



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI “ALDO MORO”

Dipartimento di Medicina di Precisione e Rigenerativa e Area Jonica (DIMEPREJ)

Dottorato di Ricerca in

“Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Oncologia”

XXXVII Ciclo

Coordinatore: Prof. J.F. Desaphy

SSD: BIO14 Farmacologia

**“RICERCA E VALIDAZIONE DI BIOMARCATORI PER LA
IDENTIFICAZIONE PREVENTIVA ED IL MONITORAGGIO DEL
TRATTAMENTO FARMACOLOGICO IN SOGGETTI AD ALTO RISCHIO
DI STROKE CRIPTOGENICO”**

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Monica Montagnani

Dottoranda:

Dott.ssa Antonietta Scaringella

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1. Lo Stroke Criptogenico	3
1.2. Il Forame Ovale Pervio (PFO) e la teoria dell'embolismo paradossso	8
1.3. La Fibrillazione Atriale (FA) e la Fibrosi Atriale (AFib) nello stroke criptogenico	10
1.4. Le condizioni trombofiliche nella predisposizione allo stroke criptogenico	13
1.5. Il ciclo dei folati e la loro rilevanza nel metabolismo cellulare	17
1.6. Relazione tra iperomocisteinemia, disfunzione endoteliale e alterazione delle EPCs	21
2. OBIETTIVO DELLA TESI	26
3. MATERIALI E METODI	27
3.1. Popolazione dello studio e criteri di arruolamento	27
3.2. Mappa di voltaggio atriale sinistro	29
3.3. Analisi di laboratorio cliniche	29
3.4. Analisi del rapporto L-Arg/ADMA	30
3.5. Analisi delle citochine circolanti	30
3.6. Purificazione di EPCs	31
3.7. Analisi del fenotipo cellulare	31
3.8. Saggio di migrazione <i>in vitro</i>	32
3.9. Saggio di angiogenesi <i>in vivo</i>	32
3.10. Analisi statistica	33
4. RISULTATI	34
4.1. Caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti arruolati	34
4.2. Correlazione tra genotipo MTHFR e estensione del grado di fibrosi atriale (AFib)	36
4.3. Analisi multivariata tra grado di AFib e parametri laboratoristici clinici.	36
4.4. Relazione tra mutazione MTHFR e indici di disfunzione endoteliale	38
4.5. Relazione tra mutazione MTHFR, grado di infiammazione e profilo trombofilico	38
4.6. Indici quantitativi di cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPCs)	39
4.7. Relazione tra mutazione MTHFR e indici di funzionalità delle EPCs	40
4.8. Relazione tra mutazione MTHFR e capacità angiogenica delle EPCs	41
4.9. Effetti di alterazione farmacologicamente indotta sul ciclo dei folati.	42
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	44
6. BIBLIOGRAFIA	51

1. INTRODUZIONE

1.1. Lo Stroke Criptogenico

L'ictus o stroke continua a rappresentare una sfida clinica di grande rilievo, con una prevalenza globale di 101 milioni di casi e un'incidenza annua di 122 milioni. È la seconda causa di morte e la terza di disabilità a livello mondiale [1], rendendo quindi fondamentale individuare il peso specifico dei singoli fattori di rischio e la relazione che li coinvolge per programmare strategie terapeutiche efficaci in prevenzione primaria e secondaria. Lo stroke è tradizionalmente definito come una sindrome clinica caratterizzata da deficit neurologici con insorgenza acuta e durata superiore a 24 ore; tale soglia temporale distingue lo stroke dall'attacco ischemico transitorio (TIA), un episodio di deficit neurologico focale o deficit visivo causato da una riduzione temporanea dell'apporto ematico che si risolve spontaneamente entro 24 ore. Le complicanze a breve termine dello stroke includono insufficienza respiratoria, scompenso cardiaco, ipertensione, perdita di coscienza, alterazioni metaboliche, edema cerebrale e ipertensione endocranica. Le sequele permanenti possono comprendere deficit motori e sensitivi, compromissione del linguaggio, deficit delle funzioni cognitive superiori, ansia e depressione. Lo stroke può essere di natura ischemica (stroke ischemico) o emorragica (emorragia intraparenchimale o subaracnoidea). Lo stroke ischemico rappresenta il 70-80% di tutti i casi e, dal punto di vista eziopatogenetico, viene classificato secondo i criteri TOAST [2] (**Fig.1**) in:

- Aterotrombotico o "malattia dei grossi vasi" (25-40%);
- Lacunare o "malattia dei piccoli vasi" (15-20%);
- Cardioembolico (15-20%);
- Altre cause (<5%);
- Cause sconosciute o indeterminate, "criptogenico" (15-25%).

Questa classificazione si basa sull'accuratezza delle tecniche diagnostiche disponibili e costituisce la base per le strategie di prevenzione secondaria.

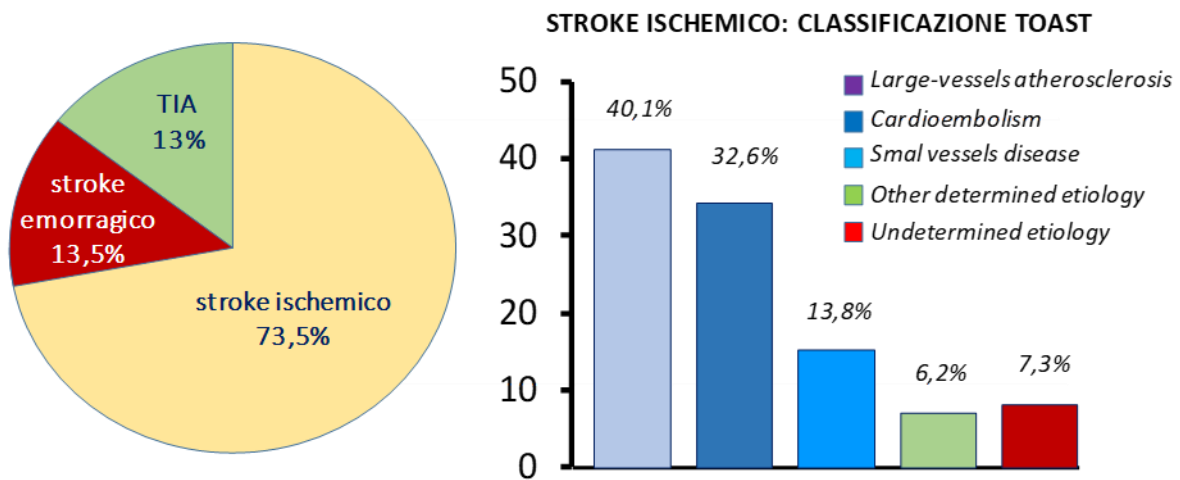


Figura 1. La classificazione TOAST-Trial ORG 10172 in Acute Stroke Treatment denota cinque eziologie di ictus ischemico.

La diagnosi di stroke integra i dati raccolti in anamnesi con la valutazione dei fattori di rischio, esame obiettivo e routine ematochimica, TC e RMN per la caratterizzazione della lesione e, successivamente, ecografia e ecodoppler dei vasi epiaortici extracranici, ecodoppler transcranico, angio-TC, angio-RM, angiografia digitale, ecocardiografia transtoracica e/o transesofagea.

Sebbene queste tecniche aiutino a identificare lesioni aterosclerotiche (**Fig.2**), fonti emboligene o altri fattori causali, il fenotipo di stroke non è sempre indicativo del movente patogenetico specifico, suggerendo che attori fisiopatogenetici multipli possono concorrere alla patogenesi dello stroke. In effetti, nel 25% dei casi, nonostante la presenza di una lesione ischemica accertata, la causa eziopatogenetica rimane sconosciuta, portando alla definizione di "stroke criptogenico".

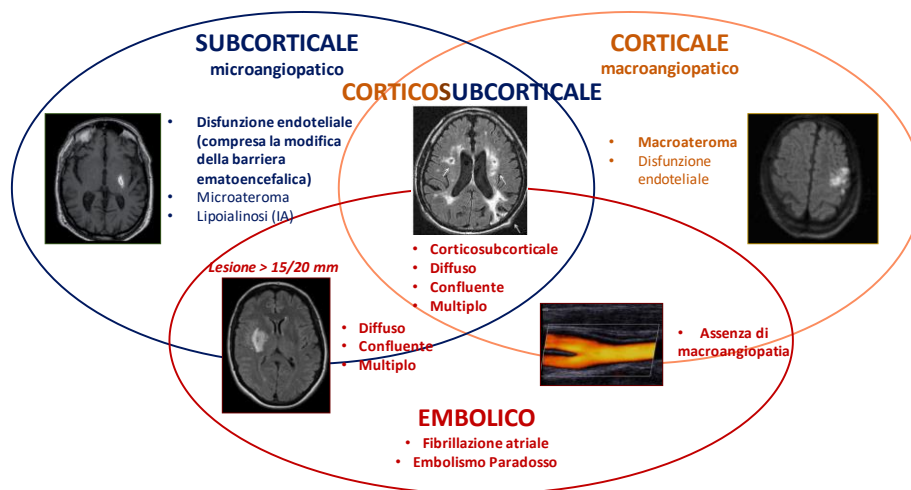


Figura 2. Definizione dei sottotipi di stroke in base alle caratteristiche della lesione su base diagnostica strumentale.

