

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE**

XVIII Ciclo – 2002 - 2006

COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE

TESI DI DOTTORATO

**UNA NUOVA MUTAZIONE DEL RECETTORE
DELLE LDL SI ASSOCIA AD UN AUMENTATO
SPESSORE MEDIO INTIMALE CAROTIDEO
INDIPENDENTEMENTE DAI PRINCIPALI
FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI**

**TUTORE
Chiar.mo
Prof. Paolo Rubba**

**CANDIDATO

Dott. Alessandro Giannino**

Introduzione

L'Ipercolesterolemia Familiare (FH) è una patologia autosomica dominante caratterizzata da livelli circolanti estremamente elevati di colesterolo delle Lipoproteine a Bassa Densità (LDL). Tale malattia è determinata da mutazioni a carico del gene che codifica per il recettore delle LDL (LDLr), o, meno frequentemente, a carico della Apolipoproteina B-100.

I pazienti affetti manifestano un'aterosclerosi grave e precoce e mostrano un notevole incremento della mortalità cardiovascolare [1].

La relazione tra le differenti mutazioni del LDLr e l'espressione clinica della malattia non è ancora del tutto chiara [2-4]. Finora, una maggiore o minore gravità clinica è stata correlata solo ai livelli circolanti di colesterolo totale ed LDL, i quali, a loro volta, sono strettamente dipendenti dall'attività funzionale residua del LDLr [5]. Tuttavia, da un lato esistono lavori scientifici che non riescono a identificare una relazione tra mutazioni *null* ed eventi cardiovascolari (CV) [6]; dall'altro, vi sono dimostrazioni dell'importanza di altri fattori di rischio CV associati [7]. Comunque, in questa ricerca volta alla identificazione di fattori in grado di spiegare l'eterogeneità clinica dei pazienti affetti da FH, risulta ancora poco chiaro se le differenti mutazioni del LDLr giochino un ruolo indipendente come fattori di rischio, considerato il ruolo preponderante esercitato dai livelli di colesterolo e dagli altri principali fattori di rischio cardiovascolare (CV) [7,8].

Lo scopo dello studio è stato quindi quello di verificare se l'identificazione delle mutazioni del LDLr possa consentire di meglio caratterizzare il profilo di rischio CV di pazienti FH, in aggiunta agli altri principali fattori di rischio CV. A tale scopo abbiamo proceduto a:

- a) sequenziare il cDNA di un campione rappresentativo della FH eterozigote in Campania allo scopo di identificare vecchie e nuove mutazioni eventualmente presenti;
- b) eseguire una valutazione clinica dei pazienti portatori delle diverse mutazioni;
- c) effettuare l'Ultrasonografia carotidea ad alta risoluzione in tutti i pazienti studiati per valutare in modo non invasivo lo spessore medio-intimale (IMT). È stato infatti dimostrato che l'IMT rappresenta un marcatore standardizzato e riproducibile di aterosclerosi preclinica, che risulta significativamente aumentato nei pazienti FH sia eterozigoti che omozigoti [9,10] e che è fortemente predittivo non solo degli eventi cerebrovascolari ma anche degli eventi coronarici [11,12].

Pazienti e Metodi

- ***Diagnosi di FH***

Sono stati reclutati per lo studio 102 pazienti con le caratteristiche cliniche della FH eterozigote, valutati consecutivamente presso l'Ambulatorio delle Iperlipidemie di questa Università. Ciascun paziente ha fornito il proprio consenso informato.

La diagnosi è stata formulata secondo i criteri del *Simon Broome Register* [13]: si considera una diagnosi clinica certa quando sono presenti xantomi nel probando e/o in familiari di primo grado; la diagnosi si definisce probabile quando, in assenza di xantomi tendinei, nel probando e in almeno un familiare di primo grado il colesterolo basale o quello LDL risultino maggiori o uguali a 290 mg/dL e 190 mg/dL, rispettivamente, con trigliceridi plasmatici inferiori a 200 mg/dL, nel probando ed in tutti i membri della famiglia. La Tabella 1 mostra le caratteristiche cliniche dei soggetti in studio. In 14 pazienti c'era un'anamnesi patologica positiva per Cardiopatia ischemica: 11 pazienti (9 maschi e 2 femmine) avevano sofferto di un precedente infarto miocardico (premature in 9 casi-tutti di sesso maschile); 2 pazienti avevano subito un intervento di by-pass Aorto-coronarico ed uno era affetto da angina stabile. Un paziente aveva subito un intervento di endoarteriectomia carotidea. Venticinque pazienti avevano valori pressori maggiori di 140/90 mmHg; nessuno era affetto da Diabete mellito.

