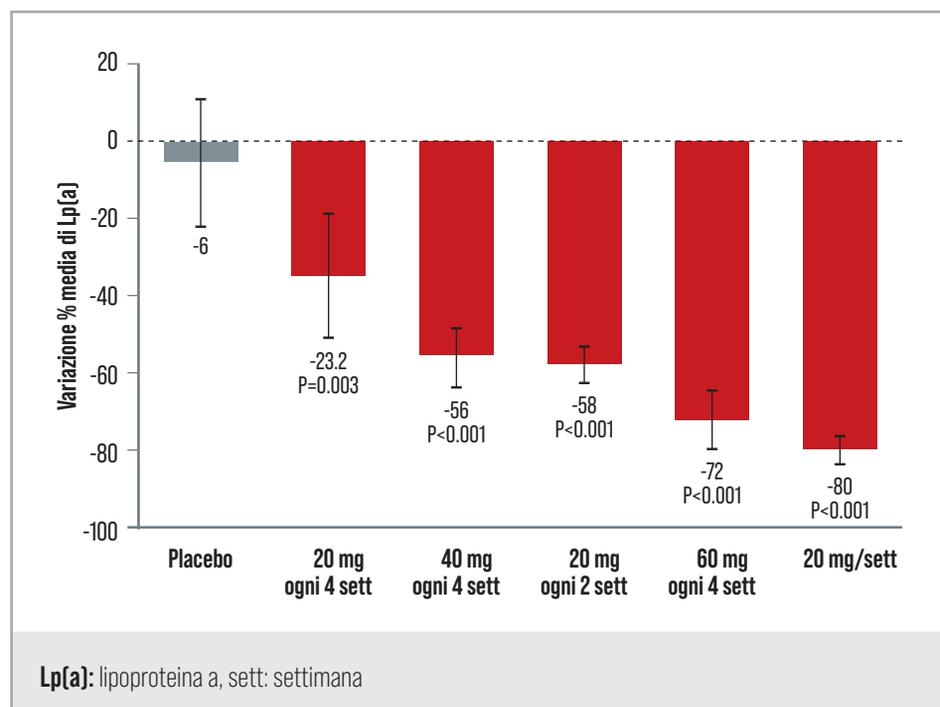
La ricerca in ambito di utilizzo di ASO per il trattamento dell'ipercolesterolemia è in rapido sviluppo ed altri due composti sono in corso di studio, che hanno come *target* PCSK9 e Lp(a).

ION449, noto anche come AZD8233, è un ASO che ha come *target* l'mRNA di PCSK9. Inibisce, quindi, la traduzione intracellulare di PCSK9 e la conseguente sintesi proteica. La somministrazione sottocutanea di AZD8233 ha dato risultati promettenti negli studi di Fase 1 in soggetti con valori basali di LDL compresi tra 100-190 mg/dL, dimostrando come una singola dose di ION449 sia responsabile di una riduzione dose-dipendente dei livelli circolanti di PCSK9 >90% e di una riduzione di circa il 70% dei livelli di LDL (NCT03593785). La Fase 2 è in corso (NCT04641299) ed a breve saranno disponibili i primi risultati, per poi passare a *head-to-head trials* con anticorpi monoclonali anti-PCSK9 e inclisiran.

TQJ230, precedentemente noto come AKCEA-APO(a)-LRx, è un ASO per somministrazione sottocutanea che ha come *target* l'mRNA della Lp(a) ed è responsabile di una riduzione dei livelli circolanti di Lp(a) in soggetti che partono da valori elevati di tale lipoproteina. Un recente studio di Fase 2 randomizzato vs. placebo<sup>(53)</sup> ha dimostrato in 286 soggetti con nota malattia CV e livelli basali di Lp(a)

pari almeno a 60 mg/dL, che il trattamento AKCEA-APO(a)-LRx è responsabile a 6 mesi di una riduzione significativa e dose-dipendente dei livelli di Lp(a) con un *range* di riduzione che varia tra il 35% e l'80% alle varie dosi utilizzate nel trial (20, 40, 60 mg ogni 4 settimane, 20 mg ogni 2 settimane o 20 mg a settimana, *vs.* 6% del gruppo in placebo; *range* di significatività tra 0.003 e <0.001) (Figura 4), ed una percentuale di pazienti che raggiunge a 6 mesi un valore di Lp(a)  $\leq 50$  mg/dL che varia dal 23% al 98% alle varie dosi utilizzate e con una parallela riduzione anche di apoB e colesterolo LDL. Il profilo di *safety* è stato sovrapponibile tra i due gruppi, ma si è osservata una maggiore occorrenza di reazioni nel sito di iniezione nel gruppo in trattamento attivo. È in corso di arruolamento uno studio di *outcome* di Fase 3 (Lp(a)HORIZON - NCT04023552) multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, che prevede una somministrazione sottocutanea mensile di TQJ230 *vs.* placebo con l'obiettivo di valutare l'efficacia del farmaco nella riduzione di eventi CV maggiori (morte CV, infarto non fatale, *stroke* non fatale, rivascolarizzazione coronarica urgente) in pazienti con storia di malattia CV aterosclerotica (storia di infarto miocardico o *stroke* di 3 mesi a 10 anni prima dello *screening* o arteriopatia periferica sintomatica) e livelli di Lp(a)  $\geq 70$  mg/dL. I primi risultati del *trial* saranno disponibili nel 2024.

In ambito di ipertrigliceridemia, volasenorsen, un ASO che ha come *target* l'mRNA dell'apolipoproteina C3 (apoC3) per somministrazione sottocutanea ha dimostrato in Fase 2 *vs.* placebo in pazienti con TG compresi tra 350-2000 mg/dL di ridurre i valori di apoC3 per una quota che va dal 40% all'80% circa ai 3 dosaggi testati (100 mg, 200 mg e 300 mg) in monoterapia e del 60% e 71% circa ai dosaggi di 200 e 300 mg, rispettivamente, in combinazione con fibrati. Parallelamente ha ridotto significativamente il valore di TG circolanti per una quota compresa tra 31% e 71% in monoterapia ai 3 dosaggi, e del 51% e 54% ai dosaggi di 200 e 300 mg, rispettivamente, in combinazione con fibrati, con un aumento di HDL che può arrivare a fino il 50% circa. Un successivo studio di



**Figura 4.** Effetto di AKCEA-APO(a)-LRx sui livelli di Lp(a) alle varie dosi utilizzate nel trial di Fase 2 (Modificata da ref #53)

outcome di Fase 3 (APPROACH trial)<sup>(277)</sup> randomizzato, in doppio cieco, ha confrontato volasensoren 300 mg una volta a settimana vs. placebo in 66 pazienti con sindrome iperchilomicronemica familiare e valore medio di TG all'ingresso pari a 2209 mg/dL dimostrando a 3 mesi una riduzione di apoC3 dell'84% (vs. +6.1% in placebo; p<0.001) e una riduzione dei TG del 77% (vs. +18% in placebo; p<0.001); tale riduzione si manteneva del 53% a 6 mesi e del 40% a 12 mesi. Il farmaco è stato recentemente approvato da AIFA per il trattamento di pazienti con sindrome iperchilomicronemica familiare.

## Conclusioni e prospettive future

Le due strategie di silenziamento genico descritte in questo capitolo, ASO e siRNA, rappresentano un'innovazione nello scenario terapeutico delle dislipidemie (Tabella 2). Le modifiche chimico-tecnologiche hanno reso le molecole di cui sopra altamente tollerate e pienamente efficaci nella grande maggioranza dei pazienti inclusi negli studi clinici.

La sicurezza, la rapida efficacia e la durata degli effetti di riduzione del colesterolo LDL di inclisiran, un piccolo RNA interferente che inibisce la sintesi di PCSK9 nel fegato, sono state ora confermate in studi clinici di Fase 3 ed a breve saranno disponibili dati sulla riduzione degli eventi CV, il che fornirà un elemento aggiuntivo di utilizzo di un nuovo trattamento altamente efficace e nel contempo di facile gestione clinica. In aggiunta, nuovi composti sono in corso di studio e nei prossimi anni nuove alternative terapeutiche si aggiungeranno all'armamentario del clinico rendendo la meta di una medicina personalizzata in ambito di dislipidemie ormai prossima.

**Tabella 2.** Confronto tra le varie tecnologie disponibili per la riduzione dei lipidi plasmatici e delle lipoproteine

Parameter	Drug technology			
	Small molecules	Antibodies	Gene silencing with antisense oligonucleotides	Gene silencing with small interfering RNA
Chemical structure	Organic compound	Protein	Single-stranded RNA	Double-stranded RNA
Mass (kDa)	<1	~150	~12	~21
Mechanism of action	Blocks enzyme or receptor in cells	Blocks protein in plasma	Blocks gene mRNA transcripts in cell	Blocks gene mRNA transcripts in cell
Potential for off-target adverse effects	High likelihood of off-target, non-tissue-specific effects	Low, given high specificity for target	Low, given high specificity for target with third-generation agents	Low, given high specificity for target
Immunogenicity	Low	High	High	High
Efficacy	50% reduction in LDL-cholesterol levels	60% reduction in LDL-cholesterol levels	90% reduction in lipoprotein(a) levels	50% reduction in LDL-cholesterol levels
Variation of within-person drug response	High	High	Low	Low
Half-life	Days	Weeks	Months	>1 year
Administration route	Oral	Subcutaneous	Subcutaneous	Subcutaneous
Dosing frequency	Daily	Weekly to twice monthly	Monthly	Twice yearly
Targets	Proteins in ng to µg	Proteins in µg to mg	Lipoproteins in g	Lipoproteins in g



# ABBREVIAZIONI

- AA:** acido arachidonico
- ABI:** ankle-brachial index
- ACE:** enzima di conversione dell'angiotensina
- ACL:** adenosina trifosfato-citrato liasi
- ACVSL1:** very long-chain acyl-CoA synthetase-1, acil-CoA grasso sintasi 1 a lunga catena
- ADH:** autosomal dominant hypercholesterolemia, ipercolesterolemia autosomica dominante
- AG:** acidi grassi
- AGE:** advanced glycation end-product, prodotti finali di glicazione avanzata
- Ago2:** proteina Argonaute 2
- AL:** acido linoleico
- ALA:** acido alfa-linoleico
- AMPK:** chinasi attivata dall'AMP
- ANGPTL3:** angiopoietin-like protein 3
- APAO:** (diametro) antero-posteriore dell'aorta addominale infrarenale
- Apo:** apolipoproteina
- Apo(a):** apolipoproteina (a)
- ApoB:** apolipoproteina B
- Apo CIII:** apolipoproteina CIII
- ARH:** autosomal recessive hypercholesterolemia, ipercolesterolemia autosomica recessiva
- ASCVD:** atherosclerotic cardiovascular disease
- ASGPR:** recettore asialoglicoproteico specifico degli epatociti
- ASO:** antisense oligonucleotides, oligonucleotide antisenso
- AT1R:** recettore di tipo 1 dell'angiotensina II
- CAC:** Calcium Score Calculator
- CE:** esteri del colesterolo
- CETP:** cholesteryl ester transfer protein, proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo
- CHL:** combined hyperlipidemia, iperlipidemia familiare combinata
- CI:** intervallo di confidenza
- cIMT:** carotid intima-media thickness, spessore medio-intimale carotideo