Nel 2014, è stata introdotta la definizione di Embolic Stroke of Undetermined Source (ESUS) che rappresenta un sottotipo di stroke criptogenico [3]. L'ESUS è caratterizzato da una lesione ischemica non-lacunare, in assenza di aterosclerosi con stenosi $\geq 50\%$ in arterie che irrorano l'area ischemica e senza fonti di cardioembolismo ad alto rischio, per cui non è stata identificata un'altra causa specifica.

Gli ESUS costituiscono circa il 17% degli stroke ischemici e colpiscono più frequentemente pazienti più giovani rispetto ad altri tipi di stroke, con una manifestazione clinica generalmente più moderata e un tasso di recidiva annuo stimato attorno al 5%.

Le principali fonti di embolismo associate all'ESUS includono fibrillazione atriale (FA) parossistica silente, cardiomiopatia atriale, patologia del ventricolo sinistro, forame ovale pervio (PFO) e altre anomalie del setto interatriale, aterosclerosi dei tronchi sovraortici, malattie valvolari, tumori (come il mixoma atriale) e ipercoagulabilità (**Fig.3**). In particolare, il rallentamento del flusso e la stasi ematica soprattutto nelle cavità atriali sembrano giocare un ruolo cruciale nella trombogenesi.

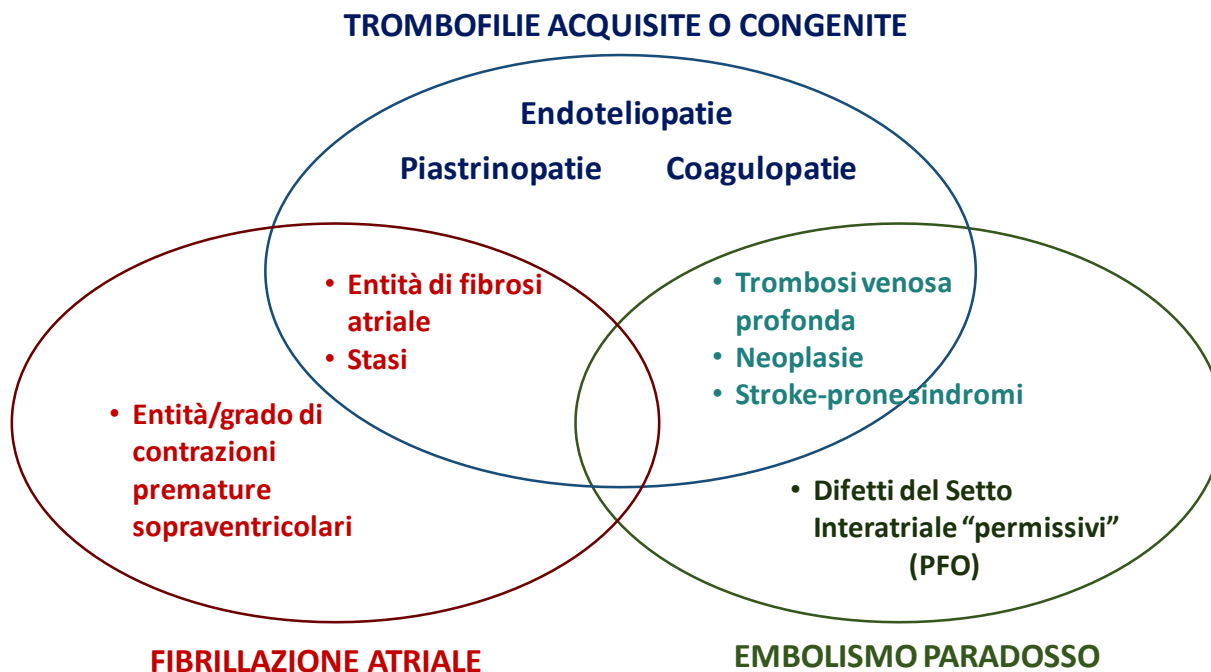


Figura 3. *Principali condizioni patologiche eziologicamente associate all'ESUS.*

Ciascuna delle precedenti condizioni rappresenta sicuramente un fattore di predisposizione, sebbene per nessuna di esse sia al momento possibile individuare un chiaro rapporto causa-effetto. Le incertezze relative alla patogenesi dell'ESUS si riverberano nella mancanza di biomarcatori predittivi, rendendo difficile identificare i pazienti ad alto rischio. Pesare il ruolo relativo di ciascun attore patogenetico è inoltre fondamentale per mettere in atto la terapia più efficace nei singoli casi [4].

Al momento attuale, i tre approcci terapeutici in grado di ridurre l'incidenza e la ricorrenza di stroke criptogenico comprendono la terapia medica, metabolica a base di folati a basse dosi, antiaggregante e anticoagulante [5], che può affiancarsi all'ablazione di FA quando questa sia clinicamente espressa [6], e terapie chirurgiche di chiusura del PFO tramite *device* [7] (**Fig.4**).

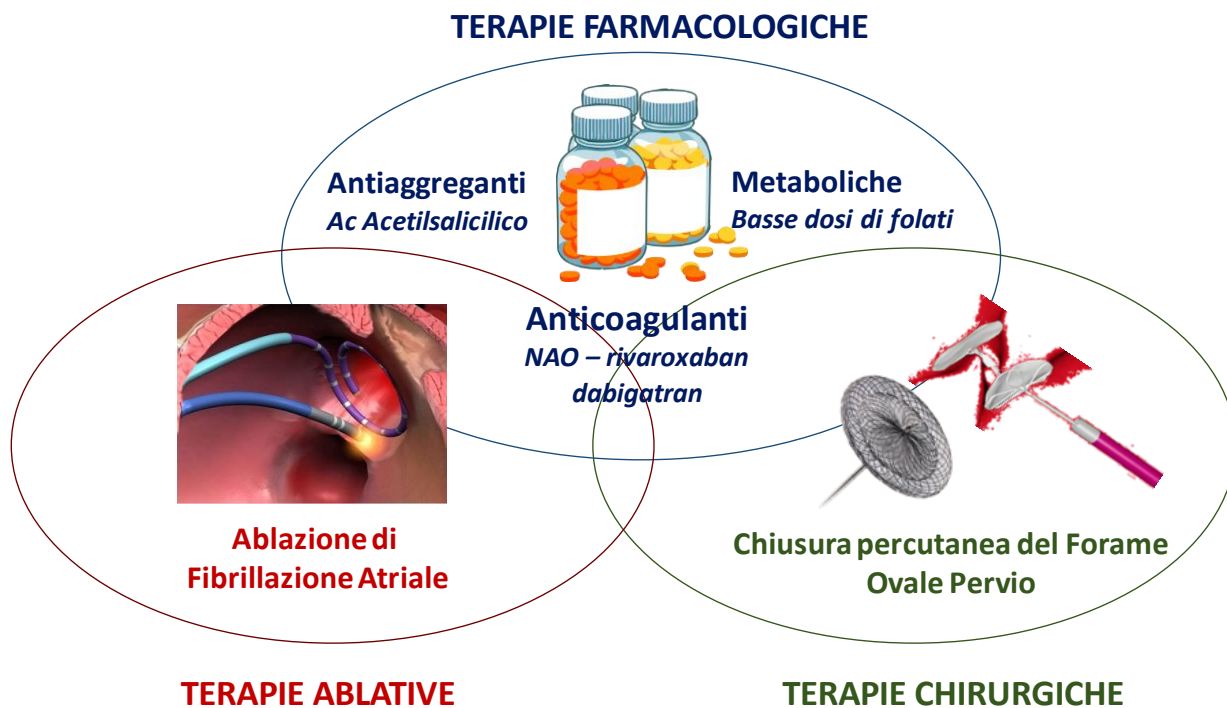


Figura 4. *Approcci terapeutici proposti per ridurre l'incidenza e la ricorrenza di stroke criptogenico.*

Tuttavia, queste terapie ne escludono altre o possono aggravarne di preesistenti. Per esempio, la chiusura del PFO con *device* impedisce una successiva ablazione di FA o può indurre l'espressione clinica di una FA costringendo a prescrivere una terapia anticoagulante che poteva sin dal principio essere la scelta migliore nel caso specifico, in cui la chiusura chirurgica poteva pertanto essere evitata [8].