- ***Ricerca delle mutazioni del LDLr***

Il cDNA è stato sintetizzato a partire dall'RNA estratto dalle cellule del sangue periferico utilizzando un primer di oligo-dT. Utilizzando la tecnica della PCR con trascrittasi inversa e specifici primers per LDLr sono stati amplificati sei frammenti di circa 600 paia di basi, parzialmente sovrappontenti, dando luogo alla amplificazione complessiva di tutta la regione codificante per l'LDLr. I sei frammenti ottenuti sono quindi stati sequenziati su entrambi i filamenti e separati mediante elettroforesi su gel. La sequenza del cDNA di ogni paziente è stata così ricostruita e confrontata con la sequenza nota normale dell'LDLr mediante procedura automatica computerizzata. Ogni mutazione identificata è stata successivamente confermata mediante sequenziamento della corrispondente regione del DNA genomico. Sono state identificate 16 mutazioni della regione codificante del LDLr, incluse 5 mai descritte in precedenza. Una delle nuove mutazioni è risultata particolarmente prevalente nel nostro campione; tale mutazione va a colpire il sito accettore di splicing in 3' dell'introne 15 e determina la perdita dell'esone 16 a livello dell' mRNA maturo. Questa delezione produce una proteina recettoriale con una delezione "in frame" di 26 aminoacidi tra la posizione Q⁷⁴⁹ e V⁷⁷⁶ del dominio di membrana e probabilmente produce un recettore solubile [14]. Da questo momento in avanti identificheremo tale mutazione come 2312-3 C>A.

- *Analisi di laboratorio e calcolo del Cholesterol-year score*

Dopo un digiuno notturno di 12 ore, abbiamo prelevato un campione di sangue da vena periferica per ciascun paziente. Il colesterolo totale e i trigliceridi del siero sono stati determinati con metodo enzimatico. Il colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL-C) è stato determinato dopo precipitazione. Il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula di Friedewald.

Poiché tutti i pazienti, compreso i bambini, erano in terapia ipolipidemizzante, abbiamo calcolato il Cholesterol-year score, tenendo in considerazione le variazioni dei livelli di colesterolemia durante il trattamento [15]. Dalla cartella di ciascun paziente sono stati estratti tutti i valori di controllo della colesterolemia precedenti all'esame carotideo. Il valore di lipidi plasmatici precedenti all'inizio della terapia ipolipidemizzante (dieta e/o terapia farmacologica) sono stati considerati come i valori basali. Il valore di colesterolo basale di ciascun paziente (in mmol/L) è stato quindi moltiplicato per l'età del paziente alla diagnosi e sommato alla media del colesterolo durante gli anni di terapia moltiplicato per gli anni di trattamento. La media degli anni di trattamento era 4.42 anni (range 1-15); la media dei controlli di colesterolemia era 8.55 (range 2-26).

- *Ultrasonografia carotidea B-mode ad alta risoluzione*

In tutti i pazienti è stata effettuata e stata effettuata l'ultrasonografia carotidea ad alta risoluzione per la misurazione dell'IMT. Le arterie carotidi di entrambi i lati sono state valutate nel loro tratto extracranico utilizzando un apparecchio Biosound 2000 II s.a. (Biosound Inc., Indianapolis, IN). Tale apparecchio fornito di trasduttore da 8 MHz con doppler ad onda pulsata è in grado di fornire una risoluzione assiale di 0,3 mm e 256 livelli di grigio. L'esame ultrasonografico è stato effettuato da un sonografista specializzato seguendo un protocollo elaborato presso la Divisione di Ultrasonografia Vascolare della Wake Forest University School of Medicine, Winston Salem, NC, USA [16]. Scopo di tale protocollo era di fornire misurazioni valide e affidabili dell'IMT carotideo a livello di due specifici segmenti: il tratto distale (pari ad 1,0 cm) della Carotide comune e la Biforcazione carotidea. Le immagini sono state registrate su cassette Super VHS. Un lettore specializzato ha provveduto alle misurazioni in cieco, utilizzando una procedura di analisi computerizzata automatica con possibilità di correzioni manuali da parte dell'operatore. Per la lettura sono state selezionate boxes per ciascuno degli 8 segmenti (4 per lato) di parete carotidea con il maggiore IMT. La media dei massimi valori di IMT carotidei misurati rappresenta l'end-point *mean max*. Nel presente studio la stima di variabilità intraosservatore sia per il sonografista che per il lettore ha fornito un coefficiente di riproducibilità per il *mean max* IMT di 0,97 assolutamente paragonabile a quello ottenuto nello studio ELSA [17].