**Cmax:** concentrazione plasmatica massima

**CTT:** Cholesterol Treatment Trialists

**CV:** cardiovascolare

**DHA:** acido docosaesaenoico

**DPA:** acido docosapentaenoico

**dsRNA:** RNA a doppio filamento (double strand)

**EAS:** European Atherosclerosis Society

**EGF:** fattore di crescita epidermico

**EPA:** acido eicosapentaenoico

**ESC:** European Society of Cardiology

**eNOS:** ossido nitrico sintetasi endoteliale

**FCS:** familial chylomicronemia syndrome, sindrome chilomicronemica familiare

**FDC:** fixed dose combination

**FD:** familial dysbetalipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiare

**FDB:** familial defective apolipoprotein B, apolipoproteina B familiare difettiva

**FH:** familial hypercholesterolemia, ipercolestrolemia familiare

**FMD:** flow mediated dilation

**FOXO1:** forkhead box-O transcription factor O1

**GalNAc:** N-acetilgalattosamina

**GWAS:** genome-wide association study

**GPIHBP1:** glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1

**HDL:** high density lipoproteins

**HeFH:** heterozygous familial hypercholesterolemia, ipercolesterolemia familiare eterozigote

**HMGCoA:** idrossimetilglutaril-coenzima A

**HNF4A:** hepatic nuclear factor-4-alpha

**HoFH:** homozygous familial hypercholesterolemia, ipercolesterolemia familiar omozigote

**HR:** hazard ratio

**ICAM1:** molecola di adesione intercellulare di tipo 1

**IDL:** intermediate density lipoproteins

**IGF-1:** fattore di crescita insulino simile

**IM:** infarto del miocardio

**INF $\gamma$ :** interferone gamma

**IPE:** icosapent etile

**IVUS:** Intravascular ultrasound, ecografia intravascolare

**LCAT:** lecitina: colesterolo aciltransferasi

**LDL:** low density lipoproteins, lipoproteine a bassa densità

**LDLR:** recettore per le LDL

**LMFI:** lipase maturation factor 1

**LOX-1:** LDL recettore ossidato di tipo lectina 1

**Lp(a):** lipoproteina (a)

**LPL:** lipoproteinlipasi

**Lp-PLA2:** fosfolipasi A2 lipoproteina-associata

**MAPK:** proteinchinasi attivata dal mitogeno

**MCP-1:** proteina chemotattica per i monociti 1

**MCS:** multifactorial chylomicronemia syndrome, sindrome chilomicronemica multifattoriale

**MDTC:** TC multidetector

**MMP:** metalloproteinasi di matrice

**MTP:** microsomal triglyceride transfer protein, proteina di trasferimento microsomiale dei trigliceridi

**NGS:** next generation sequencing

**NO:** ossido nitrico

**NPC1L1:** Niemann-Pick C1-Like 1

**NNT:** number needed to treat

**OATP-C:** organic anion transporting polypeptide-C, peptide di trasporto degli anioni organici

**OM3EE:** omega-3 fatty acid ethyl esters, omega-3 a base di esteri etilici di acidi grassi a catena lunga

**OM3CA:** omega-3 carboxylic acids, omega-3 a base di formulazione carbossilica

**OR:** odds ratio

**PCR:** proteina C-reattiva

**PCSK9:** proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9

**PKB:** protein chinasi B

**PDGF:** fattore di crescita derivato dalle piastrine

**PUFA:** polyunsaturated fatty acids, acidi grassi polinsaturi  
**RISC:** complesso di silenziamento indotto dall'RNA  
**RNAi:** RNA interfering  
**ROS:** reactive oxygen species, specie reattive dell'ossigeno  
**RR:** rischio relativo  
**SCA:** sindrome coronarica acuta  
**sdLDL:** small dense LDL  
**siRNA:** small interfering RNA  
**sLOX-1:** LOX-1 solubile  
**SNPs:** single nucleotide polymorphisms SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein-1c  
**sST2:** suppressor of tumorigenicity solubile  
**TCFA:** thin-cap fibroatheroma, placca ateromasica con cappuccio sottile  
**TG:** trigliceridi  
**TGF- $\beta$ :** fattore di crescita trasformante beta  
**TRL:** trygliceride-rich lipoproteins, lipoproteine ricche in trigliceridi  
**VCAM1:** molecola di adesione alle cellule vascolari di tipo 1  
**VEGF:** fattore di crescita vascolare endoteliale  
**VLDL:** very low densisty lipoproteins

# BIBLIOGRAFIA

1. Ballantyne C. Clinical lipidology: a companion to Braunwald's heart disease. Elsevier;2009.
2. Dashti N. Synthesis and secretion of nascent lipoprotein particles. *Prog Lipid Res.* 1991;30(2-3):219-30. doi: 10.1016/0163-7827(91)90018-z. PMID: 1668560.
3. Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis.* 2000 Jan;148(1):1-15. doi: 10.1016/s0021-9150(99)00397-4. PMID: 10580165.
4. Hamilton RL, Wong JS, Cham CM, Nielsen LB, Young SG. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J Lipid Res.* 1998 Aug;39(8):1543-57. PMID: 9717714.
5. Bensadoun A. Lipoprotein lipase. *Annu Rev Nutr.* 1991;11:217-37. doi: 10.1146/annurev.nu.11.070191.001245. PMID: 1892699.
6. Duvillard L, Caslake MJ, Petit JM, Vergès B, Gamber P, Packard CJ. Distinct patterns of heparin affinity chromatography VLDL1 and VLDL2 subfractions in the different dyslipidaemias. *Atherosclerosis.* 2008 Jul;199(1):27-33. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.026. Epub 2008 Jan 4. PMID: 18177876.
7. Lauer ME, Graff-Meyer A, Rufer AC, Maugeais C, von der Mark E, Matile H, D'Arcy B, Magg C, Ringler P, Müller SA, Scherer S, Dernick G, Thoma R, Hennig M, Niesor EJ, Stahlberg H. Cholesteryl ester transfer between lipoproteins does not require a ternary tunnel complex with CETP. *J Struct Biol.* 2016 May;194(2):191-8. doi: 10.1016/j.jsb.2016.02.016. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26876146.
8. Johansen RF, Søndergaard E, Sørensen LP, Jurik AG, Christiansen JS, Nielsen S. Basal and insulin-regulated VLDL1 and VLDL2 kinetics in men with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2016 Apr;59(4):833-43. doi: 10.1007/s00125-015-3856-5. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26781548.
9. Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, Daemen MJ, Demer LL, Hegele RA, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, Watts GF, Bruckert E, Fazio S, Ference BA, Graham I, Horton JD, Landmesser U, Laufs U, Masana L, Pasterkamp G, Raal FJ, Ray KK, Schunkert H, Taskinen MR, van de Sluis B, Wiklund O, Tokgozogl L, Catapano AL, Ginsberg HN. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2020 Jun 21;41(24):2313-2330. doi: 10.1093/eurheartj/ehz962. PMID: 32052833; PMCID: PMC7308544.
10. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozogl L, Wiklund O; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 Jan 1;41(1):111-188. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455. Erratum in: *Eur Heart J.* 2020 Nov 21;41(44):4255. PMID: 31504418.9.10.Mach F, et al., 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020. 41(1): p. 111-188.
11. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007 Oct 16;116(16):1832-44. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890. PMID: 17938300.
12. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):317-25. doi: 10.1038/nature10146. PMID: 21593864.
13. Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, Castro Cabezas M, Chapman MJ, Couture P, de Graaf J, Durrington PN, Faergeman O, Frohlich J, Furberg CD, Gagne C, Haffner SM, Humphries SE,

Jungner I, Krauss RM, Kwiterovich P, Marcovina S, Packard CJ, Pearson TA, Reddy KS, Rosenson R, Sarrafzadegan N, Sniderman AD, Stalenhoef AF, Stein E, Talmud PJ, Tonkin AM, Walldius G, Williams KM. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J Intern Med.* 2006 Mar;259(3):247-58. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01616.x. PMID: 16476102.

14. Thompson JR, Minelli C, Abrams KR, Tobin MD, Riley RD. Meta-analysis of genetic studies using Mendelian randomization--a multivariate approach. *Stat Med.* 2005 Jul 30;24(14):2241-54. doi: 10.1002/sim.2100. PMID: 15887296.
15. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, Ginsberg HN, Chapman MJ, Packard CJ, Laufs U, Oliver-Williams C, Wood AM, Butterworth AS, Di Angelantonio E, Danesh J, Nicholls SJ, Bhatt DL, Sabatine MS, Catapano AL. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA.* 2019 Jan 29;321(4):364-373. doi: 10.1001/jama.2018.20045. PMID: 30694319; PMCID: PMC6439767.
16. Varbo A, Benn M, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a cause of ischemic heart disease: evidence, definition, measurement, atherogenicity, high risk patients, and present and future treatment. *Pharmacol Ther.* 2014 Mar;141(3):358-67. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.11.008. Epub 2013 Nov 26. PMID: 24287311.
17. Chen SH, Habib G, Yang CY, Gu ZW, Lee BR, Weng SA, Silberman SR, Cai SJ, Deslypere JP, Rosseneu M, et al. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science.* 1987 Oct 16;238(4825):363-6. doi: 10.1126/science.3659919. PMID: 3659919.
18. Alonso R, Andres E, Mata N, Fuentes-Jiménez F, Badimón L, López-Miranda J, Padró T, Muñoz O, Díaz-Díaz JL, Mauri M, Ordovás JM, Mata P; SAFEHEART Investigators. Lipoprotein(a) levels in familial hypercholesterolemia: an important predictor of cardiovascular disease independent of the type of LDL receptor mutation. *J Am Coll Cardiol.* 2014 May 20;63(19):1982-9. doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.063. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24632281.
19. McCormick SPA, Schneider WJ. Lipoprotein(a) catabolism: a case of multiple receptors. *Pathology.* 2019 Feb;51(2):155-164. doi: 10.1016/j.pathol.2018.11.003. Epub 2018 Dec 27. PMID: 30595508.
20. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1986;128:417-31. doi: 10.1016/0076-6879(86)28084-2. PMID: 3724517.
21. Rye KA, Barter PJ. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res.* 2014 Jan 3;114(1):143-56. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300632. PMID: 24385508.
22. Favari E, Calabresi L, Adorni MP, Jessup W, Simonelli S, Franceschini G, Bernini F. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry.* 2009 Nov 24;48(46):11067-74. doi: 10.1021/bi901564g. PMID: 19839639.
23. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol.* 2010 Jun;21(3):229-38. doi: 10.1097/mol.0b013e328338472d. PMID: 20480549; PMCID: PMC3215082.
24. Kuvin JT, Rämets ME, Patel AR, Pandian NG, Mendelsohn ME, Karas RH. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am Heart J.* 2002 Jul;144(1):165-72. doi: 10.1067/mhj.2002.123145. PMID: 12094204.
25. Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Oct 1;23(10):1724-31. doi: 10.1161/01.ATV.0000094961.74697.54. Epub 2003 Sep 11. PMID: 12969988.
26. Tall AR, Rader DJ. Trials and Tribulations of CETP Inhibitors. *Circ Res.* 2018 Jan 5;122(1):106-112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311978. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29018035; PMCID: PMC5756107.
27. Aversa M. Le dislipidemie genetiche. IL progetto LIPIGEN. *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi.* 2011;2(1): p. 9.

28. Ballantyne C. *Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease 2nd Edition*. 2014: Saunders
29. Hegele RA, Borén J, Ginsberg HN, Arca M, Averna M, Binder CJ, Calabresi L, Chapman MJ, Cuchel M, von Eckardstein A, Frikke-Schmidt R, Gaudet D, Hovingh GK, Kronenberg F, Lütjohann D, Parhofer KG, Raal FJ, Ray KK, Remaley AT, Stock JK, Stroes ES, Tokgözoğlu L, Catapano AL. Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: a European Atherosclerosis Society task force consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020 Jan;8(1):50-67. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30264-5. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31582260.
30. 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 May 18;292(5520):1394-8. doi: 10.1126/science.1060458. Epub 2001 Apr 26. PMID: 11326085.
31. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009 Feb;10(2):109-21. doi: 10.1038/nrg2481. Epub 2009 Jan 13. PMID: 19139765.
32. Pearson GJ, Thanassoulis G, Anderson TJ, Barry AR, Couture P, Dayan N, Francis GA, Genest J, Grégoire J, Grover SA, Gupta M, Hegele RA, Lau D, Leiter LA, Leung AA, Lonn E, Mancini GBJ, Manjoo P, McPherson R, Ngui D, Piché ME, Poirier P, Sievenpiper J, Stone J, Ward R, Wray W. 2021 Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in Adults. *Can J Cardiol*. 2021 Aug;37(8):1129-1150. doi: 10.1016/j.cjca.2021.03.016. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33781847.
33. Ballantyne C. Valutazione Clinica delle Cause Genetiche e Secondarie di Dislipidemia, in *Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease 2nd Edition*. 2014, Saunders
34. Pang J, Chan DC, Barrett PH, Watts GF. Postprandial dyslipidaemia and diabetes: mechanistic and therapeutic aspects. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Aug;23(4):303-9. doi: 10.1097/MOL.0b013e328354c790. PMID: 22595742.
35. Pontremoli R, Bellizzi V, Bianchi S, Bigazzi R, Cernaro V, Del Vecchio L, De Nicola L, Leoncini G, Mallamaci F, Zoccali C, Buemi M. Management of dyslipidaemia in patients with chronic kidney disease: a position paper endorsed by the Italian Society of Nephrology. *J Nephrol*. 2020 Jun;33(3):417-430. doi: 10.1007/s40620-020-00707-2. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32065354; PMCID: PMC7220980.
36. Stone NJ, Grundy SM. The 2018 AHA/ACC/Multi-Society Cholesterol guidelines: Looking at past, present and future. *Prog Cardiovasc Dis*. 2019 Sep-Oct;62(5):375-383. doi: 10.1016/j.pcad.2019.11.005. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31733217.
37. Pirillo A, Casula M, Olmastroni E, Norata GD, Catapano AL. Global epidemiology of dyslipidaemias. *Nat Rev Cardiol*. 2021 Oct;18(10):689-700. doi: 10.1038/s41569-021-00541-4. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33833450.
38. Nordestgaard BG, Langlois MR, Langsted A, Chapman MJ, Aakre KM, Baum H, Borén J, Bruckert E, Catapano A, Cobbaert C, Collinson P, Descamps OS, Duff CJ, von Eckardstein A, Hammerer-Lercher A, Kamstrup PR, Kolovou G, Kronenberg F, Mora S, Pulkki K, Remaley AT, Rifai N, Ros E, Stankovic S, Stavljenic-Rukavina A, Sypniewska G, Watts GF, Wiklund O, Laitinen P; European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Joint Consensus Initiative. Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: Consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Atherosclerosis*. 2020 Feb;294:46-61. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.12.005. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31928713.
39. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017 Aug 21;38(32):2459-2472. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144. PMID: 28444290; PMCID: PMC5837225.