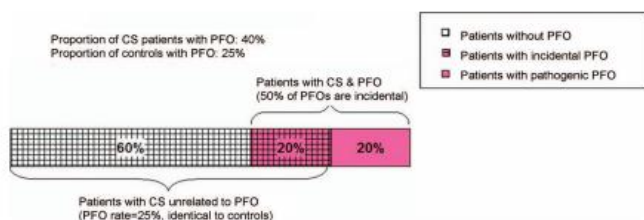
Sulla base di questi presupposti, la necessità di approfondire quale substrato comune possa collegarsi alla propensione allo stroke criptogenico è fondamentale per individuare potenziali biomarcatori utili alla identificazione precoce del rischio, alla stratificazione dei soggetti più vulnerabili, e alla possibilità di eseguire il *follow-up* delle terapie messe in atto nei singoli pazienti. Nei prossimi paragrafi vengono descritte le più recenti acquisizioni in merito a fattori di rischio che storicamente sono stati associati alla patogenesi di stroke criptogenico.

1.2. Il Forame Ovale Pervio (PFO) e la teoria dell'embolismo paradosso

Il forame ovale è una comunicazione già esistente tra l'atrio destro e l'atrio sinistro del cuore durante la vita fetale, quando il sangue ossigenato arriva all'atrio destro attraverso la vena ombelicale, il dotto di Aranzio e la vena cava inferiore e shuntato direttamente all'atrio sinistro attraverso il forame ovale. Ciò evita il passaggio attraverso i polmoni non ancora funzionanti e il cui circolo è caratterizzato da alta pressione dovuta alla vasocostrizione delle arteriole polmonari. Questo sistema consente al sangue ossigenato di essere distribuito al corpo attraverso il circolo sistemico, che è a bassa pressione grazie alla continuità con la placenta. Alla nascita, l'ossigenazione del sangue nei polmoni, grazie alla ventilazione e alla vasodilatazione delle arteriole polmonari, provoca una riduzione della pressione nel circolo polmonare e un incremento della pressione nell'atrio sinistro, a causa dell'aumento del ritorno venoso. Tale cambiamento pressorio induce la chiusura del forame ovale, che inizialmente avviene in modo funzionale e successivamente diventa anatomica. Circa il 25-27% della popolazione presenta un forame ovale che non si chiude completamente, risultando così pervio (PFO). Questa condizione, sebbene spesso asintomatica, può essere rilevata mediante ecocardiografia doppler transtoracica con contrasto salino (bubble test), che visualizza il passaggio di microbolle attraverso il forame ovale, o tramite ecodoppler transcranico, che impiega un mezzo di contrasto salino per identificare microsegnali embolici nelle arterie cerebrali. Il PFO è generalmente asintomatico e viene spesso diagnosticato incidentalmente o in seguito a eventi come ictus, tromboembolismo, emicrania, malattia da decompressione e sindrome da platipnea-ortodeossia [9]. L'interesse maggiore si concentra sull'associazione tra PFO e ictus, in particolare lo stroke criptogenico, che potrebbe derivare da un "embolismo paradosso" – ovvero il passaggio di un embolo dal circolo venoso al circolo sistemico attraverso il PFO [10, 11] (**Fig.5**).

EMBOLISMO PARADOSSO (4% di SC) ≠ PFO (40% di SC)

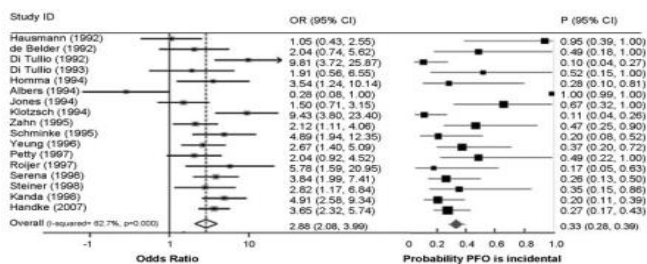
Teoria Bayesiana per la stima di PFO incidentale nello SC



PFO INCIDENTALE NELLO SC ≈50%

EJ strokes 1975, London
J Neurol Sci 2008; 275: 121-127

Meta-analisi studi caso-controllo per la stima di PFO incidentale nello SC



PFO INCIDENTALE NELLO SC ≈33%

Stroke. 2010 Oct;41(10 Suppl):S26-30

Figura 5. Uno degli errori più comuni deriva dall'identificazione di PFO in presenza di stroke criptogenico (SC) con l'embolismo paradossale. La teoria Bayesiana della probabilità composta provvede alla dimostrazione matematica che il 50% dei PFO possono essere incidentali anche nei pazienti con SC. Anche gli studi meta-analitici concordano nel ritenere che un PFO possa essere incidentale nel 30% dei pazienti con SC.

Studi mostrano che la prevalenza di PFO è più alta nei pazienti con stroke rispetto alla popolazione generale, e che è particolarmente elevata nei casi di stroke criptogenico rispetto agli stroke con cause note, oltre a rappresentare una condizione di rischio significativa per lo stroke criptogenico in pazienti sotto i 55 anni.

Tuttavia, l'associazione tra PFO e stroke è al momento controversa, e le incertezze maggiori riguardano l'efficacia del trattamento proposto. Soprattutto in contesti di eventi cerebrovascolari, viene prevista la chiusura del difetto mediante tecniche percutanee mininvasive seguita da profilassi antiaggregante o anticoagulante. La superiorità della chiusura del PFO rispetto alla sola terapia medica rimane dibattuta, con risultati differenti anche nella prevenzione delle recidive di stroke [12].

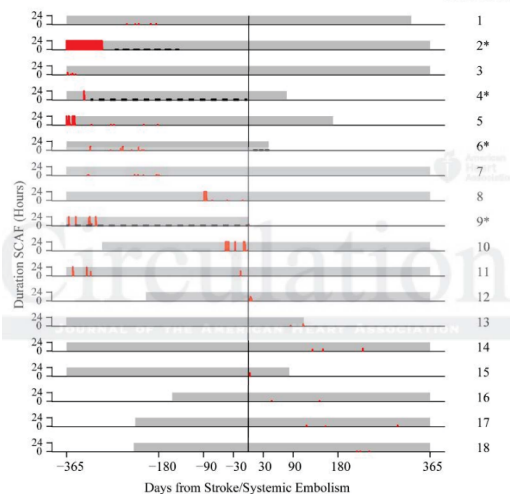
1.3. La Fibrillazione Atriale (FA) e la Fibrosi Atriale (AFib) nello stroke criptogenico

La FA è una tachiaritmia sopraventricolare caratterizzata da un'attività elettrica disorganizzata e caotica degli atri, che porta a una contrazione inefficace. È la forma più comune di aritmia sostenuta, con una prevalenza globale di circa il 2-4% [13]. Questo disturbo è associato a un'alterazione significativa nella conduzione elettrica e nella struttura dell'atrio. Dal punto di vista biologico, la FA è sostenuta da meccanismi di rientro e attività di foci ectopici, in particolare nelle vene polmonari, che generano e perpetuano l'aritmia. Questi foci ectopici, che sono aree di attività elettrica anomala, scatenano e mantengono l'aritmia attraverso impulsi elettrici irregolari. Secondo la teoria classica che collega la FA allo stroke, la disorganizzata attività contrattile dell'atrio genererebbe stasi ematica, a sua volta responsabile della formazione di trombosi in situ e successivo potenziale embolismo cerebrale. Recenti lavori suggeriscono invece che il ruolo della FA nello stroke criptogenico sia enormemente più complicato: innanzi tutto, molti criteri per stabilire relazioni causa-effetto come ad esempio forza dell'associazione, consistenza, specificità, correlazione temporale (**Fig.6**), gradiente biologico, plausibilità, coerenza, concordanza sperimentale, analogia [14], non sono completamente soddisfatti: sebbene un singolo breve episodio di FA sia associato ad un incremento di 2 volte del rischio di stroke in pazienti anziani con fattori di rischio cardiovascolari (FRCV) [15], i pazienti giovani e sani non mostrano necessariamente un incremento del rischio di stroke. L'ipotesi meccanicistica in accordo alla quale lo stroke, per essere generato dalla stasi atriale, necessita di una durata sostenuta dell'aritmia e di una correlazione temporale con la stessa è stata egualmente messa in discussione dai risultati di alcuni trial basati su moderne tecnologie impiantabili di monitoraggio cardiaco (pacemakers e i loop recorders) [15,16]. Tuttavia, il rimodellamento elettroanatomico che si genera in seguito agli episodi di FA può risultare fondamentale per un aumento del rischio di stroke [16]. Valutati complessivamente, questi riscontri suggeriscono che la forte associazione tra FA e stroke coinvolge altri fattori [17]. Su questo terreno di analisi, le più premature entità patogenetiche coinvolte nello stroke e nella FA sono individuate nella fibrosi atriale (AFib) [18], strettamente correlata alla disfunzione endoteliale [19] di cui si parlerà nei successivi paragrafi.