- Valutazione dei fattori di rischio ambientali

Un diario alimentare di 7 giorni è stato compilato dall'85% dei partecipanti. L'introito calorico medio giornaliero era di 1800 Kcal circa. La percentuale di grassi saturi era dell'11% circa, con un contenuto di colesterolo di circa 210 mg/die. Un questionario somministrato per la valutazione dell'attività fisica sul lavoro e nel tempo libero non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i vari soggetti.

- Analisi statistica

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando la versione 10.0 dell'SPSS. I dati parametrici sono stati espressi come medie \pm errore standard della media (S.E.M.). La concentrazione dei trigliceridi stata trasformata in logaritmo prima dell'analisi. Il cholesterol-year score è stato espresso come mediana e il test Mann-Whitney è stato utilizzato per i confronti fra i gruppi. Le differenze tra gruppi indipendenti sono state valutate utilizzando il t di Student per le variabili continue e il test χ^2 per le variabili categoriche. La relazione fra eventi cardiovascolari ed IMT carotideo è stata valutata con la regressione logistica. L'analisi della covarianza è stata utilizzata per la valutazione delle differenze di IMT carotideo dopo correzione per le covariate.

Risultati

Dei 102 pazienti totali, 82 (80 %) avevano una mutazione a carico del LDLr.

Non è stata rilevata nessuna differenza statisticamente significativa tra pazienti con mutazione e pazienti senza mutazione dei classici fattori di rischio CV e di IMT carotideo (mean max) (Tab. 1).

I pazienti con la mutazione 2312-3 C>A (n=24, 13 famiglie) avevano un colesterolo basale significativamente maggiore rispetto ai soggetti con altre mutazioni del LDLr. Comunque, tale differenza in termini di Cholesterol-year score non raggiungeva la significatività statistica (tab. 2). Non c'era nessuna differenza significativa nella prevalenza degli altri fattori di rischio CV, né per gli eventi fra i due gruppi; tuttavia, la prevalenza degli xantomi tendinei era tre volte maggiore nei portatori della mutazione 2312-3 C>A rispetto ai pazienti con altre mutazioni (p=0,027).

Il *mean max* carotideo era significativamente maggiore nei soggetti 2312-3 C>A rispetto ai soggetti con altra mutazione (p=0,021). Il medesimo risultato si otteneva nell'analisi multivariata correggendo per età, cholesterol-year score,

sempre (p=0,002) e, in un secondo modello, per età cholesterol-year score, sesso, fumo di sigaretta, pressione arteriosa sistolica (p=0,004) (Figura 1).

Inserendo nel modello il colesterolo basale in luogo del cholesterol-year score, i livelli di significatività diventavano rispettivamente 0,002 e 0,003. Anche l'aggiunta al modello del rapporto trigliceridi/HDL-colesterolo non modificava la significatività statistica (p=0,004).

L'analisi condotta nei probandi (mutazioni 2312-3 C>A versus altre mutazioni, Tabella 3 e Figura 1) diede luogo a risultati analoghi a quelli osservati nella popolazione totale. Così come osservato nella popolazione totale, anche nei probandi si osservava una differenza significativa nei valori di colesterolo basale e nella prevalenza di xantomi tra soggetti 2312-3 C>A e portatori di altre mutazioni, mentre il cholesterol-year score continuava a non essere significativamente diverso.

Il *mean max* carotideo dei probandi 2312-3 C>A era significativamente maggiore di quello dei probandi con altra mutazione: p=0,007, non corretto; p<0,001 e p=0,001 nei due modelli di analisi multivariata. Anche per i probandi, l'utilizzare il colesterolo basale in luogo del cholesterol-year score non modificava la significatività nei due modelli di analisi multivariata (p<0,001 e p=0,003 rispettivamente). Un'altra analisi di sottogruppo è stata condotta in pazienti con colesterolo plasmatico ≥ 350 mg/dL (media \pm errore standard della media era $422 \pm 18,6$ mg/dL nel gruppo 2312-3 C>A e $426 \pm 13,6$ mg/dL nel gruppo con altre mutazioni, p=0,883). Il *mean max* carotideo era

significativamente maggiore nei pazienti 2312-3 C>A (n=23; IMT medio $1,05 \pm 0,83$ mm) rispetto ai portatori di altre mutazioni (n=19; IMT medio $0,76 \pm 0,37$ mm), (p=0,003, non corretto, p<0,001 e p= 0,002 nei due modelli di analisi multivariata).