40. Karagiannis AD, Mehta A, Dhindsa DS, Virani SS, Orringer CE, Blumenthal RS, Stone NJ, Sperling LS. How low is safe? The frontier of very low (<30 mg/dL) LDL cholesterol. *Eur Heart J*. 2021 Jun 7;42(22):2154-2169. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa1080. PMID: 33463677.
41. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, Neeland IJ, Yuhanna IS, Rader DR, de Lemos JA, Shaul PW. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2014 Dec 18;371(25):2383-93. doi: 10.1056/NEJMoa1409065. Epub 2014 Nov 18. PMID: 25404125; PMCID: PMC4308988.
42. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012 Aug 11;380(9841):572-80. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60312-2. Epub 2012 May 17. Erratum in: *Lancet*. 2012 Aug 11;380(9841):564. PMID: 22607825; PMCID: PMC3419820.
43. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur Heart J*. 2017 Aug 21;38(32):2478-2486. doi: 10.1093/eurheartj/ehx163. PMID: 28419274.
44. Nicholls SJ, Andrews J, Kastelein JJP, Merkely B, Nissen SE, Ray KK, Schwartz GG, Worthley SG, Keyserling C, Dasseux JL, Griffith L, Kim SW, Janssan A, Di Giovanni G, Pisaniello AD, Scherer DJ, Psaltis PJ, Butters J. Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre- High-Density Lipoprotein Mimetic, on Coronary Atherosclerosis in Patients Following Acute Coronary Syndromes in the CER-001 Atherosclerosis Regression Acute Coronary Syndrome Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*. 2018 Sep 1;3(9):815-822. doi: 10.1001/jamacardio.2018.2121. PMID: 30046828; PMCID: PMC6233644.
45. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jan 29;61(4):427-436. doi: 10.1016/j.jacc.2012.08.1026. Epub 2012 Dec 19. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2019 Mar 5;73(8):987-988. PMID: 23265341.
46. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, West AS, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2013 Jun;34(24):1826-33. doi: 10.1093/eurheartj/ehs431. Epub 2012 Dec 17. PMID: 23248205.
47. Varbo A, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol and risk of ischemic stroke in 112,512 individuals from the general population. *Ann Neurol*. 2019 Apr;85(4):550-559. doi: 10.1002/ana.25432. Epub 2019 Mar 3. PMID: 30723955.
48. Varbo A, Freiberg JJ, Nordestgaard BG. Extreme nonfasting remnant cholesterol vs extreme LDL cholesterol as contributors to cardiovascular disease and all-cause mortality in 90000 individuals from the general population. *Clin Chem*. 2015 Mar;61(3):533-43. doi: 10.1373/clinchem.2014.234146. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25605681.
49. Langsted A, Nordestgaard BG. Genetics of Lipoprotein(a): Cardiovascular Disease and Future Therapy. *Curr Atheroscler Rep*. 2021 Jun 20;23(8):46. doi: 10.1007/s11883-021-00937-0. PMID: 34148150.
50. Wei WQ, Li X, Feng Q, Kubo M, Kullo IJ, Peissig PL, Karlson EW, Jarvik GP, Lee MTM, Shang N, Larson EA, Edwards T, Shaffer CM, Mosley JD, Maeda S, Horikoshi M, Ritchie M, Williams MS, Larson EB, Crosslin DR, Bland ST, Pacheco JA, Rasmussen-Torvik LJ, Cronkite D, Hripcsak G, Cox NJ, Wilke RA, Stein CM, Rotter JI, Momozawa Y, Roden DM, Krauss RM, Denny JC. LPA Variants Are Associated With Residual Cardiovascular Risk in Patients Receiving Statins. *Circulation*. 2018 Oct 23;138(17):1839-1849. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031356. PMID: 29703846; PMCID: PMC6202211.
51. Burgess S, Ference BA, Staley JR, Freitag DF, Mason AM, Nielsen SF, Willeit P, Young R, Surendran P, Karthikeyan S, Bolton TR, Peters JE, Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Benn M, Langsted A, Schnohr P, Vedel-Krogh S, Kobylecki CJ, Ford I, Packard C, Trompet S, Jukema JW, Sattar N, Di Angelantonio E, Saleheen D, Howson JMM, Nordestgaard BG, Butterworth AS, Danesh J; European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition–Cardiovascular Disease (EPIC-CVD) Consortium. Association of LPA Variants With Risk of Coronary Disease and the Implications for Lipoprotein(a)-Lowering Therapies: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol*. 2018 Jul 1;3(7):619-627. doi: 10.1001/jamacardio.2018.1470. PMID: 29926099; PMCID: PMC6481553.

52. Lamina C, Kronenberg F; Lp(a)-GWAS-Consortium. Estimation of the Required Lipoprotein(a)-Lowering Therapeutic Effect Size for Reduction in Coronary Heart Disease Outcomes: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA Cardiol.* 2019 Jun 1;4(6):575-579. doi: 10.1001/jamacardio.2019.1041. PMID: 31017618; PMCID: PMC6487909.
53. Tsimikas S, Karwatowska-Prokopczuk E, Gouni-Berthold I, Tardif JC, Baum SJ, Steinhagen-Thiessen E, Shapiro MD, Stroes ES, Moriarty PM, Nordestgaard BG, Xia S, Guerriero J, Viney NJ, O'Dea L, Witztum JL; AKCEA-APO(a)-LRx Study Investigators. Lipoprotein(a) Reduction in Persons with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2020 Jan 16;382(3):244-255. doi: 10.1056/NEJMoa1905239. Epub 2020 Jan 1. PMID: 31893580.
54. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med.* 1964 Sep;37:402-7. doi: 10.1016/0002-9343(64)90196-2. PMID: 14209286.
55. Brown MS, Goldstein JL. Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell.* 1976 Dec;9(4 PT 2):663-74. doi: 10.1016/0092-8674(76)90130-6. PMID: 189940.
56. Tada H, Nohara A, Kawashiri MA. Monogenic, polygenic, and oligogenic familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol.* 2019 Aug;30(4):300-306. doi: 10.1097/QCO.0000000000000563. PMID: 31290811.
57. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, Wiklund O, Hegele RA, Raal FJ, Defesche JC, Wiegman A, Santos RD, Watts GF, Parhofer KG, Hovingh GK, Kovanen PT, Boileau C, Averna M, Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Kuivenhoven JA, Pajukanta P, Ray K, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Tybjærg-Hansen A; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 2013 Dec;34(45):3478-90a. doi: 10.1093/eurheartj/ehd273. Epub 2013 Aug 15. Erratum in: *Eur Heart J.* 2020 Dec 14;41(47):4517. PMID: 23956253; PMCID: PMC3844152.
58. Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, Ahmad ZS, Ahmed CD, Ballantyne CM, Baum SJ, Bourbon M, Carrié A, Cuchel M, de Ferranti SD, Defesche JC, Freiburger T, Hershberger RE, Hovingh GK, Karayan L, Kastelein JJP, Kindt I, Lane SR, Leigh SE, Linton MF, Mata P, Neal WA, Nordestgaard BG, Santos RD, Harada-Shiba M, Sijbrands EJ, Stitzel NO, Yamashita S, Wilemon KA, Ledbetter DH, Rader DJ; Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Aug 7;72(6):662-680. doi: 10.1016/j.jacc.2018.05.044. PMID: 30071997.
59. Baass A, Paquette M, Bernard S, Hegele RA. Familial chylomicronemia syndrome: an under-recognized cause of severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med.* 2020 Apr;287(4):340-348. doi: 10.1111/joim.13016. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31840878.
60. Hegele RA, Berberich AJ, Ban MR, Wang J, Digenio A, Alexander VJ, D'Erasmus L, Arca M, Jones A, Bruckert E, Stroes ES, Bergeron J, Civeira F, Witztum JL, Gaudet D. Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J Clin Lipidol.* 2018 Jul-Aug;12(4):920-927.e4. doi: 10.1016/j.jacl.2018.03.093. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29748148.
61. Hegele RA, Borén J, Ginsberg HN, Arca M, Averna M, Binder CJ, Calabresi L, Chapman MJ, Cuchel M, von Eckardstein A, Frikke-Schmidt R, Gaudet D, Hovingh GK, Kronenberg F, Lütjohann D, Parhofer KG, Raal FJ, Ray KK, Remaley AT, Stock JK, Stroes ES, Tokgozöglü L, Catapano AL. Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: a European Atherosclerosis Society task force consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020 Jan;8(1):50-67. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30264-5. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31582260.
62. Paquette M, Bernard S, Blank D, Paré G, Baass A. A simplified diagnosis algorithm for dysbetalipoproteinemia. *J Clin Lipidol.* 2020 Jul-Aug;14(4):431-437. doi: 10.1016/j.jacl.2020.06.004. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32631794.
63. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 1973 Jul;52(7):1544-68. doi: 10.1172/JCI107332. PMID: 4718953; PMCID: PMC302426.

64. Berg K. A new serum type system in man--the Ld system. *Vox Sang.* 1965 Sep-Oct;10(5):513-27. doi: 10.1111/j.1423-0410.1965.tb01404.x. PMID: 4955857.
65. Jawi MM, Frohlich J, Chan SY. Lipoprotein(a) the Insurgent: A New Insight into the Structure, Function, Metabolism, Pathogenicity, and Medications Affecting Lipoprotein(a) Molecule. *J Lipids.* 2020 Feb 1;2020:3491764. doi: 10.1155/2020/3491764. PMID: 32099678; PMCID: PMC7016456.
66. Noto D, Barbagallo CM, Cavera G, Caldarella R, Marino G, Pace A, Notarbartolo A, Averna MR. Lipoprotein(A) levels and apoprotein(a) phenotypes in a Sicilian population. *Ann Ital Med Int.* 1998 Oct-Dec;13(4):205-8. PMID: 10400464.
67. Nordestgaard BG, Langsted A. Lipoprotein (a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology. *J Lipid Res.* 2016 Nov;57(11):1953-1975. doi: 10.1194/jlr.R071233. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27677946; PMCID: PMC5087876.
68. Youssef A, Clark JR, Koschinsky ML, Boffa MB. Lipoprotein(a): Expanding our knowledge of aortic valve narrowing. *Trends Cardiovasc Med.* 2021 Jul;31(5):305-311. doi: 10.1016/j.tcm.2020.06.001. Epub 2020 Jun 7. PMID: 32525013.
69. Tsimikas S, Stroes ESG. The dedicated "Lp(a) clinic": A concept whose time has arrived? *Atherosclerosis.* 2020 May;300:1-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.03.003. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32234580.
70. Verweij SL, de Ronde MWJ, Verbeek R, Boekholdt SM, Planken RN, Stroes ESG, Pinto-Sietsma SJ. Elevated lipoprotein(a) levels are associated with coronary artery calcium scores in asymptomatic individuals with a family history of premature atherosclerotic cardiovascular disease. *J Clin Lipidol.* 2018 May-Jun;12(3):597-603.e1. doi: 10.1016/j.jacl.2018.02.007. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29550494.
71. Wilson DP, Koschinsky ML, Moriarty PM. Expert position statements: comparison of recommendations for the care of adults and youth with elevated lipoprotein(a). *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2021 Apr 1;28(2):159-173. doi: 10.1097/MED.0000000000000624. PMID: 33534258.
72. Khera AV, Won HH, Peloso GM, Lawson KS, Bartz TM, Deng X, van Leeuwen EM, Natarajan P, Emdin CA, Bick AG, Morrison AC, Brody JA, Gupta N, Nomura A, Kessler T, Duga S, Bis JC, van Duijn CM, Cupples LA, Psaty B, Rader DJ, Danesh J, Schunkert H, McPherson R, Farrall M, Watkins H, Lander E, Wilson JG, Correa A, Boerwinkle E, Merlini PA, Ardissino D, Saleheen D, Gabriel S, Kathiresan S. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Jun 7;67(22):2578-89. doi: 10.1016/j.jacc.2016.03.520. Epub 2016 Apr 3. PMID: 27050191; PMCID: PMC5405769.
73. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, Harrison SC, Li K, Drenos F, Karpe F, Neil HA, Descamps OS, Langenberg C, Lench N, Kivimaki M, Whittaker J, Hingorani AD, Kumari M, Humphries SE. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet.* 2013 Apr 13;381(9874):1293-301. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62127-8. Epub 2013 Feb 22. PMID: 23433573.
74. Averna M. Severe hypercholesterolemia: epidemiology, genetics and clinical management. *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi* 2019;10(2):48-62.
75. Virchow R. *Cellular Pathology.* London, John Churchill; 1858.
76. Anichkov NN. Experimental arteriosclerosis in animals. In Cowdry EV, editor. *Arteriosclerosis: A Survey of the Problem.* New York, MacMillan Publishing; 1933:271-322.
77. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26. doi: 10.1056/NEJM199901143400207. PMID: 9887164.
78. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Oct;70(10):2804-8. doi: 10.1073/pnas.70.10.2804. PMID: 4355366; PMCID: PMC427113.