Figura 6. Una subanalisi del trial ASSERT, a sua volta concorde con i risultati del trial TREND ha dimostrato la mancanza di correlazione temporale diretta tra insorgenza di stroke e insorgenza di FA.

FIBRILLAZIONE ATRIALE - Risultati Clinical Trial ASSERT e TREND

Circulation 2014. 129(21): 2094-2099.



BASELINE CHARACTERISTICS

- 2580 patients
- Mean age: 76 yrs
- Mean CHADS2 score: $2,8 \pm 1,2$
- Mean follow-up 2,5 yrs

RESULTS

- 51 patients experimented stroke
 - 26 out of the afore-mentioned 51 patients (51%) had subclinical atrial fibrillation
 - 4 out of the afore-mentioned 51 patients patients (8%) had a SCAF detected within 30 days before stroke onset.
 - Only 1 patient out of the afore-mentioned 51 patients experimented a continuous episode of SCAF while stroke onset, lasting 2.7 hours

CONCLUSION

- Null AF thromboembolic potential
- No temporal relationship

La AFib, un processo di deposizione e accumulo di tessuto fibroso nel miocardio atriale, altera la struttura e la funzione dell'atrio, contribuendo alla disorganizzazione dell'attività elettrica. La fibrosi è mediata da fibroblasti cardiaci attivati da fattori di crescita e infiammazione, e si associa a un incremento del rischio di trombogenesi e di eventi tromboembolici come l'ictus ischemico (**Fig.7**).

Alcuni studi suggeriscono che le alterazioni nella differenziazione dei progenitori ematopoietici, come un aumento dei progenitori fibrocitici e monocitici rispetto a quelli endoteliali, potrebbero essere coinvolte nella patogenesi della FA e nella sua complessità clinica.

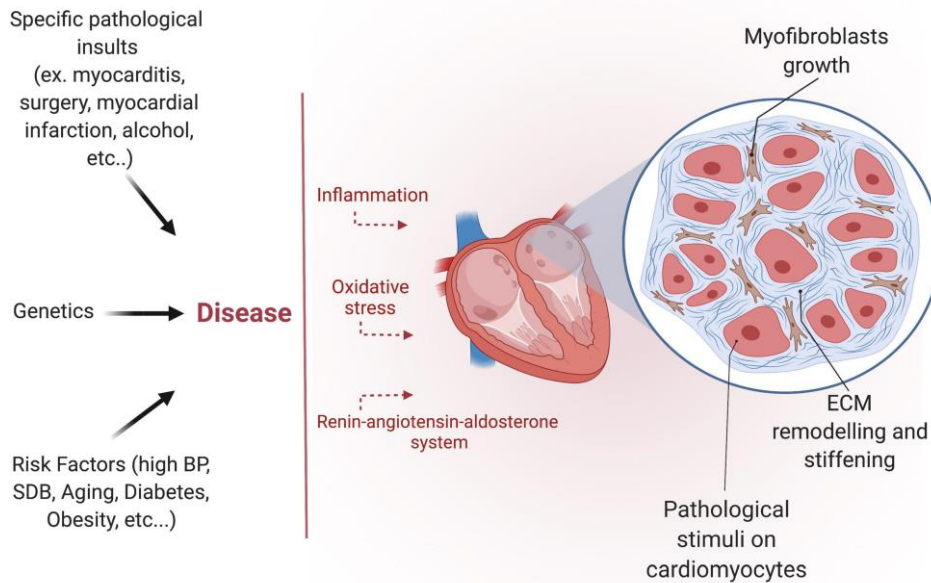


Figura 7. La fibrosi atriale definisce un processo in cui fattori di crescita e infiammazione stimolano il deposito e l'accumulo di fibroblasti che contribuiscono e al rimodellamento strutturale dell'atrio, e che si associa a FA, trombogenesi e aumentato rischio di stroke (da: *Front. Cardiovasc. Med.*, 2022, 9, Section *Cardiac Rhythmology*).

La frequente coesistenza di FA con anomalie anche atriali, disfunzione endoteliale, stati di ipercoagulabilità e fibrosi intesa come ipocontrattilità atriale [19, 20] ha indotto alcuni autori [21] a introdurre la definizione di cardiomiopatia atriale (AC), indipendentemente dalla presenza concomitante di FA [22]. La AFib sarebbe anche molto rappresentata nei pazienti affetti da FA rispetto a pazienti affetti da valvola mitrale reumatica in ritmo sinusale; certe proteine transmembrana come la TRCP3 e proteine pro-fibrotiche come il TGF- β and Col-I sarebbero ugualmente iperesprese. Malgrado i numerosi tentativi di correlazione diretta, le condizioni sopra descritte non giustificano, da sole, la comparsa di stroke. La ricerca si sposta quindi nella valutazione di meccanismi biomolecolari che potrebbero sottendere alla complessa alterazione fisiopatologica. In questo panorama grande interesse rivestono le condizioni che promuovono lo sviluppo di trombofilie, prima fra tutte la disfunzione endoteliale (intesa come una condizione favorente l'iperaggregabilità piastrinica e la formazione di trombi) e le anomalie del ciclo dei folati, un pathway ubiquitario indispensabile per garantire la corretta maturazione e replicazione di tutte le popolazioni cellulari.

1.4. Le condizioni trombofiliche nella predisposizione allo stroke criptogenico

I disturbi trombofilici comprendono deficit proteici parziali per mutazioni eterozigoti dei geni che codificano per fattori nella cascata della coagulazione e della stabilità del coagulo. Ma il substrato endoteliale è fondamentale perché il trombo possa generarsi, ed è quindi la fisiologia dell'endotelio che riveste particolare importanza.

Disfunzione endoteliale - L'endotelio, che riveste i vasi sanguigni, linfatici e le camere cardiache, è fondamentale per la regolazione dell'omeostasi vascolare e la fisiologia degli organi. In risposta a stimoli umorali, fisici e chimici, l'endotelio produce mediatori che interagiscono con le cellule muscolari lisce della tonaca sottostante e con le piastrine, partecipando in maniera fondamentale alla regolazione del tono vasale, alla modulazione dell'emostasi, al controllo della risposta infiammatoria e ai processi di angiogenesi e vasculogenesi. L'endotelio regola il tono dei vasi in risposta a stimoli come ipossia e shear stress, producendo molecole vasodilatatrici come l'ossido nitrico (NO) e la prostaciclina (PGI), e vasocostrittrici come l'endotelina-1 (ET-1) e l'angiotensina-II (Ang-II). In condizioni normali i mediatori sono prodotti e rilasciati secondo un complesso balance che favorisce le attività pro-dilatanti al fine di garantire la normale perfusione degli organi e tessuti. Il mediatore che meglio caratterizza la funzionalità endoteliale è rappresentato dall'NO, la cui emivita varia dai 5 ai 10 secondi. Diffondendo attraverso l'endotelio, raggiunge le cellule muscolari lisce dove provoca un aumento del GMPc, a sua volta responsabile del rilassamento della tonaca muscolare. Questo mediatore gassoso che non può essere immagazzinato preventivamente nei compartimenti cellulari viene sintetizzato in risposta a stimoli chimici, fisici e ormonali, in presenza di adeguate quantità di substrato e cofattori. La produzione di NO avviene per trasformazione dell'amminoacido L-arginina (L-Arg) in citrullina. L'ossidazione del nitrogruppo terminale guanidico della L-Arg viene catalizzata dall'enzima NO-sintasi (NOS), un enzima dimerico, di cui sono note tre isoforme: quella costitutiva endoteliale (eNOS), quella inducibile (iNOS), e quella neuronale (nNOS). La corretta attività di tutte le isoforme di NOS e la conseguente biosintesi di NO richiedono la presenza di alcuni cofattori, tra cui NADPH, la flavina mononucleotide (FMN), la

flavina adenina di nucleotide (FAD), l'eme e la tetraidrobiopterina (BH4). Nel processo di trasformazione, infatti, la L-Arg viene prima idrossilata e successivamente sottoposta ad ossidazione attraverso due fasi che richiedono ossigeno (**Fig.8**).