Discussione

Questo studio suggerisce che una mutazione a carico del LDLr, rispetto ad altre mutazioni, sia associata con un aumentato IMT carotideo, indipendentemente dai livelli di colesterolo plasmatico e dagli altri principali fattori di rischio CV. I pazienti descritti nello studio rappresentano con elevata probabilità un campione non selezionato di soggetti affetti da FH, poiché la legislazione richiedeva ai medici di medicina generale del territorio di inviare presso strutture specialistiche i pazienti con sospetto di iperlipidemie di tipo familiare per una corretta formulazione della diagnosi.

In questo studio i criteri per una diagnosi clinica certa di FH eterozigote si sono dimostrati accurati (8 dei 9 pazienti che soddisfacevano tali criteri sono risultati portatori di una mutazione a carico del LDLr). I criteri per una diagnosi probabile, basati anche sulla valutazione dei parenti di primo grado, erano quelli forniti per la standardizzazione della diagnosi e del trattamento delle dislipidemie familiari e si sono dimostrati efficaci nell'80 % dei pazienti. Questo è stato sicuramente un ottimo risultato in termini di specificità rispetto a quanto osservato in altri contesti, quando per lo screening si sono valutati i valori di colesterolo LDL riferiti al 90° percentile della distribuzione associati a sintomi di malattia coronarica o ad osservazioni nell'ambito della famiglia dei probandi [3].

Nel campione di FH da noi utilizzato, la presenza di mutazioni a carico del promoter del gene non è stata valutata. Comunque, in una recente rivalutazione

delle mutazioni del LDLr descritte in Italia, i soggetti portatori di tali mutazioni erano solo il 5% circa dei casi. La nuova mutazione 2312-3 C>A distrugge il sito accettore di splicing al 3' dell'introne 15 e comporta l'eliminazione dell'esone 16 dall'mRNA maturo con conseguente danno del dominio di membrana e con produzione, probabilmente, di un recettore solubile. Questa nuova mutazione del LDLr era quella con la maggiore prevalenza nel nostro campione e questo ci ha consentito di effettuare dei confronti con pazienti portatori di altre mutazioni. I numeri dei pazienti con altre mutazioni erano troppo piccoli per un confronto diretto di ciascuna con la 2312-3 C>A; tuttavia, questo studio non si proponeva un confronto diretto tra singole mutazioni. L'obiettivo era piuttosto l'identificazione di una o più mutazioni ad elevata prevalenza che fossero associate ad una più severa aterosclerosi carotidea e che consentissero la definizione di un maggior rischio CV rispetto a quello di altri pazienti parimenti affetti da FH.

I comuni fattori di rischio CV sono stati considerati sulla base del loro ruolo nella FH, identificato in precedenti lavori in cui era stata misurata l'attività recettoriale. È stato descritto che i pazienti FH eterozigoti *receptor-negative* (<55 % di attività) hanno maggiore incidenza di coronaropatia dei *receptor-defective*. Età e Ipertensione arteriosa erano i fattori dotati di maggior predittività, mentre non lo erano LDL colesterolo (e genotipo dell'Apo E), almeno nei pazienti *receptor-negative*. Inoltre, in tutti questi studi era presente una significativa sovrapposizione dei valori di colesterolo tra pazienti portatori

di mutazioni *negative* e *defective*, con differenze all'interno di ciascuno dei gruppi di tre o quattro volte quelle tra i gruppi. Tali risultati suggeriscono la necessità di utilizzare diversi ed ulteriori indicatori di rischio e confermano i dati precedenti che indicano come le mutazioni del LDLr non si accompagnano a pari variazioni di attività recettoriale [18]. In un altro studio teso a valutare in pazienti FH l'impatto di altri fattori di rischio CV, età, sesso, fumo di sigaretta, composizione delle particelle LDL (LDL piccole) si sono confermati fattori fortemente predittivi di malattia coronarica, mentre Lp(a) e la presenza di xantomi giocavano un ruolo solo nelle manifestazioni coronariche premature; inoltre insulina, fibrinogeno, omocisteina, proteina C-reattiva, polimorfismo I/D del gene dell'enzima di conversione dell'Angiotensina sembravano non aver alcun ruolo.