79. Hansson GK. Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy. *Circulation*. 2017 Nov 14;136(20):1875-1877. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030484. Epub 2017 Sep 15. PMID: 28916641.
80. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res*. 2006 Jan;69(1):36-45. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.09.006. Epub 2005 Dec 1. PMID: 16324688.
81. Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO. *Malattie del cuore di Braunwald. Trattato di medicina cardiovascolare. Decima edizione.* Edra; 2016.
82. Kattoor AJ, Goel A, Mehta JL. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Jul 11;8(7):218. doi: 10.3390/antiox8070218. PMID: 31336709; PMCID: PMC6680802.
83. Hu C, Dandapat A, Sun L, Chen J, Marwali MR, Romeo F, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1 deletion decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor knockout mice fed a high-cholesterol diet. *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 15;79(2):287-93. doi: 10.1093/cvr/cvn110. Epub 2008 May 3. PMID: 18453637.
84. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*. 2000 Oct 17;102(16):1970-6. doi: 10.1161/01.cir.102.16.1970. PMID: 11034947.
85. Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K, Suzuki H, Takeya M, Schnackenberg L, Beger R, Hermonat PL, Thomas M, Sawamura T. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res*. 2007 Jun 8;100(11):1634-42. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.149724. Epub 2007 May 3. PMID: 17478727.
86. Li D, Williams V, Liu L, Chen H, Sawamura T, Romeo F, Mehta JL. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Mar 19;41(6):1048-55. doi: 10.1016/s0735-1097(02)02966-2. PMID: 12651056.
87. Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type I receptor activation. *Circ Res*. 1999 May 14;84(9):1043-9. doi: 10.1161/01.res.84.9.1043. PMID: 10325241.
88. Campbell LA, Puolakkainen M, Lee A, Rosenfeld ME, Garrigues HJ, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells. *Microbes Infect*. 2012 Jan;14(1):43-9. doi: 10.1016/j.micinf.2011.08.003. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21911078; PMCID: PMC3247659.
89. Rizzacasa B, Morini E, Pucci S, Murdocca M, Novelli G, Amati F. LOX-1 and Its Splice Variants: A New Challenge for Atherosclerosis and Cancer-Targeted Therapies. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 29;18(2):290. doi: 10.3390/ijms18020290. PMID: 28146073; PMCID: PMC5343826.
90. Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Aug;302(2):601-5. doi: 10.1124/jpet.102.034959. PMID: 12130721.
91. Mehta JL, Li DY, Chen HJ, Joseph J, Romeo F. Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Dec 14;289(4):857-61. doi: 10.1006/bbrc.2001.6070. PMID: 11735125.
92. Amati F, Diano L, Vecchione L, Norata GD, Koyama Y, Cutuli L, Catapano AL, Romeo F, Ando H, Novelli G. LOX-1 Inhibition in ApoE KO Mice Using a Schizophyllan-based Antisense Oligonucleotide Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012 Dec 4;1(12):e58. doi: 10.1038/mtna.2012.45. PMID: 23212297; PMCID: PMC3528301.
93. Pothineni NVK, Karathanasis SK, Ding Z, Arulandu A, Varughese KI, Mehta JL. LOX-1 in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia: Biology, Genetics, and Modulation. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jun 6;69(22):2759-2768. doi: 10.1016/j.jacc.2017.04.010. PMID: 28571642.

94. Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, Liu S, Mehta JL. Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2012 Jan 29. doi: 10.1007/s11883-012-0228-1. Epub ahead of print. PMID: 22286193.
95. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10;392(10159):1736-1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7. Epub 2018 Nov 8. Erratum in: *Lancet*. 2019 Jun 22;393(10190):e44. Erratum in: *Lancet*. 2018 Nov 17;392(10160):2170. PMID: 30496103; PMCID: PMC6227606.
96. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, Collet JP, Czerny M, De Carlo M, Debus S, Espinola-Klein C, Kahan T, Kownator S, Mazzolai L, Naylor AR, Roffi M, Röther J, Sprynger M, Tendera M, Tepe G, Venermo M, Vlachopoulos C, Desormais I; ESC Scientific Document Group. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018 Mar 1;39(9):763-816. doi: 10.1093/eurheartj/ehx095. PMID: 28886620.
97. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1177-8. doi: 10.1161/01.atv.20.5.1177. PMID: 10807728.
98. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 1996 Oct 15;94(8):2013-20. doi: 10.1161/01.cir.94.8.2013. PMID: 8873680.
99. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013 May 23;368(21):2004-13. doi: 10.1056/NEJMra1216063. PMID: 23697515.
100. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1262-75. doi: 10.1161/01.atv.20.5.1262. PMID: 10807742.
101. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003 Dec 11;349(24):2316-25. doi: 10.1056/NEJMoa035655. PMID: 14668457.
102. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*. 1996 Apr 1;93(7):1354-63. doi: 10.1161/01.cir.93.7.1354. PMID: 8641024.
103. Corrado D, Basso C, Poletti A, Angelini A, Valente M, Thiene G. Sudden death in the young. Is acute coronary thrombosis the major precipitating factor? *Circulation*. 1994 Nov;90(5):2315-23. doi: 10.1161/01.cir.90.5.2315. PMID: 7955189.
104. Rizzo S, Coen M, Sakic A, De Gaspari M, Thiene G, Gabbiani G, Basso C, Bochaton-Piallat ML. Sudden coronary death in the young: Evidence of contractile phenotype of smooth muscle cells in the culprit atherosclerotic plaque. *Int J Cardiol*. 2018 Aug 1;264:1-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.02.096. PMID: 29776555.
105. Zaric B, Obradovic M, Trpkovic A, Banach M, Mikhailidis DP, Isenovic ER. Endothelial Dysfunction in Dyslipidaemia: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Curr Med Chem*. 2020;27(7):1021-1040. doi: 10.2174/0929867326666190903112146. PMID: 31480995.
106. Ciccone MM, Bilianou E, Balbarini A, Gesualdo M, Ghiadoni L, Metra M, Palmiero P, Pedrinelli R, Salvetti M, Scicchitano P, Zito A, Novo S, Mattioli AV. Task force on: 'Early markers of atherosclerosis: influence of age and sex'. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2013 Oct;14(10):757-66. doi: 10.2459/JCM.0b013e328362078d. PMID: 24335886.

107. Scicchitano P, Cameli M, Maiello M, Modesti PA, Muiesan ML, Novo S, Palmiero P, Saba PS, Pedrinelli R, Ciccone MM. Nutraceuticals and dyslipidaemia: Beyond the common therapeutics. *Journal of Functional Foods*. 2014;6:11-32.
108. Skálén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):750-4. doi: 10.1038/nature00804. PMID: 12066187.
109. Masoura C, Pitsavos C, Aznaouridis K, Skoumas I, Vlachopoulos C, Stefanadis C. Arterial endothelial function and wall thickness in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia and the effect of statins. A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2011 Jan;214(1):129-38. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.008. Epub 2010 Oct 15. PMID: 21074770.
110. Ye Y, Zhao X, Zhai G, Guo L, Tian Z, Zhang S. Effect of high-dose statin versus low-dose statin plus ezetimibe on endothelial function: a meta-analysis of randomized trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012 Dec;17(4):357-65. doi: 10.1177/1074248412449384. Epub 2012 Jun 18. PMID: 22710021.
111. Cortese F, Gesualdo M, Cortese A, Carbonara S, Devito F, Zito A, Ricci G, Scicchitano P, Ciccone MM. Rosuvastatin: Beyond the cholesterol-lowering effect. *Pharmacol Res*. 2016 May;107:1-18. doi: 10.1016/j.phrs.2016.02.012. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26930419.
112. Geng Y, Liu Y, Chen Y, Zhang Z, Wang L, Li X, Xia B, Song B, Zhang H. Association of LDLc to HDLc ratio with carotid plaques in a community-based population with a high stroke risk: A cross-sectional study in China. *Clin Biochem*. 2021 Feb;88:43-48. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2020.11.001. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33242435.
113. Pan J, Liu J, Wang H, Li W, Du X, Lin Q, Zhang X, Qi D, Tu J, Ning X, Yang Q, Wang J. Association of Carotid Atherosclerosis With Lipid Components in Asymptomatic Low-Income Chinese: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Front Neurol*. 2020 Apr 24;11:276. doi: 10.3389/fneur.2020.00276. PMID: 32390928; PMCID: PMC7193094.
114. Ciccone MM, Scicchitano P, Zito A, Agati L, Gesualdo M, Mandolesi S, Carbonara R, Ciciarello F, Fedele F. Correlation between coronary artery disease severity, left ventricular mass index and carotid intima media thickness, assessed by radio-frequency. *Cardiovasc Ultrasound*. 2011 Nov 16;9:32. doi: 10.1186/1476-7120-9-32. PMID: 22087814; PMCID: PMC3256115.
115. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, Azen SP. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med*. 1998 Feb 15;128(4):262-9. doi: 10.7326/0003-4819-128-4-199802150-00002. PMID: 9471928.
116. Nair SB, Malik R, Khattar RS. Carotid intima-media thickness: ultrasound measurement, prognostic value and role in clinical practice. *Postgrad Med J*. 2012 Dec;88(1046):694-9. doi: 10.1136/postgradmedj-2011-130214. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22761324.
117. Jordanova SP, Kedev S, Spirova DP, Stojanovska L, Bosevski M. The Role of Carotid Stenosis in a Prediction of Prognosis of Coronary Artery Disease. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2021 Apr 23;42(1):53-66. doi: 10.2478/prilozi-2021-0004. PMID: 33894121.
118. Ciccone MM, Marzullo A, Mizio D, Angiletta D, Cortese F, Scicchitano P, Carbonara S, Ricci G, Regina G, Caruso G, Favale S. Can carotid plaque histology selectively predict the risk of an acute coronary syndrome? *Int Heart J*. 2011;52(2):72-7. doi: 10.1536/ihj.52.72. PMID: 21483163.
119. Ciccone MM, Cortese F, Gesualdo M, Riccardi R, Di Nunzio D, Moncelli M, Iacoviello M, Scicchitano P. A novel cardiac bio-marker: ST2: a review. *Molecules*. 2013 Dec 11;18(12):15314-28. doi: 10.3390/molecules181215314. PMID: 24335613; PMCID: PMC6270545.
120. Marzullo A, Ambrosi F, Inchingolo M, Manca F, Devito F, Angiletta D, Zito A, Scicchitano P, Ciccone MM. ST2L Transmembrane Receptor Expression: An Immunochemical Study on Endarterectomy Samples. *PLoS One*. 2016 May 25;11(5):e0156315. doi: 10.1371/journal.pone.0156315. PMID: 27223112; PMCID: PMC4880330.
121. Zhang Y, Fan Z, Liu H, Ma J, Zhang M. Correlation of plasma soluble suppression of tumorigenicity-2 level with the severity and stability of coronary atherosclerosis. *Coron Artery Dis*. 2020 Nov;31(7):628-635. doi: 10.1097/MCA.0000000000000851. PMID: 32040025.

122. Stojkovic S, Demyanets S, Kopp CW, Hengstenberg C, Wojta J, Eichelberger B, Panzer S, Gremmel T. Association of Soluble Suppression of Tumorigenesis 2 (sST2) With Platelet Activation, Monocyte Tissue Factor and Ischemic Outcomes Following Angioplasty and Stenting. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Dec 22;7:605669. doi: 10.3389/fcvm.2020.605669. PMID: 33415128; PMCID: PMC7782352.
123. Li M, Duan L, Cai Y, Hao B, Chen J, Li H, Liu H. Prognostic value of soluble suppression of tumorigenesis-2 (sST2) for cardiovascular events in coronary artery disease patients with and without diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2021 Feb 19;20(1):49. doi: 10.1186/s12933-021-01244-3. PMID: 33608010; PMCID: PMC7896409.
124. Ben Braiek A, Chahed H, Dumont F, Abdelhak F, Hichem D, Gamra H, Baudin B. Identification of biomarker panels as predictors of severity in coronary artery disease. *J Cell Mol Med*. 2021 Feb;25(3):1518-1530. doi: 10.1111/jcmm.16244. Epub 2020 Dec 31. PMID: 33381894; PMCID: PMC7875935.
125. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation*. 1998 Jun 23;97(24):2433-44. doi: 10.1161/01.cir.97.24.2433. PMID: 9641696.
126. Aversa M, Banach M, Bruckert E, Drexel H, Farnier M, Gaita D, Magni P, März W, Masana L, Mello E Silva A, Reiner Z, Ros E, Vrablik M, Zambon A, Zamorano JL, Stock JK, Tokgözoğlu LS, Catapano AL. Practical guidance for combination lipid-modifying therapy in high- and very-high-risk patients: A statement from a European Atherosclerosis Society Task Force. *Atherosclerosis*. 2021 May;325:99-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.039. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33892925.
127. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1267-78. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67394-1. Epub 2005 Sep 27. Erratum in: *Lancet*. 2005 Oct 15-21;366(9494):1358. Erratum in: *Lancet*. 2008 Jun 21;371(9630):2084. PMID: 16214597.
128. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, Braun LT, de Ferranti S, Faiella-Tommasino J, Forman DE, Goldberg R, Heidenreich PA, Hlatky MA, Jones DW, Lloyd-Jones D, Lopez-Pajares N, Ndumele CE, Orringer CE, Peralta CA, Saseen JJ, Smith SC Jr, Sperling L, Virani SS, Yeboah J. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 Jun 18;139(25):e1082-e1143. doi: 10.1161/CIR.0000000000000625. Epub 2018 Nov 10. Erratum in: *Circulation*. 2019 Jun 18;139(25):e1182-e1186. PMID: 30586774; PMCID: PMC7403606.
129. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008 Nov 20;359(21):2195-207. doi: 10.1056/NEJMoa0807646. Epub 2008 Nov 9. PMID: 18997196.
130. Yusuf S, Bosch J, Dagenais G, Zhu J, Xavier D, Liu L, Pais P, López-Jaramillo P, Leiter LA, Dans A, Avezum A, Piegas LS, Parkhomenko A, Keltai K, Keltai M, Sliwa K, Peters RJ, Held C, Chazova I, Yusoff K, Lewis BS, Jansky P, Khunti K, Toff WD, Reid CM, Varigos J, Sanchez-Vallejo G, McKelvie R, Pogue J, Jung H, Gao P, Diaz R, Lonn E; HOPE-3 Investigators. Cholesterol Lowering in Intermediate-Risk Persons without Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2016 May 26;374(21):2021-31. doi: 10.1056/NEJMoa1600176. Epub 2016 Apr 2. PMID: 27040132.
131. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G, Pyörälä K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl*. 2004 Oct;5(3):81-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.027. PMID: 15531279.

132. Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med.* 1998 Nov 5;339(19):1349-57. doi: 10.1056/NEJM199811053391902. PMID: 9841303.
133. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med.* 1996 Oct 3;335(14):1001-9. doi: 10.1056/NEJM199610033351401. PMID: 8801446.
134. LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, Gotto AM, Greten H, Kastelein JJ, Shepherd J, Wenger NK; Treating to New Targets (TNT) Investigators. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med.* 2005 Apr 7;352(14):1425-35. doi: 10.1056/NEJMoa050461. Epub 2005 Mar 8. PMID: 15755765.
135. Pedersen TR, Faergeman O, Kastelein JJ, Olsson AG, Tikkanen MJ, Holme I, Larsen ML, Bendiksen FS, Lindahl C, Szarek M, Tsai J; Incremental Decrease in End Points Through Aggressive Lipid Lowering (IDEAL) Study Group. High-dose atorvastatin vs usual-dose simvastatin for secondary prevention after myocardial infarction: the IDEAL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005 Nov 16;294(19):2437-45.
136. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001 Apr 4;285(13):1711-8. doi: 10.1001/jama.285.13.1711. PMID: 11277825.
137. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2004 Apr 8;350(15):1495-504. doi: 10.1056/NEJMoa040583. Epub 2004 Mar 8. Erratum in: *N Engl J Med.* 2006 Feb 16;354(7):778. PMID: 15007110.
138. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN; REVERSAL Investigators. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004 Mar 3;291(9):1071-80. doi: 10.1001/jama.291.9.1071. PMID: 14996776.
139. Wiviott SD, Mohanavelu S, Raichlen JS, Cain VA, Nissen SE, Libby P. Safety and efficacy of achieving very low low-density lipoprotein cholesterol levels with rosuvastatin 40 mg daily (from the ASTEROID Study). *Am J Cardiol.* 2009 Jul 1;104(1):29-35. doi: 10.1016/j.amjcard.2009.02.040. Epub 2009 May 4. PMID: 19576317.
140. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, Seshasai SR, McMurray JJ, Freeman DJ, Jukema JW, Macfarlane PW, Packard CJ, Stott DJ, Westendorp RG, Shepherd J, Davis BR, Pressel SL, Marchioli R, Marfisi RM, Maggioni AP, Tavazzi L, Tognoni G, Kjekshus J, Pedersen TR, Cook TJ, Gotto AM, Clearfield MB, Downs JR, Nakamura H, Ohashi Y, Mizuno K, Ray KK, Ford I. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet.* 2010 Feb 27;375(9716):735-42.
141. Ouchi Y, Sasaki J, Arai H, Yokote K, Harada K, Katayama Y, Urabe T, Uchida Y, Hayashi M, Yokota N, Nishida H, Otonari T, Arai T, Sakuma I, Sakabe K, Yamamoto M, Kobayashi T, Oikawa S, Yamashita S, Rakugi H, Imai T, Tanaka S, Ohashi Y, Kuwabara M, Ito H. Ezetimibe Lipid-Lowering Trial on Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in 75 or Older (EWTOPIA 75): A Randomized, Controlled Trial. *Circulation.* 2019 Sep 17;140(12):992-1003. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039415. Epub 2019 Aug 22. PMID: 31434507.
142. Pandor A, Ara RM, Tumur I, Wilkinson AJ, Paisley S, Duenas A, Durrington PN, Chilcott J. Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2,722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Intern Med.* 2009 May;265(5):568-80. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02062.x. Epub 2008 Dec 28. PMID: 19141093.

143. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, Darius H, Lewis BS, Ophuis TO, Jukema JW, De Ferrari GM, Ruzyllo W, De Lucca P, Im K, Bohula EA, Reist C, Wiviott SD, Tershakovec AM, Musliner TA, Braunwald E, Califf RM; IMPROVE-IT Investigators. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. 2015 Jun 18;372(25):2387-97. doi: 10.1056/NEJMoa1410489. Epub 2015 Jun 3. PMID: 26039521.
144. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, Wanner C, Krane V, Cass A, Craig J, Neal B, Jiang L, Hooi LS, Levin A, Agodoa L, Gaziano M, Kasiske B, Walker R, Massy ZA, Feldt-Rasmussen B, Krairitichai U, Ophascharoensuk V, Fellström B, Holdaas H, Tesar V, Wiecek A, Grobbee D, de Zeeuw D, Grönhagen-Riska C, Dasgupta T, Lewis D, Herrington W, Mafham M, Majoni W, Wallendszus K, Grimm R, Pedersen T, Tobert J, Armitage J, Baxter A, Bray C, Chen Y, Chen Z, Hill M, Knott C, Parish S, Simpson D, Sleight P, Young A, Collins R; SHARP Investigators. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011 Jun 25;377(9784):2181-92. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60739-3. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21663949; PMCID: PMC3145073.
145. Yang YJ, Lee SH, Kim BS, Cho YK, Cho HJ, Cho KI, Kim SY, Ryu JK, Cho JM, Park JI, Park JS, Park CG, Chun WJ, Kim MA, Jin DK, Lee N, Kim BJ, Koh KK, Suh J, Lee SH, Lee BK, Oh SJ, Jin HY, Ahn Y, Lee SG, Bae JH, Park WJ, Lee SC, Lee HC, Lee J, Park C, Lee B, Jang Y. Combination Therapy of Rosuvastatin and Ezetimibe in Patients with High Cardiovascular Risk. *Clin Ther*. 2017 Jan;39(1):107-117. doi: 10.1016/j.clinthera.2016.11.014. Epub 2016 Dec 19.
146. Masuda J, Tanigawa T, Yamada T, Nishimura Y, Sasou T, Nakata T, Sawai T, Fujimoto N, Dohi K, Miyahara M, Nishikawa M, Nakamura M, Ito M. Effect of combination therapy of ezetimibe and rosuvastatin on regression of coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Int Heart J*. 2015 May 13;56(3):278-85. doi: 10.1536/ihj.14-311. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25902885.
147. Bays HE, Davidson MH, Massaad R, Flaim D, Lowe RS, Tershakovec AM, Jones-Burton C. Safety and efficacy of ezetimibe added on to rosuvastatin 5 or 10 mg versus up-titration of rosuvastatin in patients with hypercholesterolemia (the ACTE Study). *Am J Cardiol*. 2011 Aug 15;108(4):523-30. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.03.079. Epub 2011 May 17. PMID: 21596364.
148. Leiter LA, Bays H, Conard S, Bird S, Rubino J, Hanson ME, Tomassini JE, Tershakovec AM. Efficacy and safety of ezetimibe added on to atorvastatin (40 mg) compared with uptitration of atorvastatin (to 80 mg) in hypercholesterolemic patients at high risk of coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2008 Dec 1;102(11):1495-501. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.09.076. Epub 2008 Oct 23. PMID: 19026303.
149. Hong SJ, Jeong HS, Ahn JC, Cha DH, Won KH, Kim W, Cho SK, Kim SY, Yoo BS, Sung KC, Rha SW, Shin JH, Han KR, Chung WS, Hyon MS, Lee HC, Bae JH, Rhee MY, Kwan J, Jeon DW, Yoo KD, Kim HS. A Phase III, Multicenter, Randomized, Double-blind, Active Comparator Clinical Trial to Compare the Efficacy and Safety of Combination Therapy With Ezetimibe and Rosuvastatin Versus Rosuvastatin Monotherapy in Patients With Hypercholesterolemia: I-ROSETTE (Ildong Rosuvastatin & Ezetimibe for Hypercholesterolemia) Randomized Controlled Trial. *Clin Ther*. 2018 Feb;40(2):226-241.e4. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.12.018. PMID: 29402522.
150. Barkas L, Liberopoulos E, Elisaf M. Impact of compliance with antihypertensive and lipid-lowering treatment on cardiovascular risk Benefits of fixed-dose combinations. *Hellenic Journal of Atherosclerosis* 2013;4(1):31-38.
151. Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2003 Apr 5;361(9364):1149-58. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12948-0. PMID: 12686036.
152. Gupta A, Mackay J, Whitehouse A, Godec T, Collier T, Pocock S, Poulter N, Sever P. Long-term mortality after blood pressure-lowering and lipid-lowering treatment in patients with hypertension in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT) Legacy study:

- 16-year follow-up results of a randomised factorial trial. *Lancet*. 2018 Sep 29;392(10153):1127-1137. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31776-8. Epub 2018 Aug 26. Erratum in: *Lancet*. 2018 Oct 20;392(10156):1402. PMID: 30158072.
153. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The nomenclature of lipids. Recommendations, 1976. *Eur J Biochem* 1977;79:11-21.
  154. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011;155(2):117-30. doi: 10.5507/bp.2011.038. PMID: 21804620.
  155. Mozaffarian D. Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence. *Altern Ther Health Med*. 2005 May-Jun;11(3):24-30; quiz 31, 79. PMID: 15945135.
  156. Balk EM, Adams GP, Langberg V, Halladay C, Chung M, Lin L, Robertson S, Yip A, Steele D, Smith BT, Lau J, Lichtenstein AH, Trikalinos TA. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: An Updated Systematic Review. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2016 Aug;(223):1-1252. doi: 10.23970/AHRQEPERTA223. PMID: 30307737.
  157. Del Gobbo LC, Imamura F, Aslibekyan S, Marklund M, Virtanen JK, Wennberg M, Yakoob MY, Chiuve SE, Dela Cruz L, Frazier-Wood AC, Fretts AM, Guallar E, Matsumoto C, Prem K, Tanaka T, Wu JH, Zhou X, Helmer C, Ingelsson E, Yuan JM, Barberger-Gateau P, Campos H, Chaves PH, Djoussé L, Giles GG, Gómez-Aracena J, Hodge AM, Hu FB, Jansson JH, Johansson I, Khaw KT, Koh WP, Lemaitre RN, Lind L, Luben RN, Rimm EB, Risérus U, Samieri C, Franks PW, Siscovick DS, Stampfer M, Steffen LM, Steffen BT, Tsai MY, van Dam RM, Voutilainen S, Willett WC, Woodward M, Mozaffarian D; Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Fatty Acids and Outcomes Research Consortium (FORCE). -3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies. *JAMA Intern Med*. 2016 Aug 1;176(8):1155-66. doi: 10.1001/jamainternmed.2016.2925. Erratum in: *JAMA Intern Med*. 2016 Nov 1;176(11):1727-1728. Erratum in: *JAMA Intern Med*. 2016 Nov 1;176(11):1728. Erratum in: *JAMA Intern Med*. 2019 Mar 1;179(3):457. PMID: 27357102; PMCID: PMC5183535.
  158. Wu H, Xu L, Ballantyne CM. Dietary and Pharmacological Fatty Acids and Cardiovascular Health. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Apr 1;105(4):1030-45. doi: 10.1210/clinem/dgz174. PMID: 31678992; PMCID: PMC7174038.
  159. Marklund M, Wu JHY, Imamura F, Del Gobbo LC, et al.; Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Fatty Acids and Outcomes Research Consortium (FORCE). Biomarkers of Dietary Omega-6 Fatty Acids and Incident Cardiovascular Disease and Mortality. *Circulation*. 2019 May 21;139(21):2422-2436. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038908. PMID: 30971107; PMCID: PMC6582360.
  160. Wei Y, Meng Y, Li N, Wang Q, Chen L. The effects of low-ratio n-6/n-3 PUFA on biomarkers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Food Funct*. 2021 Jan 7;12(1):30-40. doi: 10.1039/d0fo01976c. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33232407.
  161. <https://ich.unesco.org/en/decisions/8.COM/8.10> consultato in data 11/06/2021
  162. Backes J, Anzalone D, Hilleman D, Catini J. The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis*. 2016 Jul 22;15(1):118. doi: 10.1186/s12944-016-0286-4. PMID: 27444154; PMCID: PMC4957330.
  163. Bays HE, Tighe AP, Sadovsky R, Davidson MH. Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008 Mar;6(3):391-409. doi: 10.1586/14779072.6.3.391. PMID: 18327998.
  164. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol*. 2006 Aug;17(4):387-93. doi: 10.1097/01.mol.0000236363.63840.16. PMID: 16832161.
  165. Wei MY, Jacobson TA. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Curr Atheroscler Rep*. 2011 Dec;13(6):474-83. doi: 10.1007/s11883-011-0210-3. Erratum in: *Curr Atheroscler Rep*. 2012 Feb;14(1):93. PMID: 21975919.