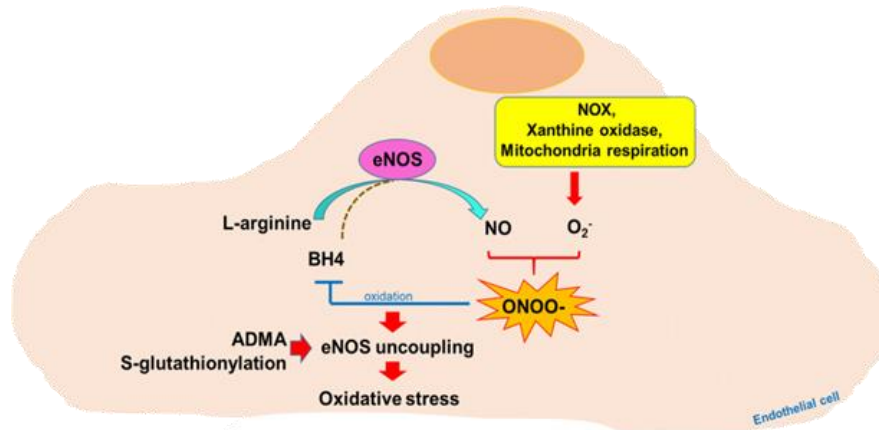


Figura 8. In condizioni fisiologiche la cellula endoteliale sintetizza il principale mediatore, Ossido Nitrico (NO), attraverso un sistema che prevede il coinvolgimento dell'enzima eNOS, adeguate quantità di substrato (L-Arg) e presenza di cofattori (BH4). Alterazioni di questa complessa machinery esitano nella ridotta biodisponibilità di NO e nella concomitante aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con generazione di un circolo vizioso che incrementa il grado di stress ossidativo e di disfunzione endoteliale.

La definizione più accreditata di disfunzione endoteliale riguarda la condizione in cui le cellule endoteliali non garantiscono più la corretta produzione e liberazione di NO, contemporaneamente alterando l'equilibrio dei mediatori ad azione contrapposta e favorendo quindi una generale alterazione dell'omeostasi vascolare. Questa condizione può conseguire a difetti specifici dell'enzima eNOS, ma anche a carenza di substrati e/o cofattori: ad esempio in presenza di bassi livelli di BH4, l'attivazione della NOS determina un disaccoppiamento (NOS uncoupling) tra riduzione dell'ossigeno e ossidazione dell'L-Arg, comportando una riduzione nei livelli di NO ed un concomitante aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (radicali liberi, ROS) e successivo stress ossidativo. I ROS, a loro volta, peggiorano la funzione endoteliale riducendo ulteriormente la biodisponibilità di NO per formazione di perossinitriti, che ostacolano la sintesi ex novo di NO. Nelle fasi iniziali di danno funzionale dell'endotelio (attivazione endoteliale) dovuta alla esposizione di molecole di adesione (ICAM1, VCAM1), si crea quindi uno squilibrio tra fattori

protettivi e fattori procoagulanti, proinfiammatori e proliferativi che predispongono all'aterogenesi. In questa evoluzione verso la disfunzione endoteliale conclamata, lo stress ossidativo viene considerato uno dei meccanismi patogenetici principali della disfunzione endoteliale e correla in modo significativo con lo sviluppo di eventi cardio/cerebrovascolari [23, 24]. Lo stress ossidativo, inoltre, ostacola i processi riparativi dell'endotelio, normalmente sostenuto dalla disponibilità delle cellule endoteliali progenitrici circolanti (EPCs).

Cellule endoteliali progenitrici circolanti - Le EPCs sono cellule immature caratterizzate dall'espressione di markers specifici, quali CD34, CD133 e VEGFR2 che partecipano alla vasculogenesi e alla riparazione dei vasi danneggiati. La mobilitazione delle EPCs sembra essere in parte NO-dipendente, e la loro numerosa e funzionalità viene influenzata da molteplici fattori di rischio cardiovascolare. Farmaci come le statine e i sartani, nonché alcuni trattamenti per il diabete, possono migliorare la funzione e il numero di EPCs. mentre la riduzione della produzione di NO, l'ossidazione della BH4 e lo stress ossidativo [25] interferiscono con il reclutamento, la differenziazione e la funzione di tali cellule. È molto interessante notare come un meccanismo consolidato in caso di disfunzione endoteliale, chiamato endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) e che prevede la transdifferenziazione fenotipica della EPC in cellula mesenchimale, sia molto attivo negli atri di pazienti fibrillanti [26] (**Fig.9**).

Questo meccanismo mette in relazione diretta la disfunzione endoteliale e la fibrosi atriale nella loro comune propensione allo stroke, indipendentemente dalla stasi atriale. Inoltre, l'iperomocisteinemia presenta una correlazione inversa con il numero di progenitori endoteliali circolanti [27].

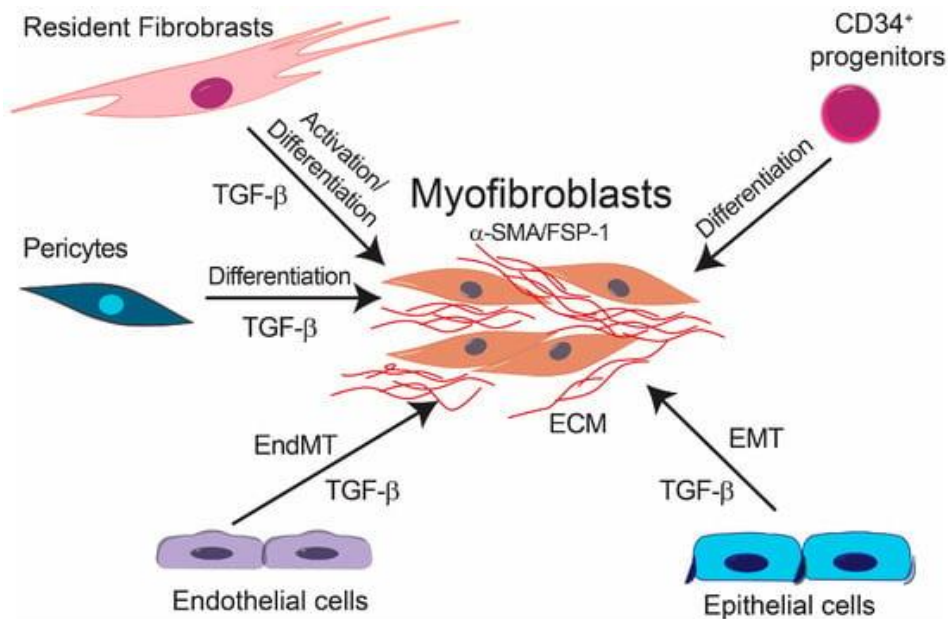


Figura 9. Accanto ai fibroblasti residenti, periciti, cellule epiteliali, le cellule endoteliali ed i loro progenitori circolanti possono acquisire un fenotipo mesenchimale ed esprimere marcatori tipici della differenziazione miofibroblastica come α -SMA, vimentina e collagene, mentre riducono l'espressione dei marcatori delle cellule endoteliali, come la caderina endoteliale vascolare (VE-caderina), attraverso un processo noto come transizione endoteliale-mesenchimale (EndMT). ECM, matrice extracellulare; FSP, proteina specifica dei fibroblasti; TGF- β , fattore di crescita trasformante- β ; α -SMA, α -actina del muscolo liscio. (da: *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18(10), 2157)

Cellule della serie rossa - Sebbene possa apparire sorprendente, anche valori riferibili ai globuli rossi possono rappresentare un tassello nel complesso mosaico dei fattori patogenetici associabili allo stroke. I disordini della crasi ematica della serie rossa sono individuabili nei valori della emoglobina (Hb), del volume corpuscolare medio (MCV) e dalla dispersione volumetrica corpuscolare (RDW), usati nella pratica clinica per rivelare aberrazioni morfologiche del globulo rosso. I deficit di vitamina B12 e folati producono una anemia macrocitica (anemia a grandi cellule) nella quale l'RDW è elevato in circa i due terzi dei casi. Una variazione delle dimensioni del globulo rosso è un marcatore di anemia sideropenica tanto da essere presente virtualmente in tutti i casi. Nel caso delle anemie miste carenziali di ferro e folati un mix di grandi e piccole cellule causa una grande dispersione volumetrica. La condizione di elevazione dell'indice RDW va sotto il nome di anisocitosi [28]. Intuitivamente, presupponendo una sottesa perturbazione del ciclo dei folati, le condizioni che portano ad un aumento di MCV e RDW dovrebbero in parallelo essere caratterizzate da vari gradi di disfunzione endoteliale. Se non è sorprendente che il valore di RDW sia in grado di predire i livelli di omocisteina in soggetti

con anemie da difetto dei folati, è interessante sapere che l'RDW può predire i livelli di omocisteina anche in una popolazione adulta senza deficit di folati e vit. B12 [29]. Recentemente, un aumento dell'RDW è stato osservato in pazienti con malattie cardiovascolari incluso l'infarto del miocardio, la coronaropatia, e lo scompenso cardiaco [30, 31]. Da una analisi condotta su 27124 pazienti di media età è stato dimostrato che l'RDW è associato con l'incidenza di FA indipendentemente dalla condizione cardiovascolare, nutrizionale o ematologica [32]. Queste osservazioni hanno trovato conferma in una recente meta-analisi che ha incluso 12 studi su popolazioni diverse [33]. RDW sarebbe quindi un maker affidabile di outcome clinico –incluso lo stroke di nuova insorgenza- in una popolazione affetta da FA parossistica. Altrettanto interessante è che l'RDW rappresenta un predittore affidabile di stroke in pazienti con FA indipendentemente da una condizione anemica sottesa [34], e viene impiegato come un predittore di ricorrenze di FA parossistica post-ablazione [35] sebbene la sua relazione fisiopatogenetica con la stessa FA non sia al momento chiarita.