Sebbene la prevalenza di xantomi tendinei fosse più alta nel gruppo 2312-3 C>A, l'inclusione della xantomatosi nell'analisi multivariata non cambiava i livelli di significatività. Comunque, anche in un ampio campione italiano di pazienti FH [5] gli xantomi tendinei non erano un fattore di rischio CV indipendente. La presenza di xantomi è correlata all'età e pertanto l'utilizzo di questo criterio non consente una corretta valutazione del rischio nei bambini affetti da FH, così come invece si potrebbe ottenere con l'identificazione di una mutazione ad alto rischio.

In questa analisi abbiamo utilizzato l'IMT carotideo misurato mediante ultrasonografia B-mode ad alta risoluzione come indicatore di malattia,

basandoci su evidenze prospettiche della capacità dell'IMT di predire gli eventi coronarici [19]. Inoltre, Il *mean max* IMT ha dimostrato di essere un end-point affidabile in ampi studi di intervento con farmaci ipocolesterolemizzanti [20,21] ed è comunemente considerato un indicatore dell'estensione del processo aterosclerotico.

Esiste una relazione significativa tra IMT carotideo e la maggior parte dei comuni fattori di rischio CV [10]. Comunque, le differenze in *mean max* IMT tra 2312-3 C>A e altre mutazioni rimanevano significative anche dopo correzione per i principali fattori di rischio CV e per il rapporto TG/HDL-colesterolo, che rappresenta un indicatore della dimensione delle LDL [22]. Il possibile incremento di significatività statistica dovuto alla influenza di fattori correlati all'appartenenza alla stessa famiglia è stato tenuto in considerazione ed è stata effettuata un'analisi sui soli probandi che ha portato ai medesimi risultati di quella condotta sull'intero gruppo. Poiché i livelli di colesterolo basale erano significativamente maggiori nel gruppo 2312-3 C>A rispetto al gruppo con altre mutazioni, è stata effettuata un'analisi di sottogruppo dell'IMT in pazienti con valori di colesterolo plasmatico maggiore di 350 mg/dL, allo scopo di confrontare soggetti con gli stessi valori di colesterolo basale. Sia l'analisi univariata che quella multivariata hanno confermato il ruolo indipendente della mutazione 2312-3 C>A nel determinare il maggior IMT carotideo rispetto ai pazienti con simili valori di colesterolo basale ma portatori di altre mutazioni.

Non è chiaro il motivo per cui la mutazione 2312-3 C>A si associ ad una maggiore aterosclerosi carotidea, indipendentemente dalla quantità di colesterolo circolante. Una possibile spiegazione – che dovrà essere dimostrata – potrebbe trovarsi nel particolare dominio in cui la mutazione si trova: è possibile, infatti, che la mutazione, colpendo la regione di ancoraggio della proteina alla membrana, possa facilitare il distacco dalla membrana cellulare del recettore con la sua particella LDL legata; il complesso solubile recettore-LDL, essendo una struttura ricca in glicidi, verrebbe captata con meccanismo non recettoriale dai fibroblasti [23]. Così, parte delle LDL circolanti dei pazienti portatori della mutazione 2312-3C>A sarebbe associata al recettore solubile, costituendo un complesso che rimarrebbe facilmente intrappolato a livello della parete arteriosa. Tale ipotesi consentirebbe di spiegare perché, a parità di concentrazione plasmatica di colesterolo, i soggetti portatori della 2312-3 C>A hanno un'aterosclerosi carotidea più avanzata dei pazienti portatori di altre mutazioni.

Anche se le famiglie con mutazione 2312-3 C>A non avevano legami di parentela noti fra loro e provenivano da aree diverse del Sud Italia, non possiamo escludere un effetto fondatore. Comunque, il rationale del presente studio era di verificare l'esistenza di una o più mutazioni del LDLr che aiutassero a definire meglio il rischio CV di alcuni pazienti rispetto ad altri parimenti affetti da FH. Ora, se la mutazione del LDLr sia di per sé una causa indipendente di maggiore aterosclerosi, oppure sia solo il marker di un effetto

fondatore, ciò non sminuisce l'importanza della ricerca di mutazioni dotate di un tale effetto.

In conclusione, questo lavoro suggerisce che l'identificazione delle mutazioni del LDLr può essere utile ad inquadrare soggetti FH a rischio particolarmente elevato di aterosclerosi. Ulteriori studi sono necessari per chiarire il possibile meccanismo dell'aumentata aterosclerosi associata in modo indipendente ad alcune mutazioni del LDLr.