166. Bays HE, Ballantyne CM, Kastelein JJ, Isaacsohn JL, Braeckman RA, Soni PN. Eicosapentaenoic acid ethyl ester (AMR101) therapy in patients with very high triglyceride levels (from the Multi-center, placebo-controlled, Randomized, double-blind, 12-week study with an open-label Extension [MARINE] trial). *Am J Cardiol*. 2011 Sep 1;108(5):682-90. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.04.015. Epub 2011 Jun 16. PMID: 21683321.
167. Bays HE, Ballantyne CM, Braeckman RA, Stirtan WG, Soni PN. Icosapent ethyl, a pure ethyl ester of eicosapentaenoic acid: effects on circulating markers of inflammation from the MARINE and ANCHOR studies. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2013;13:37-46.
168. Lee MW, Park JK, Hong JW, Kim KJ, Shin DY, Ahn CW, Song YD, Cho HK, Park SW, Lee EJ. Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids on Low Density Lipoprotein Particle Size in Patients with Type 2 Diabetes Already under Statin Therapy. *Diabetes Metab J*. 2013 Jun;37(3):207-11. doi: 10.4093/dmj.2013.37.3.207. Epub 2013 Jun 14. PMID: 23807924; PMCID: PMC3689018.
169. Ballantyne CM, Bays HE, Kastelein JJ, Stein E, Isaacsohn JL, Braeckman RA, Soni PN. Efficacy and safety of eicosapentaenoic acid ethyl ester (AMR101) therapy in statin-treated patients with persistent high triglycerides (from the ANCHOR study). *Am J Cardiol*. 2012 Oct 1;110(7):984-92. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.05.031. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22819432.
170. Nishio R, Shinke T, Otake H, Nakagawa M, Nagoshi R, Inoue T, Kozuki A, Hariki H, Osue T, Taniguchi Y, Iwasaki M, Hiranuma N, Konishi A, Kinutani H, Shite J, Hirata K. Stabilizing effect of combined eicosapentaenoic acid and statin therapy on coronary thin-cap fibroatheroma. *Atherosclerosis*. 2014 May;234(1):114-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.025. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24637411.
171. Kashiwama T, Ueda Y, Nemoto T, Wada M, Masumura Y, Matsuo K, Nishio M, Hirata A, Asai M, Kashiwase K, Kodama K. Relationship between coronary plaque vulnerability and serum n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid ratio. *Circ J*. 2011;75(10):2432-8. doi: 10.1253/circj.cj-11-0352. Epub 2011 Jul 20. PMID: 21778590.
172. Budoff MJ, Bhatt DL, Kinninger A, Lakshmanan S, Muhlestein JB, Le VT, May HT, Shaikh K, Shekar C, Roy SK, Tayek J, Nelson JR. Effect of icosapent ethyl on progression of coronary atherosclerosis in patients with elevated triglycerides on statin therapy: final results of the EVAPORATE trial. *Eur Heart J*. 2020 Oct 21;41(40):3925-3932. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa652. PMID: 32860032; PMCID: PMC7654934.
173. Trivedi K, Le V, Nelson JR. The case for adding eicosapentaenoic acid (icosapent ethyl) to the ABCs of cardiovascular disease prevention. *Postgrad Med*. 2021 Jan;133(1):28-41. doi: 10.1080/00325481.2020.1783937. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32762268.
174. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Ketchum SB, Doyle RT Jr, Juliano RA, Jiao L, Granowitz C, Tardif JC, Ballantyne CM; REDUCE-IT Investigators. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 2019 Jan 3;380(1):11-22. doi: 10.1056/NEJMoa1812792. Epub 2018 Nov 10. PMID: 30415628.
175. Jacobson TA, Ito MK, Maki KC, Orringer CE, Bays HE, Jones PH, McKenney JM, Grundy SM, Gill EA, Wild RA, Wilson DP, Brown WV. National Lipid Association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1 - executive summary. *J Clin Lipidol*. 2014 Sep-Oct;8(5):473-88. doi: 10.1016/j.jacl.2014.07.007. Epub 2014 Jul 15. PMID: 25234560.
176. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis*. 2006;189:19-30.
177. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K; Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007 Mar 31;369(9567):1090-8. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60527-3. Erratum in: *Lancet*. 2007 Jul 21;370(9583):220. PMID: 17398308.
178. Nicholls SJ, Lincoff AM, Garcia M, Bash D, Ballantyne CM, Barter PJ, Davidson MH, Kastelein JJP, Koenig W, McGuire DK, Mozaffarian D, Ridker PM, Ray KK, Katona BG, Himmelmann A, Loss LE, Rensfeldt M, Lundström T, Agrawal R, Menon V, Wolski K, Nissen SE. Effect of High-

- Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High Cardiovascular Risk: The STRENGTH Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020 Dec 8;324(22):2268-2280. doi: 10.1001/jama.2020.22258. PMID: 33190147; PMCID: PMC7667577.
179. Bays HE, Braeckman RA, Ballantyne CM, Kastelein JJ, Otvos JD, Stirtan WG, Soni PN. Icosapent ethyl, a pure EPA omega-3 fatty acid: effects on lipoprotein particle concentration and size in patients with very high triglyceride levels (the MARINE study). *J Clin Lipidol*. 2012 Nov-Dec;6(6):565-72. doi: 10.1016/j.jacl.2012.07.001. Epub 2012 Jul 24. PMID: 23312052.
  180. Ballantyne CM, Braeckman RA, Bays HE, Kastelein JJ, Otvos JD, Stirtan WG, Doyle Jr RT, Soni PN, Juliano RA. Effects of icosapent ethyl on lipoprotein particle concentration and size in statin-treated patients with persistent high triglycerides (the ANCHOR Study). *J Clin Lipidol*. 2015;9:377-83.
  181. Mason RP, Libby P, Bhatt DL. Emerging Mechanisms of Cardiovascular Protection for the Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 May;40(5):1135-1147. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313286. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32212849; PMCID: PMC7176343.
  182. Zargar A, Ito MK. Long chain omega-3 dietary supplements: a review of the National Library of Medicine Herbal Supplement Database. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011 Aug;9(4):255-71. doi: 10.1089/met.2011.0004. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21787228.
  183. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*. 1999 Aug 7;354(9177):447-55. Erratum in: *Lancet* 2001 Feb 24;357(9256):642. Erratum in: *Lancet*. 2007 Jan 13;369(9556):106. PMID: 10465168.
  184. Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, Barlera S, Franzosi MG, Latini R, Lucci D, Nicolosi GL, Porcu M, Tognoni G; GISSI-HF Investigators. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008 Oct 4;372(9645):1223-30. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61239-8. Epub 2008 Aug 29. PMID: 18757090.
  185. Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM; Alpha Omega Trial Group. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2010 Nov 18;363(21):2015-26. doi: 10.1056/NEJMoa1003603.
  186. Arca M, Veronesi C, D'Erasmo L, Borghi C, Colivicchi F, De Ferrari GM, Desideri G, Pontremoli R, Temporelli PL, Perrone V, Degli Esposti L; Local Health Units Group †. Association of Hypertriglyceridemia with All-Cause Mortality and Atherosclerotic Cardiovascular Events in a Low-Risk Italian Population: The TG-REAL Retrospective Cohort Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2020 Oct 20;9(19):e015801. doi: 10.1161/JAHA.119.015801. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32954906; PMCID: PMC7792416.
  187. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1987 Nov 12;317(20):1237-45. doi: 10.1056/NEJM198711123172001. PMID: 3313041.
  188. Scott R, Best J, Forder P, Taskinen MR, Simes J, Barter P, Keech A; FIELD Study Investigators. Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study: baseline characteristics and short-term effects of fenofibrate [ISRCTN64783481]. *Cardiovasc Diabetol*. 2005 Aug 22;4:13. doi: 10.1186/1475-2840-4-13. PMID: 16111499; PMCID: PMC1266033.
  189. ACCORD Study Group, Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR 3rd, Leiter LA, Linz P, Friedewald WT, Buse JB, Gerstein HC, Probstfield J, Grimm RH, Ismail-Beigi F, Bigger JT, Goff DC Jr, Cushman WC, Simons-Morton DG, Byington RP. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2010 Apr 29;362(17):1563-74. doi: 10.1056/NEJMoa1001282. Epub 2010 Mar 14. Erratum in: *N Engl J Med*. 2010 May 6;362(18):1748. PMID: 20228404; PMCID: PMC2879499.
  190. Meade T, Zuhrie R, Cook C, Cooper J. Bezafibrate in men with lower extremity arterial disease: randomised controlled trial. *BMJ*. 2002 Nov 16;325(7373):1139. doi: 10.1136/bmj.325.7373.1139. PMID: 12433762; PMCID: PMC133451.

191. Pradhan AD, Paynter NP, Everett BM, Glynn RJ, Amarenco P, Elam M, Ginsberg H, Hiatt WR, Ishibashi S, Koenig W, Nordestgaard BG, Fruchart JC, Libby P, Ridker PM. Rationale and design of the Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients with Diabetes (PROMINENT) study. *Am Heart J*. 2018 Dec;206:80-93.
192. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, Vladutiu GD, Raal FJ, Ray KK, Roden M, Stein E, Tokgözoğlu 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 May 1;36(17):1012-22. doi: 10.1093/eurheartj/ehv043. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25694464; PMCID: PMC4416140.
193. Knopp RH, Gitter H, Truitt T, Bays H, Manion CV, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Yang B, Veltri EP; Ezetimibe Study Group. Effects of ezetimibe, a new cholesterol absorption inhibitor, on plasma lipids in patients with primary hypercholesterolemia. *Eur Heart J*. 2003 Apr;24(8):729-41. doi: 10.1016/s0195-668x(02)00807-2. PMID: 12713767.
194. Savarese G, De Ferrari GM, Rosano GM, Perrone-Filardi P. Safety and efficacy of ezetimibe: A meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2015 Dec 15;201:247-52. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.103. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26301648.
195. Sirtori CR, Yamashita S, Greco MF, Corsini A, Watts GF, Ruscica M. Recent advances in synthetic pharmacotherapies for dyslipidaemias. *Eur J Prev Cardiol*. 2020 Oct;27(15):1576-1596. doi: 10.1177/2047487319845314. Epub 2019 May 6. PMID: 31060364.
196. Pinkosky SL, Newton RS, Day EA, Ford RJ, Lhotak S, Austin RC, Birch CM, Smith BK, Filippov S, Groot PHE, Steinberg GR, Lalwani ND. Liver-specific ATP-citrate lyase inhibition by bempedoic acid decreases LDL-C and attenuates atherosclerosis. *Nat Commun*. 2016 Nov 28;7:13457. doi: 10.1038/ncomms13457. PMID: 27892461; PMCID: PMC5133702.
197. Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am*. 1984 Nov;251(5):58-66. doi: 10.1038/scientificamerican1184-58. PMID: 6390676.
198. Ference BA, Ray KK, Catapano AL, Ference TB, Burgess S, Neff DR, Oliver-Williams C, Wood AM, Butterworth AS, Di Angelantonio E, Danesh J, Kastelein JJP, Nicholls SJ. Mendelian Randomization Study of ACLY and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2019 Mar 14;380(11):1033-1042. doi: 10.1056/NEJMoa1806747. PMID: 30865797.
199. Pinkosky SL, Filippov S, Srivastava RA, Hanselman JC, Bradshaw CD, Hurley TR, Cramer CT, Spahr MA, Brant AF, Houghton JL, Baker C, Naples M, Adeli K, Newton RS. AMP-activated protein kinase and ATP-citrate lyase are two distinct molecular targets for ETC-1002, a novel small molecule regulator of lipid and carbohydrate metabolism. *J Lipid Res*. 2013 Jan;54(1):134-51. doi: 10.1194/jlr.M030528. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23118444; PMCID: PMC3520520.
200. Bilen O, Ballantyne CM. Bempedoic Acid (ETC-1002): an Investigational Inhibitor of ATP Citrate Lyase. *Curr Atheroscler Rep*. 2016 Oct;18(10):61. doi: 10.1007/s11883-016-0611-4. PMID: 27663902; PMCID: PMC5035316.
201. Ballantyne CM, Davidson MH, Macdougall DE, Bays HE, Dicarlo LA, Rosenberg NL, Margulies J, Newton RS. Efficacy and safety of a novel dual modulator of adenosine triphosphate-citrate lyase and adenosine monophosphate-activated protein kinase in patients with hypercholesterolemia: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Sep 24;62(13):1154-62. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.050. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23770179.
202. Thompson PD, Rubino J, Janik MJ, MacDougall DE, McBride SJ, Margulies JR, Newton RS. Use of ETC-1002 to treat hypercholesterolemia in patients with statin intolerance. *J Clin Lipidol*. 2015 May-Jun;9(3):295-304. doi: 10.1016/j.jacl.2015.03.003. Epub 2015 Mar 19. PMID: 26073387.
203. Gutierrez MJ, Rosenberg NL, Macdougall DE, Hanselman JC, Margulies JR, Strange P, Milad MA, McBride SJ, Newton RS. Efficacy and safety of ETC-1002, a novel investigational low-density lipoprotein-cholesterol-lowering therapy for the treatment of patients with hypercholesterolemia and type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Mar;34(3):676-83. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302677. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24385236.