1.5. Il ciclo dei folati e la loro rilevanza nel metabolismo cellulare

Come già anticipato nei precedenti paragrafi, il ciclo dei folati (**Fig.10**) è un pathway cellulare metabolico di importanza assoluta per la replicazione cellulare, tanto che alterazioni collegate a carenza di folati o dismetabolismi degli stessi determinano o si associano ad un ampio spettro di condizioni cliniche (in particolare riguardanti tessuti ad elevata attività proliferativa come il midollo osseo e i tessuti embrionali), che comprendono ad esempio anemia megaloblastica, difetti nello sviluppo del sistema nervoso (difetti del tubo neurale), neoplasie, e malattie cardiovascolari. L'omeostasi delle purine e del timidilato (dTMP) e delle unità monocarboniose (gruppi formilici, metilenici e metilici secondo il loro grado di ossidazione) è strettamente dipendente dalla integrità del ciclo dei folati. Inoltre, diversi ciclo di ossido-riduzione, attraverso i loro intermedi demetilati, si intersecano e dipendono dal ciclo dei folati a differenti livelli. Tra questi, due in particolare sono rilevanti ai fini della relazione biologica tra modificazioni del ciclo dei folati, disfunzione endoteliale e predisposizione ad eventi cardiocerebrovascolari: il ciclo della metionina, che sovrintende alla

metilazione dell'omocisteina (Hcy), e il ciclo della tetraidrobiopterina (BH4), che opera la riduzione della diidrobioterina mediante un pathway così detto “di salvataggio”. La funzione di entrambi questi cicli è interconnessa con il ciclo dei folati dagli enzimi 5-10 metilen-tetraidrofolato reductasi (MTHFR) e diidrofolato reductasi (DHFR).

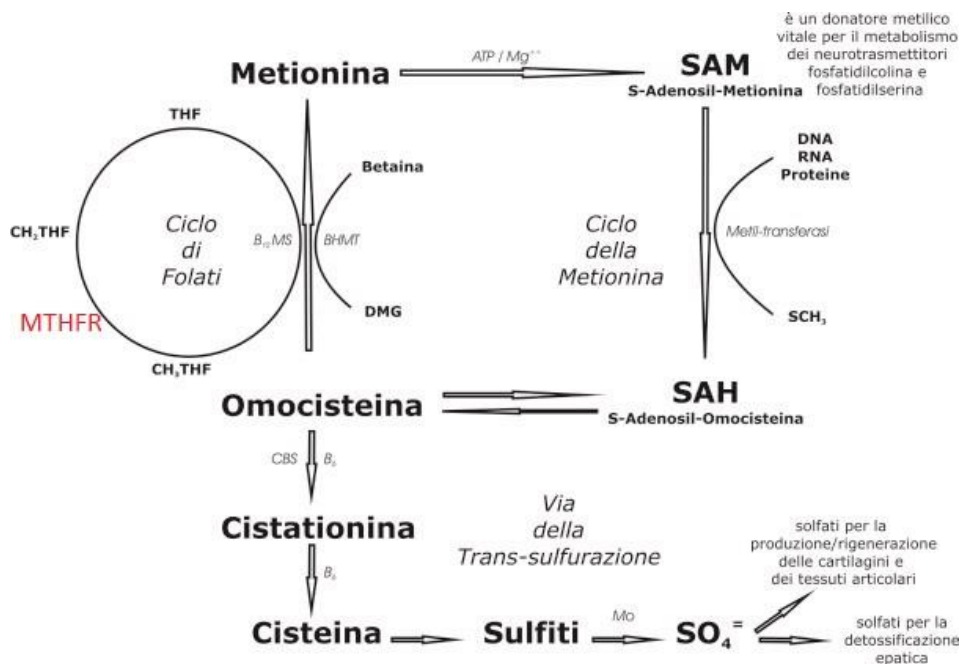


Figura 10. Rappresentazione schematica del ciclo dei folati e ciclo della metionina.

Nel ciclo del metile, il 5-metiltetraidrofolato costituisce il donatore del gruppo metilico nella riconversione dell'omocisteina in metionina. La S-adenosil-metionina (SAM), prodotto del legame dell'adenosina alla metionina ad opera dell'enzima metionina adenosil-transferasi, costituisce il principale donatore di gruppi metilici nelle reazioni di metilazione di metaboliti, neurotrasmettitori, DNA, RNA, proteine (tra cui gli istoni, assumendo dunque un ruolo anche nelle modificazioni epigenetiche). L'enzima DHFR, oltre a costituire l'enzima “di ingresso” del ciclo dei folati catalizzando la riduzione del folato a tetraidrofolato (THF, principale forma molecolare cui viene poi legata l'unità monocarboniosa), partecipa al “pathway di salvataggio” della BH4, importante cofattore della NOS. Come già accennato l'omocisteina (Hcy), prodotta per rimozione del gruppo metile dalla metionina nelle reazioni di metilazione, viene riconvertita a metionina ad opera della

metionina sintasi in una reazione che sfrutta la vitamina B12 come cofattore e il 5-metiltetraidrofolato come donatore del gruppo metile. Il 5-metiltetraidrofolato è prodotto per riduzione del 5,10-metilentetraidrofolato ad opera dell'enzima MTHFR.

L'enzima MTHFR risulta così di primaria importanza per il metabolismo dei folati, il ciclo del metile e i pathways metabolici e sintetici da questi dipendenti, nonché per le modificazioni epigenetiche legate al ruolo della SAM. MTHFR è codificato dal gene omonimo presente sul braccio corto del cromosoma 1.

L'indagine genetica ha permesso negli anni di individuare alcune mutazioni a carico del gene, e in particolare il polimorfismo C677T nell'esone 4, con la conseguente sostituzione della valina con l'alanina nel codone 222. Il polimorfismo C677T determina la produzione di un enzima termolabile, con riduzione dell'attività enzimatica pari a circa il 30% del normale in caso di omozigosi TT e al 65% del normale in caso di eterozigosi CT [36]. La prevalenza del polimorfismo è variabile per area geografica ed etnia: la frequenza dell'allele in omozigosi è stimata tra l'8-20% in Europa, Nord America e Australia [36], e in particolare in Europa la frequenza più elevata si riscontra nella popolazione italiana; tra le popolazioni dell'Africa Sub-Sahariana la prevalenza dell'allele in omozigosi si attesta invece sostanzialmente sullo 0% [37].

Un altro polimorfismo evidenziato a carico dell'enzima MTHFR è la mutazione A1298C, cui consegue una riduzione dell'attività enzimatica pari al 60% del normale in omozigosi. La mutazione A1298C è presente in circa il 7-12% della popolazione in Europa, Australia e Nord America, mentre la frequenza è più bassa in Asia [36]. È possibile anche riscontrare la presenza di eterozigosi composta C677T + A1298C (**Fig. 11**).

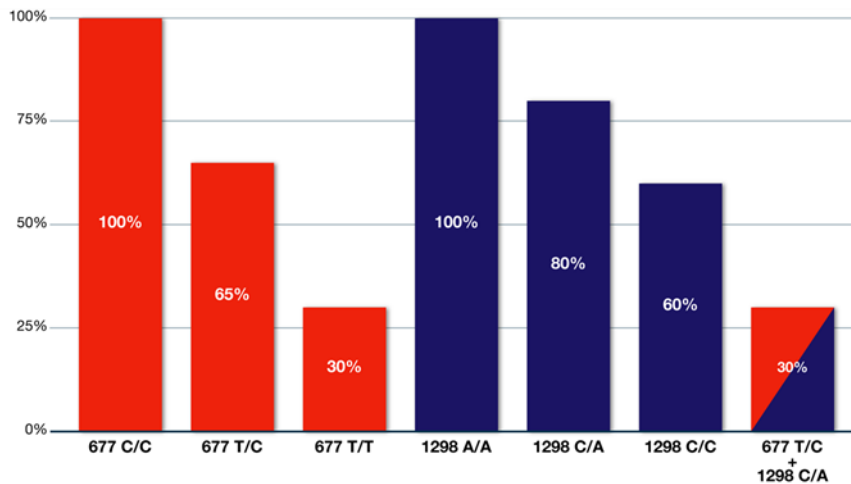


Figura 11. Attività relativa dell'enzima MTHFR in presenza dei polimorfismi in posizione 677 e 1298.