BIBLIOGRAFIA

1. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group
(1999) Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolemia: implications for clinical management. *Atherosclerosis*;142:105-112
2. Moorjani S, Roy M, Torres A, Betard C, Gagnè C, Lambert M, Brun M, Davignon J, Lupien P (1993) Mutations of low-density-lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet* 341:1303-1306
3. Graham CA, McLean E, Ward AJM, Beattie ED, Martin S, O'Kane M, Young IS, Nicholls DP (1999) Mutation screening and genotype:phenotype correlation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 147:309-316

4. Gaudet D, Vohl MC, Couture P, Moorjani S, Tremblay G, Perron P, Gagné C, Despres JP (1999) Contribution of receptor negative versus receptor defective mutations in the LDL-receptor gene to angiographically assessed coronary artery disease among young (25-49 years) versus middle-aged (50-64 years) men. *Atherosclerosis* 143:153-161
5. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabbone I, Calandra S (2000) Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor-defective or receptor-negative phenotype. *ATVB* 20:E41-E52
6. Sijbrands EJ, Westendorp RG, Lombardi M P, Havekes LM, Frants RR, Kastelein JJP, Smelt AHM (2000) Additional risk factors influence excess mortality in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 149:421-425
7. Hopkins PN, Stephenson S, Wu LL, Riley WA, Xin Y, Hunt SC (2001) Evaluation of coronary risk factors in patients with heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 87:547-553
8. Descamps OS, Gibeau JP, Leysen X, Van Leuven F, Heller FR. Impact of genetic defects on atherosclerosis in patients suspected of familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest* 2001;31:958-965

9. Pauciullo P, Iannuzzi A, Sartorio R, Irace C, Covetti G, Di Costanzo A, Rubba P (1994) Increased intima-media thickness of the common carotid artery in hypercholesterolemic children. *Arterioscler Thromb* 14:1075-1079
10. Rubba P, Mercuri M, Faccenda F, Iannuzzi A, Irace C, Strisciuglio P, Gnasso A, Tang R, Andria G, Bond MG, Mancini M (1994) Premature carotid atherosclerosis: does it occur in both familial hypercholesterolemia and homocystinuria? - Ultrasound assessment of arterial intima-media thickness and blood flow velocity. *Stroke* 25:943-950
11. Smith SC, Greenland P, Grundy SM (2000) Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention. *Circulation* 101:111-116
12. Nowak J, Nilsson T, Sylvén C, Jogestrand T (1998) Potential of carotid ultrasonography in the diagnosis of coronary artery disease. A comparison with exercise test and variance ECG. *Stroke* 29:439-446
13. Simon Broome Register Group (1991) Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolemia *BMJ* 303:893-896
14. Liguori R, Bianco AM, Argiriou A, Pauciullo P, Giannino A, Rubba P, De Simone V (2001) LDL receptor cDNA sequence analysis in Familial Hypercholesterolemia patients: 5 novel mutations with high prevalence in families originating from Southern Italy. *Hum Mut* 412: Online
15. Tonstad S, Joakimsen O, Bugge-Stensland E, Ose L, Bonna KH, Leren TP (1998) Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial

- hypercholesterolemia mutations and control subjects. *Eur J Clin Invest* 28:971-979
16. Zanchetti A, Crepaldi G, Bond MG, Gallus GV, Veglia F, Ventura A, Mancina G, Baggio G, Sampieri L, Rubba P, Collatina S, Serrotti E (2001) Systolic and pulse blood pressures (but not diastolic blood pressure) are associated with alterations in carotid intima-media thickness in the moderately hypercholesterolemic hypertensive patients of the Plaque Hypertension Lipid Lowering Italian Study. *J Hypertension* 19:79-88
17. Tang R, Hennig M, Thomasson B, Scherz R, Ravinetto R, Catalini R, Rubba P, Zanchetti A, Bond MG (2000) Baseline reproducibility of B-mode ultrasonic measurement of carotid artery intima-media thickness: the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA). *J Hypertension* 18:197-201
18. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK (1997) Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *ATVB* 17:3092-3101
19. O'Leary D, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK (1999) Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *NEJM* 340:14-22
20. Mercuri M, Bond MG, Sirtori CR, Veglia F, Crepaldi G, Feruglio FS, Descovich G, Ricci G, Rubba P, Mancini M, Gallus G, Bianchi G, D'Alò G,