204. Ballantyne CM, McKenney JM, MacDougall DE, Margulies JR, Robinson PL, Hanselman JC, Lalwani ND. Effect of ETC-1002 on Serum Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Hypercholesterolemic Patients Receiving Statin Therapy. *Am J Cardiol*. 2016 Jun 15;117(12):1928-33. doi: 10.1016/j.amjcard.2016.03.043. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27138185.
205. Thompson PD, MacDougall DE, Newton RS, Margulies JR, Hanselman JC, Orloff DG, McKenney JM, Ballantyne CM. Treatment with ETC-1002 alone and in combination with ezetimibe lowers LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients with or without statin intolerance. *J Clin Lipidol*. 2016 May-Jun;10(3):556-67. doi: 10.1016/j.jacl.2015.12.025. Epub 2016 Jan 6. PMID: 27206943.
206. Ballantyne CM, Laufs U, Ray KK, Leiter LA, Bays HE, Goldberg AC, Stroes ES, MacDougall D, Zhao X, Catapano AL. Bempedoic acid plus ezetimibe fixed-dose combination in patients with hypercholesterolemia and high CVD risk treated with maximally tolerated statin therapy. *Eur J Prev Cardiol*. 2020 Apr;27(6):593-603. doi: 10.1177/2047487319864671. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31357887; PMCID: PMC7153222.
207. Rubino J, MacDougall DE, Sterling LR, Hanselman JC, Nicholls SJ. Combination of bempedoic acid, ezetimibe, and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia: A randomized clinical trial. *Atherosclerosis*. 2021 Mar;320:122-128. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.12.023. Epub 2020 Dec 31. PMID: 33514449.
208. Rubino J, MacDougall DE, Sterling LR, Kelly SE, McKenney JM, Lalwani ND. Lipid lowering with bempedoic acid added to a proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor therapy: A randomized, controlled trial. *J Clin Lipidol*. 2021 May 28:S1933-2874(21)00073-8. doi: 10.1016/j.jacl.2021.05.002. Epub ahead of print. PMID: 34172394.
209. Ray KK, Bays HE, Catapano AL, Lalwani ND, Bloedon LT, Sterling LR, Robinson PL, Ballantyne CM; CLEAR Harmony Trial. Safety and Efficacy of Bempedoic Acid to Reduce LDL Cholesterol. *N Engl J Med*. 2019 Mar 14;380(11):1022-1032. doi: 10.1056/NEJMoa1803917. PMID: 30865796.
210. Goldberg AC, Leiter LA, Stroes ESG, Baum SJ, Hanselman JC, Bloedon LT, Lalwani ND, Patel PM, Zhao X, Duell PB. Effect of Bempedoic Acid vs Placebo Added to Maximally Tolerated Statins on Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Patients at High Risk for Cardiovascular Disease: The CLEAR Wisdom Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019 Nov 12;322(18):1780-1788. doi: 10.1001/jama.2019.16585. Erratum in: *JAMA*. 2020 Jan 21;323(3):282. PMID: 31714986; PMCID: PMC6865290.
211. Ballantyne CM, Banach M, Mancini GBJ, Lepor NE, Hanselman JC, Zhao X, Leiter LA. Efficacy and safety of bempedoic acid added to ezetimibe in statin-intolerant patients with hypercholesterolemia: A randomized, placebo-controlled study. *Atherosclerosis*. 2018 Oct;277:195-203. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.002. Epub 2018 Jun 12. PMID: 29910030.
212. Laufs U, Banach M, Mancini GBJ, Gaudet D, Bloedon LT, Sterling LR, Kelly S, Stroes ESG. Efficacy and Safety of Bempedoic Acid in Patients With Hypercholesterolemia and Statin Intolerance. *J Am Heart Assoc*. 2019 Apr 2;8(7):e011662. doi: 10.1161/JAHA.118.011662. PMID: 30922146; PMCID: PMC6509724.
213. Banach M, Duell PB, Gotto AM Jr, Laufs U, Leiter LA, Mancini GBJ, Ray KK, Flaim J, Ye Z, Catapano AL. Association of Bempedoic Acid Administration With Atherogenic Lipid Levels in Phase 3 Randomized Clinical Trials of Patients With Hypercholesterolemia. *JAMA Cardiol*. 2020 Oct 1;5(10):1124-1135. doi: 10.1001/jamacardio.2020.2314. PMID: 32609313; PMCID: PMC7330832.
214. Ballantyne CM, Bays H, Catapano AL, Goldberg A, Ray KK, Saseen JJ. Role of Bempedoic Acid in Clinical Practice. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021 Apr 5. doi: 10.1007/s10557-021-07147-5. Epub ahead of print. Erratum in: *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021 Apr 19; PMID: 33818688.
215. Cicero AFG, Pontremoli R, Fogacci F, Viazzi F, Borghi C. Effect of Bempedoic Acid on Serum Uric Acid and Related Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis of the available Phase 2 and Phase 3 Clinical Studies. *Drug Saf*. 2020 Aug;43(8):727-736. doi: 10.1007/s40264-020-00931-6. PMID: 32358698.
216. Masson W, Lobo M, Lavallo-Cobo A, Masson G, Molinero G. Effect of bempedoic acid on new onset or worsening diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020 Oct;168:108369. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108369. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32827596.

217. Go AS, Ambrosy AP, Kheider K, Fan D, Sung SH, Inveiss AI, Romo-LeTourneau V, Thomas SM, Koren A, Lo JC; Kaiser Permanente Cholesterol-Lowering Therapy in High-Risk Adults: Management and Patient Risks (KP CHAMP) Study. Statin Therapy and Risk of Incident Diabetes Mellitus in Adults With Cardiovascular Risk Factors. *Am J Cardiol*. 2020 Feb 15;125(4):534-541. doi: 10.1016/j.amjcard.2019.11.011. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31848029.
218. 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 Apr 11;385(9976):1397-405. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61368-4. Epub 2015 Jan 9. PMID: 25579834.
219. Ruscica M, Tokgözoğlu L, Corsini A, Sirtori CR. PCSK9 inhibition and inflammation: A narrative review. *Atherosclerosis*. 2019 Sep;288:146-155. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.07.015. Epub 2019 Jul 17. PMID: 31404822.
220. Di Minno A, Lupoli R, Calcaterra I, Poggio P, Forte F, Spadarella G, Ambrosino P, Iannuzzo G, Di Minno MND. Efficacy and Safety of Bempedoic Acid in Patients With Hypercholesterolemia: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*. 2020 Aug 4;9(15):e016262. doi: 10.1161/JAHA.119.016262. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32689862; PMCID: PMC7792250.
221. Nicholls S, Lincoff AM, Bays HE, Cho L, Grobbee DE, Kastelein JJ, Libby P, Moriarty PM, Plutzky J, Ray KK, Thompson PD, Sasiela W, Mason D, McCluskey J, Davey D, Wolski K, Nissen SE. Rationale and design of the CLEAR-outcomes trial: Evaluating the effect of bempedoic acid on cardiovascular events in patients with statin intolerance. *Am Heart J*. 2021 May;235:104-112. doi: 10.1016/j.ahj.2020.10.060. Epub 2020 Oct 24. PMID: 33470195.
222. Sjouke B, Hovingh GK, Kastelein JJ, Stefanutti C. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia: prevalence, diagnosis, and current and future treatment perspectives. *Curr Opin Lipidol*. 2015 Jun;26(3):200-9. doi: 10.1097/MOL.0000000000000179. PMID: 25950706.
223. Pisciotta L, Priore Oliva C, Pes GM, Di Scala L, Bellocchio A, Fresa R, Cantafora A, Arca M, Calandra S, Bertolini S. Autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) and homozygous familial hypercholesterolemia (FH): a phenotypic comparison. *Atherosclerosis*. 2006 Oct;188(2):398-405. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.016. Epub 2005 Dec 15. PMID: 16343504.
224. France M. Homozygous familial hypercholesterolaemia: update on management. *Paediatr Int Child Health*. 2016 Nov;36(4):243-247. doi: 10.1080/20469047.2016.1246640. PMID: 27967828.
225. 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. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.007. Epub 2013 Jan 19. PMID: 23375686.
226. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, Raal FJ, Santos RD, Hegele RA, Kuivenhoven JA, Nordestgaard BG, Descamps OS, Steinhagen-Thiessen E, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF, Averna M, Boileau C, Borén J, Catapano AL, Defesche JC, Hovingh GK, Humphries SE, Kovanen PT, Masana L, Pajukanta P, Parhofer KG, Ray KK, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Wiegman A, Wiklund O, Chapman MJ; European Atherosclerosis Society Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2014 Aug 21;35(32):2146-57. doi: 10.1093/eurheartj/ehu274. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25053660; PMCID: PMC4139706.
227. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):928-33. doi: 10.1073/pnas.0335507100. Epub 2003 Jan 27. PMID: 12552133; PMCID: PMC298703.

228. Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, Xu F, Scott R, Raal FJ. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 2013 Nov 5;128(19):2113-20. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004678. Epub 2013 Sep 6. PMID: 24014831.
229. Santos RD, Stein EA, Hovingh GK, Blom DJ, Soran H, Watts GF, López JAG, Bray S, Kurtz CE, Hamer AW, Raal FJ. Long-Term Evolocumab in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Feb 18;75(6):565-574. doi: 10.1016/j.jacc.2019.12.020. PMID: 32057369.
230. Blom DJ, Harada-Shiba M, Rubba P, Gaudet D, Kastelein JJP, Charng MJ, Pordy R, Donahue S, Ali S, Dong Y, Khilla N, Banerjee P, Baccara-Dinet M, Rosenson RS. Efficacy and Safety of Alirocumab in Adults With Homozygous Familial Hypercholesterolemia: The ODYSSEY HoFH Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Jul 14;76(2):131-142. doi: 10.1016/j.jacc.2020.05.027. PMID: 32646561.
231. Raal FJ, Rosenson RS, Reeskamp LF, Hovingh GK, Kastelein JJP, Rubba P, Ali S, Banerjee P, Chan KC, Gipe DA, Khilla N, Pordy R, Weinreich DM, Yancopoulos GD, Zhang Y, Gaudet D; ELIPSE HoFH Investigators. Evinacumab for Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2020 Aug 20;383(8):711-720. doi: 10.1056/NEJMoa2004215. PMID: 32813947.
232. Hovingh GK, Lepor NE, Kallend D, Stoekenbroek RM, Wijngaard PLJ, Raal FJ. Inclisiran Durably Lowers Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Expression in Homozygous Familial Hypercholesterolemia: The ORION-2 Pilot Study. *Circulation*. 2020 Jun 2;141(22):1829-1831. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044431. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32479195.
233. Stefanutti C. Lomitapide-a Microsomal Triglyceride Transfer Protein Inhibitor for Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Curr Atheroscler Rep*. 2020 Jun 18;22(8):38. doi: 10.1007/s11883-020-00858-4. Erratum in: *Curr Atheroscler Rep*. 2020 Jul 15;22(8):41. PMID: 32557261; PMCID: PMC7303073.
234. Blom DJ, Averna MR, Meagher EA, du Toit Theron H, Sirtori CR, Hegele RA, Shah PK, Gaudet D, Stefanutti C, Vigna GB, Larrey D, Bloedon LT, Foulds P, Rader DJ, Cuchel M. Long-Term Efficacy and Safety of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein Inhibitor Lomitapide in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Circulation*. 2017 Jul 18;136(3):332-335. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028208. PMID: 28716835.
235. D'Erasmo L, Cefalù AB, Noto D, Giammanco A, Averna M, Pintus P, Medde P, Vigna GB, Sirtori C, Calabresi L, Pavanello C, Bucci M, Sabbà C, Suppressa P, Natale F, Calabrò P, Sampietro T, Bigazzi F, Sbrana F, Bonomo K, Sileo F, Arca M. Efficacy of Lomitapide in the Treatment of Familial Homozygous Hypercholesterolemia: Results of a Real-World Clinical Experience in Italy. *Adv Ther*. 2017 May;34(5):1200-1210. doi: 10.1007/s12325-017-0531-x. Epub 2017 Apr 21. PMID: 28432645.
236. Leipold R, Raal F, Ishak J, Hovingh K, Phillips H. The effect of lomitapide on cardiovascular outcome measures in homozygous familial hypercholesterolemia: A modelling analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2017 Nov;24(17):1843-1850. doi: 10.1177/2047487317730473. Epub 2017 Sep 19. PMID: 28925748.
237. Underberg JA, Cannon CP, Larrey D, Makris L, Blom D, Phillips H. Long-term safety and efficacy of lomitapide in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: Five-year data from the Lomitapide Observational Worldwide Evaluation Registry (LOWER). *J Clin Lipidol*. 2020 Nov-Dec;14(6):807-817. doi: 10.1016/j.jacl.2020.08.006. Epub 2020 Aug 19. PMID: 33023859.
238. Kolovou GD, Kolovou V, Papadopoulou A, Watts GF. MTP Gene Variants and Response to Lomitapide in Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2016 Jul 1;23(7):878-83. doi: 10.5551/jat.34777. Epub 2016 May 10. PMID: 27170061; PMCID: PMC7399272.
239. 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 Jun;34(2):154-6. doi: 10.1038/ng1161. PMID: 12730697.