La conseguenza più evidente, e forse anche più intuitiva, della riduzione dell'attività enzimatica di MTHFR dovuta alla mutazione C677T è la ridotta conversione dell'Hcy in metionina: soggetti portatori del polimorfismo mostrano livelli di Hcy plasmatica più elevati rispetto ai portatori di enzima wild-type; coerentemente, soggetti omozigoti per la mutazione presentano livelli di Hcy plasmatica maggiori rispetto ai soggetti eterozigoti [37].

E' interessante inoltre notare che pazienti trattati con metotrexato (MTX), un antimetabolita inibitore di DHFR, mostrano livelli ematici più elevati di Hcy [38]. Uno studio ha stabilito una relazione tra i livelli plasmatici di Hcy dopo somministrazione di MTX e il polimorfismo C677T di MTHFR, suggerendo un'associazione tra MTX e livelli plasmatici elevati di Hcy nei portatori wild-type (C/C) e eterozigoti (C/T), ma non nei portatori omozigoti (T/T) [39]. Inoltre, poiché inibisce l'attività di DHFR, il MTX potrebbe interferire con la via di recupero del BH4, compromettendo così l'attività di eNOS [40]. Infine, vi sono prove che il MTX potrebbe indurre l'apoptosi delle cellule endoteliali [41], nell'insieme confermando che la corretta funzionalità degli enzimi coinvolti nel ciclo dei folati è fondamentale per una adeguata protezione cardiocircolatoria.

1.6. Relazione tra iperomocisteinemia, disfunzione endoteliale e alterazione delle EPCs

Pur non essendo stati ancora del tutto chiariti i meccanismi attraverso cui elevati livelli di Hcy contribuiscono al determinismo delle patologie cardiovascolari, numerose sono le evidenze a favore di un ruolo trasversale e articolato della stessa nella loro patogenesi, in particolare mediato da reazioni di ossidazione: l'Hcy può predisporre all'aterosclerosi inducendo danno endoteliale e attivazione piastrinica [42, 43], associandosi al tempo stesso ad alterata attività pro-aggregante e pro-coagulante dell'endotelio [44]; l'ossidazione dell'Hcy plasmatica interferisce con l'attività di enzimi antiossidanti [45] riducendo la disponibilità di NO per ridotta disponibilità di BH4 [46] e aumentata inattivazione ROS-dipendente [47, 48]; ancora, evidenze suggeriscono che l'Hcy induca la proliferazione delle cellule muscolari lisce della parete dei vasi [49]. Se da un lato è accettato che l'iperomocisteinemia possa conseguire alla condizione di omozigosi in C677T della MTHFR [50], dall'altro lato è ancora non completamente compresa e spesso sottovalutata la relazione tra Hcy e la dimetilarginina asimmetrica (ADMA), prodotta dal catabolismo di proteine contenenti arginina metilata ad opera delle proteine-arginina metiltransferasi (PRMTs). L'ADMA, a sua volta, è un potente inibitore della eNOS poiché compete con il substrato fisiologico, L-Arg. In caso di accumulo, o di ridotta degradazione di ADMA operata da enzimi chiamati dimetilarginina-dimetil-amino-idrolasi (DDAH), l'eccesso della molecola può contribuire in maniera importante alla disfunzione endoteliale [50]. Livelli elevati di ADMA si riscontrano in pazienti con fattori di rischio cardiovascolare [51]. L'iperomocisteinemia che consegue ad un carico di metionina esogeno, è accompagnata a un parallelo incremento dei livelli di ADMA circolante (**Fig. 12**) [52].

In aggiunta, e in parallelo rispetto alle implicazioni che sottendono le modifiche dei livelli di Hcy e ADMA, la mutazione in C677T della MTHFR è associata ad un aumento di espressione delle molecole di adesione miovascolari (VCAM) e ad una diminuzione delle concentrazioni di ossidi di azoto (NOx), confermando quindi ulteriormente la sua relazione con differenti biomarcatori di disfunzione endoteliale [53].

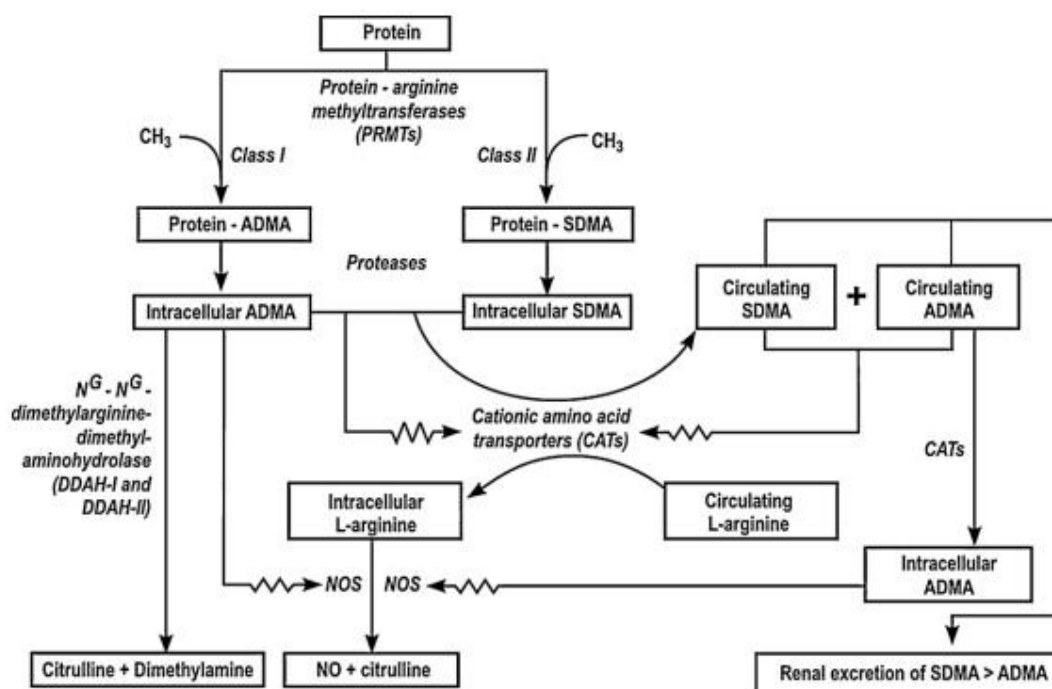


Figura 12. *Metabolismo di ADMA. Il catabolismo proteico mediato dalla attività delle proteine-arginina metiltransferasi (PRMTs) genera ADMA. Le dimetilarginina-dimetil-aminoidrolasi (DDAH) provvedono invece al catabolismo dell'ADMA.*

Per la relazione esistente tra ADMA, disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare [54], i livelli di ADMA potrebbero rappresentare un altro biomarker in grado di predire l'insorgenza o ricorrenza di eventi cardiovascolari [55, 56]. Lo stesso può dirsi per il rapporto L-Arg/ADMA, anch'esso marcatore di disfunzione endoteliale. Alcune recenti evidenze suggeriscono che l'Hcy possa indurre l'apoptosi delle EPCs e concorra ad una ridotta funzionalità delle stesse [57, 58]. E' oggi largamente accettato che la linea transdifferenziativa delle EPCs perda gradualmente il CD133 che caratterizza primitivamente le cellule staminali midollari e acquisisca progressivamente il VEGFR2 in assenza del marcatore mieloide CD45 [59].

Così i progenitori con massima espressione di CD133 e di CD34 sarebbero sostanzialmente di derivazione midollare, mentre quei progenitori privi di CD133 e con una espressione di CD34 più relativa costituirebbero un pool di progenitori più maturi [60]. Tali cellule sarebbero già in grado di caricare LDL acetilato (caratteristica delle cellule endoteliali) e di esprimere anche la molecola di adesione di superficie endoteliale PECAM (CD31) [60]. È altrettanto noto che l'uso di MTX sia in

grado di congelare il metabolismo dei progenitori ematopoietici midollari *in vitro* [61]. Coerentemente, la presenza di iperomocisteinemia, anche lieve, in modelli animali eterozigoti per l'enzima MTHFR, riduce significativamente il pool di progenitori endoteliali circolanti e ne causa disfunzione per ridotta espressione di NO e aumento di ROS, senescenza per ridotta lunghezza dei telomeri -anche legata alla ipometilazione del DNA [62] e ridotta espressione di SIRT1 [63]. Allo stesso modo, l'iperomocisteinemia in modelli animali carenti di cistationina beta sintetasi (**Cbs**) riduce notevolmente il pool di progenitori midollari endoteliali, annulla il pool di progenitori endoteliali circolanti e compromette dunque le capacità di homing in siti di danno vascolare sperimentale [64].