- Ventura A (1996) Pravastatin reduces intima-media thickness progression in an asymptomatic hypercholesterolemic mediterranean population: The Carotid Italian Ultrasound Study. *Am J Med* 101:627-634
21. Furberg CD, Adams HP, Applegate WB, Byington RP, Espeland MA, Hartwell T, Hunninghake DB, Lefkowitz DS, Probstfield J, Riley WA, Young B (1994) Effect of Lovastatin on early carotid atherosclerosis and cardiovascular events. *Circulation* 90:1679-1687
22. Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T, Halimi S (2000) Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal cholesterol levels. *Diabetes Care* 23:1679-1685
23. Zimmermann R, Panzenbock U, Wintersperger A, Levak-Frank S, Graier W, Glatter O, Fritz G, Kostner GM, Zechner R (2001) Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. *Diabetes* 50:1643-1653

Table 1. Fattori di rischio cardiovascolare e xantomatosi tendinea nei 102 pazienti dello studio.

	Pazienti con mutazione (n=82)	Pazienti senza mutazione (n=20)
Età (anni)	37 ± 2	45 ± 4
Sesso (% di donne)	49	65
INDICE DI MASSA CORPOREA (KG/M ²)	25.4 ± 0.5	24.8 ± 0.7
Colesterolo basale (mg/dL)	375 ± 7.7	414 ± 27.1
Trigliceridi (mg/dL)	116 ± 8.9	160 ± 26.7
HDL-Colesterolo (mg/dL)	46 ± 1.5	46 ± 2.3
Tg/HDL- Colesterolo	1.09 ± 0.09	1.86 ± 0.45
CHOLESTEROL-YEAR SCORE (mmol/L-anno)	382 (248-473)	410 (270-542)
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	127 ± 3	129 ± 4
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	77 ± 1	81 ± 3
Fumo di sigaretta (%)	18	16
Ipertensione arteriosa (%)	23	37
Eventi cardiovascolari (%)	14	16
Xantomi tendinei (%)	16	5
Mean max IMT	0.90 ± 0.04	0.91 ± 0.07

I valori rappresentano le medie ± Errore Standard della Media. Il Cholesterol-year score è espresso come mediana e range interquartile.

Tg indica i Trigliceridi.

Tavola 2. Fattori di rischio cardiovascolare e xantomatosi tendinea: confronto fra portatori della mutazione 2312-3 C>A e portatori di altre mutazioni del LDLr.

	Mutazione 2312-3C>A (N=24)	Altre mutazioni (N=58)
Età (anni)	38 ± 4	37 ± 2
Sesso (% di donne)	42	52
INDICE DI MASSA CORPOREA (KG/M ²)	25.9 ± 0.9	25.2 ± 0.6
Colesterolo basale (mg/dL)	418 ± 19.35 [*]	356 ± 11.6
Trigliceridi (mg/dL)	123 ± 15.1	112 ± 9.8
HDL-Colesterolo (mg/dL)	49 ± 3.5	48 ± 1.9
Tg/HDL- Colesterolo	1.28 ± 0.22	1.01 ± 0.09
CHOLESTEROL-YEAR SCORE (mmol/L-anno)	437 (254-640)	357 (242-424)
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	130 ± 6	126 ± 3
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	76 ± 2	77 ± 2
Fumo di sigaretta (%)	17	18
Ipertensione arteriosa (%)	25	22
Eventi cardiovascolari (%)	22	11
Xantomi tendinei (%)	29 [†]	9
Mean max IMT	1.05 ± 0.08 [‡]	0.82 ± 0.04

I valori rappresentano le medie ± Errore Standard della Media. Il Cholesterol-year score è espresso come mediana e range interquartile. Tg indica i Trigliceridi.