240. Sabatine MS. PCSK9 inhibitors: clinical evidence and implementation. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Mar;16(3):155-165. doi: 10.1038/s41569-018-0107-8. PMID: 30420622.
241. 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. PMID: 25282520.
242. Kasichayanula S, Grover A, Emery MG, Gibbs MA, Somaratne R, Wasserman SM, Gibbs JP. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Evolocumab, a PCSK9 Inhibitor. *Clin Pharmacokinet*. 2018 Jul;57(7):769-779. doi: 10.1007/s40262-017-0620-7. PMID: 29353350; PMCID: PMC5999140.
243. 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. PMID: 28304224.
244. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, Edelberg JM, Goodman SG, Hanotin C, Harrington RA, Jukema JW, Lecorps G, Mahaffey KW, Moryusef A, Pordy R, Quintero K, Roe MT, Sasiela WJ, Tamby JF, Tricoci P, White HD, Zeiher AM; ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2018 Nov 29;379(22):2097-2107. doi: 10.1056/NEJMoa1801174. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30403574.
245. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, Ballantyne CM, Cho L, Kastelein JJ, Koenig W, Somaratne R, Kassahun H, Yang J, Wasserman SM, Scott R, Ungi I, Podolec J, Ophuis AO, Cornel JH, Borgman M, Brennan DM, Nissen SE. Effect of Evolocumab on Progression of Coronary Disease in Statin-Treated Patients: The GLAGOV Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Dec 13;316(22):2373-2384. doi: 10.1001/jama.2016.16951. PMID: 27846344.
246. Sabatine MS, De Ferrari GM, Giugliano RP, Huber K, Lewis BS, Ferreira J, Kuder JF, Murphy SA, Wiviott SD, Kurtz CE, Honarpour N, Keech AC, Sever PS, Pedersen TR. Clinical Benefit of Evolocumab by Severity and Extent of Coronary Artery Disease: Analysis From FOURIER. *Circulation*. 2018 Aug 21;138(8):756-766. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034309. PMID: 29626068.
247. Giugliano RP, Pedersen TR, Park JG, De Ferrari GM, Gaciong ZA, Ceska R, Toth K, Gouni-Berthold I, Lopez-Miranda J, Schiele F, Mach F, Ott BR, Kanevsky E, Pineda AL, Somaratne R, Wasserman SM, Keech AC, Sever PS, Sabatine MS; FOURIER Investigators. Clinical efficacy and safety of achieving very low LDL-cholesterol concentrations with the PCSK9 inhibitor evolocumab: a prespecified secondary analysis of the FOURIER trial. *Lancet*. 2017 Oct 28;390(10106):1962-1971. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32290-0. Epub 2017 Aug 28. PMID: 28859947.
248. 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. PMID: 28813214.
249. de Carvalho LSF, Campos AM, Sposito AC. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Inhibitors and Incident Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis With Over 96,000 Patient-Years. *Diabetes Care*. 2018 Feb;41(2):364-367. doi: 10.2337/dc17-1464. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29180351.
250. Ridker PM, Tardif JC, Amarencu P, Duggan W, Glynn RJ, Jukema JW, Kastelein JJP, Kim AM, Koenig W, Nissen S, Revkin J, Rose LM, Santos RD, Schwartz PF, Shear CL, Yunis C; SPIRE Investigators. Lipid-Reduction Variability and Antidrug-Antibody Formation with Bococizumab. *N Engl J Med*. 2017 Apr 20;376(16):1517-1526. doi: 10.1056/NEJMoa1614062. Epub 2017 Mar 17. PMID: 28304227.
251. Koskinas KC, Windecker S, Pedrazzini G, Mueller C, Cook S, Matter CM, Muller O, Häner J, Gencer B, Crljenica C, Amini P, Deckarm O, Iglesias JF, Räber L, Heg D, Mach F. Evolocumab for Early Reduction of LDL Cholesterol Levels in Patients With Acute Coronary Syndromes

- (EVOPACS). *J Am Coll Cardiol*. 2019 Nov 19;74(20):2452-2462. doi: 10.1016/j.jacc.2019.08.010. Epub 2019 Aug 31. PMID: 31479722.
252. Navarese EP, Andreotti F, Raggi P, Kolodziejczak M, Buffon A, Bliden K, Tantry U, Kubica J, Sardella G, Lauten A, Agewall S, Gurbel PA, Brouwer MA. Baseline low-density lipoprotein cholesterol to predict the extent of cardiovascular benefit from lipid-lowering therapies: a review. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2019 Jan 1;5(1):47-54. doi: 10.1093/ehjcvp/pvy038. PMID: 30247574.
  253. <https://www.aifa.gov.it/-/rapporto-nazionale-osmed-2020-sull-uso-dei-farmaci-in-italia>
  254. Agenzia Italiana del Farmaco. Determina AIFA n. 256/2017. G.U. Serie Generale n. 54 del 06/03/2017. <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/gu/2017/03/06/54/sg/pdf>; Agenzia Italiana del Farmaco. Determina AIFA n. 1771/2019. G.U. Serie Generale n. 291 del 12/1.
  255. Reeskamp LF, Millar JS, Wu L, Jansen H, van Harskamp D, Schierbeek H, Gipe DA, Rader DJ, Dallinga-Thie GM, Hovingh GK, Cuchel M. ANGPTL3 Inhibition With Evinacumab Results in Faster Clearance of IDL and LDL apoB in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 May 5;41(5):1753-1759. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315204. Epub 2021 Mar 11. PMID: 33691480; PMCID: PMC8057526.
  256. Rosenson RS, Burgess LJ, Ebenbichler CF, Baum SJ, Stroes ESG, Ali S, Khillan N, Hamlin R, Pordy R, Dong Y, Son V, Gaudet D. Evinacumab in Patients with Refractory Hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2020 Dec 10;383(24):2307-2319. doi: 10.1056/NEJMoa2031049. Epub 2020 Nov 15. PMID: 33196153.
  257. Ahmad Z, Banerjee P, Hamon S, Chan KC, Bouzelmat A, Sasiela WJ, Pordy R, Mellis S, Dansky H, Gipe DA, Dunbar RL. Inhibition of Angiopoietin-Like Protein 3 With a Monoclonal Antibody Reduces Triglycerides in Hypertriglyceridemia. *Circulation*. 2019 Aug 6;140(6):470-486. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039107. Epub 2019 Jun 27. Erratum in: *Circulation*. 2021 Mar 30;143(13):e799. PMID: 31242752; PMCID: PMC6686956.
  258. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC Jr, Virani SS, Williams KA Sr, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 Sep 10;140(11):e563-e595. doi: 10.1161/CIR.0000000000000677. Epub 2019 Mar 17. Erratum in: *Circulation*. 2019 Sep 10;140(11):e647-e648. Erratum in: *Circulation*. 2020 Jan 28;141(4):e59. Erratum in: *Circulation*. 2020 Apr 21;141(16):e773. PMID: 30879339; PMCID: PMC8351755.
  259. Stiekema LCA, Stroes ESG, Verweij SL, Kassahun H, Chen L, Wasserman SM, Sabatine MS, Mani V, Fayad ZA. Persistent arterial wall inflammation in patients with elevated lipoprotein(a) despite strong low-density lipoprotein cholesterol reduction by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibody treatment. *Eur Heart J*. 2019 Sep 1;40(33):2775-2781. doi: 10.1093/eurheartj/ehy862. PMID: 30561610; PMCID: PMC6933872.
  260. O'Donoghue ML, Fazio S, Giugliano RP, Stroes ESG, Kanevsky E, Gouni-Berthold I, Im K, Lira Pineda A, Wasserman SM, Češka R, Ezhov MV, Jukema JW, Jensen HK, Tokgözoğlu SL, Mach F, Huber K, Sever PS, Keech AC, Pedersen TR, Sabatine MS. Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk. *Circulation*. 2019 Mar 19;139(12):1483-1492. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037184. PMID: 30586750.
  261. Clarke R, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med*. 361, 2518-2528 (2009). doi: 10.1056/NEJMoa0902604.
  262. Erqou S, et al. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA*. 302, 412-423 (2009). doi: 10.1001/jama.2009.1063
  263. Tsimikas S. A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Feb 14;69(6):692-711. doi: 10.1016/j.jacc.2016.11.042. PMID: 28183512.
  264. Langsted A, Kamstrup PR, Nordestgaard BG. High lipoprotein(a) and high risk of mortality. *Eur Heart J*. 2019 Sep 1;40(33):2760-2770. doi: 10.1093/eurheartj/ehy902. PMID: 30608559.

265. Indolfi C, Chiariello M, Avvedimento EV. Selective gene therapy for proliferative disorders: sense and antisense. *Nat Med*. 1996 Jun;2(6):634-5. doi: 10.1038/nm0696-634. PMID: 8640548.
266. Gaudet D, Brisson D. Gene-based therapies in lipidology: current status and future challenges. *Curr Opin Lipidol*. 2015 Dec;26(6):553-65. doi: 10.1097/MOL.0000000000000240. PMID: 26780008.
267. Stein CA, Krieg AM. Problems in interpretation of data derived from in vitro and in vivo use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res Dev*. 1994 Summer;4(2):67-9. doi: 10.1089/ard.1994.4.67. PMID: 7950301.
268. Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2003 Aug 1;31(15):4417-24. doi: 10.1093/nar/gkg649. PMID: 12888501; PMCID: PMC169945.
269. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):494-8. doi: 10.1038/35078107. PMID: 11373684.
270. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*. 2007 Mar;8(3):173-84. doi: 10.1038/nrg2006. PMID: 17304245.
271. Judge A, MacLachlan I. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Hum Gene Ther*. 2008 Feb;19(2):111-24. doi: 10.1089/hum.2007.179. PMID: 18230025.
272. Eguchi A, et al. siRNA delivery using peptide transduction domains. *Trends Pharmacol. Sci*. 30, 341-345 (2009). doi: 10.1016/j.tips.2009.04.009
273. Hamm S, Latz E, Hangel D, Müller T, Yu P, Golenbock D, Sparwasser T, Wagner H, Bauer S. Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist. *Immunobiology*. 2010 Jul;215(7):559-69. doi: 10.1016/j.imbio.2009.09.003. Epub 2009 Oct 25. PMID: 19854535.
274. Jorge A, Pais A, Vitorino C. Targeted siRNA Delivery Using Lipid Nanoparticles. *Methods Mol Biol*. 2020;2059:259-283. doi: 10.1007/978-1-4939-9798-5\_14. PMID: 31435927.
275. Ray KK, Wright RS, Kallend D, Koenig W, Leiter LA, Raal FJ, Bisch JA, Richardson T, Jaros M, Wijngaard PLJ, Kastelein JJP; ORION-10 and ORION-11 Investigators. Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med*. 2020 Apr 16;382(16):1507-1519. doi: 10.1056/NEJMoa1912387. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32187462.
276. Raal FJ, Kallend D, Ray KK, Turner T, Koenig W, Wright RS, Wijngaard PLJ, Curcio D, Jaros MJ, Leiter LA, Kastelein JJP; ORION-9 Investigators. Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2020 Apr 16;382(16):1520-1530. doi: 10.1056/NEJMoa1913805. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32197277.
277. Witztum JL, Gaudet D, Freedman SD, Alexander VJ, Digenio A, Williams KR, Yang Q, Hughes SG, Geary RS, Arca M, Stroes ESG, Bergeron J, Soran H, Civeira F, Hemphill L, Tsimikas S, Blom DJ, O'Dea L, Bruckert E. Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome. *N Engl J Med*. 2019 Aug 8;381(6):531-542. doi: 10.1056/NEJMoa1715944. PMID: 31390500.



SI RINGRAZIA PER IL CONTRIBUTO NON CONDIZIONANTE DI:

ALFASIGMA 

AMARIN®

AMGEN®

AMRYT  
PHARMA

AURORA  
biofarma



DOC

 Daiichi-Sankyo

IBSA

ERREKAPPA  
EUROTHERAPICI

Caring Innovation

 NOVARTIS

 I.L.F.I.  
LUSOFARMACO  
ISTITUTO LUSO FARMACO D'ITALIA

SANDOZ A Novartis  
Division

 PIAM  
Pharma &  
Integrative Care

 SERVIER

SANOFI 

ZENTIVA

So.Se. PHARM  
INDUSTRIA FARMACEUTICA