^{*}p=0.002; [†]p=0.027; [‡]p=0.021

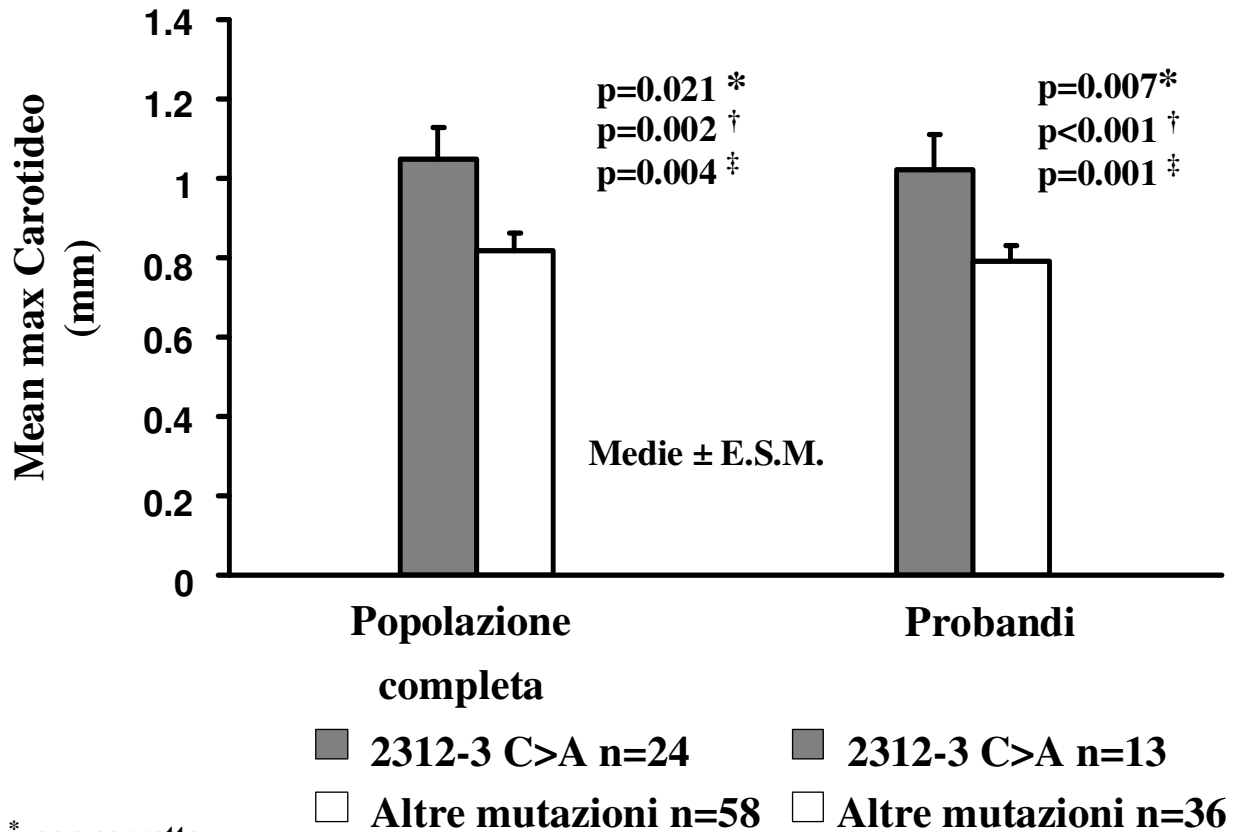
Table 3. Fattori di rischio cardiovascolare e xantomatosi tendinea: confronto fra probandi con mutazione 2312-3 C>A e probandi con altre mutazioni del LDLr.

	Mutazione 2312-3C>A (N=13)	Altre mutazioni (N=36)
Età (anni)	35 ± 4	37 ± 2
Sesso (% di donne)	46	61
INDICE DI MASSA CORPOREA (KG/M ²)	26.3 ± 1.4	24.1 ± 0.7
Colesterolo basale (mg/dL)	402 ± 19.4 [*]	356 ± 11.6
Trigliceridi (mg/dL)	110 ± 19.6	102 ± 8
HDL-Colesterolo (mg/dL)	47 ± 5	50 ± 2.3
Tg/HDL- Colesterolo	1.21 ± 0.30	0.98 ± 0.1
CHOLESTEROL-YEAR SCORE (mmol/L-anno)	334 (223-440)	339 (240-394)
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	128 ± 5	126 ± 3
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	77 ± 2	77 ± 2
Fumo di sigaretta (%)	8	17
Ipertensione arteriosa (%)	15	20
Eventi cardiovascolari (%)	15	9
Xantomi tendinei (%)	39 [†]	6
Mean max IMT	1.02 ± 0.09 [‡]	0.79 ± 0.04

I valori rappresentano le medie ± Errore Standard della Media. Il Cholesterol-year score è espresso come mediana e range interquartile. Tg indica i Trigliceridi.

^{*}p=0.028; [†]p=0.004; [‡]p=0.007

Mean max carotideo nella popolazione intera e nei soli probandi: confronto tra 2312-3 C>A vs altre mutazioni



* non corretto

† corretto per età, sesso, cholesterol-year score

‡ corretto per età, sesso, cholesterol-year score, pressione arteriosa sistolica, fumo

Fig.1