Esistono quindi meccanismi multipli attraverso cui una disfunzione del ciclo dei folati, innescata da una perdita di funzione dell'enzima MTHFR o conseguente a inibizione farmacologica con MTX, possono determinare un disequilibrio del rapporto Arg/ADMA e conseguentemente favorire la comparsa di disfunzione endoteliale:

- 1) L'Hcy down-regola l'attività delle DDAH (**Fig.13**), da cui dipende il catabolismo dell'ADMA [65] laddove, contestualmente, l'iperomocisteinemia indotta dal carico di metionina causa incremento di ADMA e disfunzione endoteliale.
- 2) La BH4 è un cofattore essenziale della eNOS. La DHFR è l'enzima di "ingresso" del ciclo dei folati e l'enzima responsabile del pathway così detto "di salvataggio" della BH4, che a sua volta sovrintende al riciclo per doppia riduzione della diidrobipterina. Il ciclo della biopterina dipende quindi strettamente dall'integrità del ciclo dei folati [66], e i pazienti che presentano iperomocisteinemia mostrano bassi livelli sia di NO che di BH4 [67].
- 3) Una frazione della L-Arg potrebbe essere direttamente metabolizzata ad ADMA [68], probabilmente in quelle stesse condizioni implicate nel sovraccarico metilico cellulare e nella carenza di metionina (iperomocisteinemia).

- 4) Infine, il deficit di funzione di MTHFR potrebbe minare la funzionalità e la sopravvivenza delle EPCs [69] e la loro carenza sembrerebbe un evento fondamentale nel determinare l'insorgenza dello stroke [70].

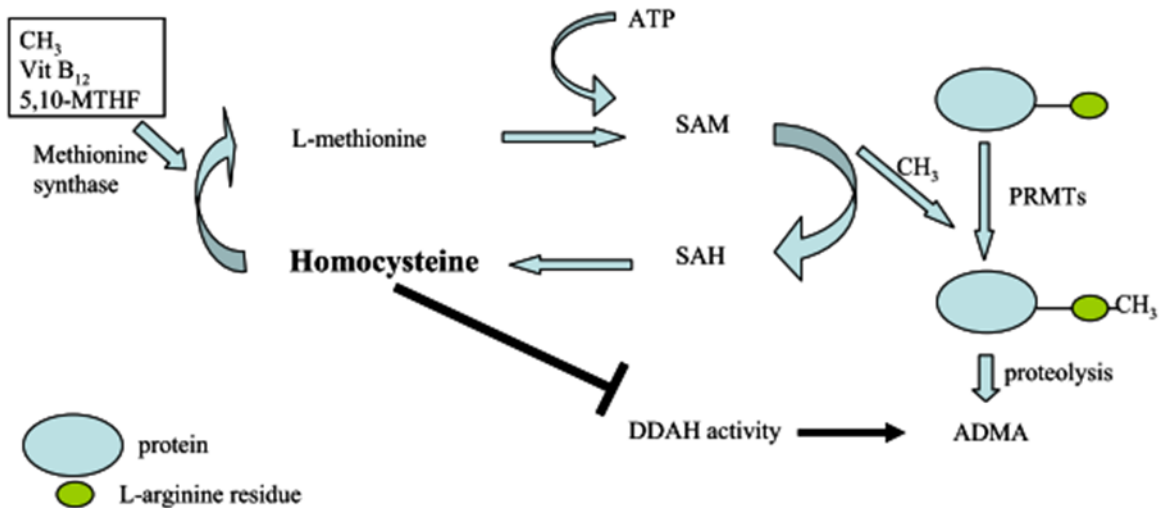


Figura 13. Potenziali meccanismi attraverso cui l'omocisteina riduce il catabolismo di ADMA con modalità DDAH-dipendente.

Il campo delle relazioni tra EPCs e FA – e possibilmente cardiomiopatia atriale- è sostanzialmente ancora tutto da esplorare. È però noto che il pool di monociti intermedi ($\text{CD14}^{++}\text{CD16}^{+}$) è significativamente incrementato nei pazienti con FA persistente [71]; anche in accordo con parametri di rimodellamento atriale, intuitivamente, è ipotizzabile uno sbilanciamento a favore del lineage midollare mieloide ($\text{CD45}^{+}\text{CD14}^{+}$) a discapito del lineage emangioblastico a differenziazione più avanzata, anche endoteliale ($\text{CD45}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD133}^{+}\text{CD117}^{+}$).

Sulla base di queste osservazioni è possibile ipotizzare che disturbi del metabolismo dei folati, secondari a deficit di MTHFR derivanti dal polimorfismo C677T, o farmacologicamente indotti dal trattamento con MTX, possano partecipare alla compromissione dell'omeostasi endoteliale attraverso la disfunzione delle EPCs e l'aumento dei livelli di Hcy, rappresentando così un meccanismo patogenetico rilevante per lo sviluppo della cardiomiopatia atriale e la predisposizione alla FA e

all'ictus, nel contesto di una complessa rete di interazioni cuore/midollo osseo ematopoietico che, se alterata, può innescare le alterazioni fenotipiche in corso di AFib.

2. OBIETTIVO DELLA TESI

Questo progetto di ricerca nasce dalla esigenza di approfondire le potenziali condizioni predisponenti allo stroke criptogenico, un evento ischemico cerebrale che si verifica in assenza di evidenti cause di aterosclerosi vascolare o tromboembolismo, indagando i meccanismi biomolecolari sottesi alla regolazione metabolico-cellulare nel contesto cardio-cerebro-vascolare.

Lo studio ha inteso approfondire l'impatto e la possibile interconnessione di un insieme di condizioni patogenetiche correlate a dismetabolismi del ciclo dei folati, partendo dalla analisi delle caratteristiche cliniche e biomolecolari di pazienti portatori di difetti genetici a carico dell'enzima MTHFR con pregresso episodio ictale e FA parossistica. E' stata inoltre valutata l'ipotesi che analoghe alterazioni del ciclo dei folati su base iatrogena (trattamento con MTX), possano rappresentare una condizione assimilabile a quella indotta su base genetica.

Nel corso della ricerca è stato quindi accertato se mutazioni genetiche o anomalie farmacologicamente indotte del ciclo dei folati possano avere parallele e interconnesse ripercussioni:

1. sulla funzionalità dell'endotelio;
2. sulla funzione midollare desunta da diversioni del globulo rosso maturo e dal numero e funzionamento dei progenitori endoteliali circolanti;
3. sul grado di fibrosi atriale.

L'auspicio è che la comprensione dei meccanismi operanti in questa complessa condizione e nella sua patogenesi evolutiva possa condurre alla individuazione e validazione come biomarcatori di parametri strumentali e laboratoristici facilmente rilevabili in un contesto clinico-diagnostico, ripetibili, non invasivi e relativamente poco costosi, che possano consentire di ottenere indicazioni rilevanti sia per il monitoraggio terapeutico di soggetti con pregressi eventi ischemici, sia per la identificazione di fattori di rischio in soggetti con una storia familiare di propensione al rischio di stroke. Non ultimo, lo studio si propone di mettere in evidenza potenziali rischi aggiuntivi relativi ad eventi cerebro-vascolari in soggetti esposti a terapie con inibitori del metabolismo dei folati.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Popolazione dello studio e criteri di arruolamento

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera Consorziata Policlinico di Bari (Studio n. 6903/2021). I dati demografici, la storia medica e i trattamenti farmacologici sono stati raccolti e registrati secondo procedure standard. Ogni partecipante ha letto, accettato e firmato il consenso informato prima di essere inserito nel protocollo di studio.

La tabella sottostante riporta in dettaglio i criteri di inclusione e di esclusione utilizzati per l'arruolamento dei pazienti:

Tabella 1. Criteri di inclusione e di esclusione dei soggetti arruolati nello studio

CRITERI DI INCLUSIONE
<ul style="list-style-type: none">• Età compresa tra 18 e 75 anni• Pazienti affetti da FA sintomatica con indicazione ad ablazione di FA:<ol style="list-style-type: none">i. FA parossistica sintomatica;ii. refrattarietà o intolleranza a terapia antiaritmica;• Pazienti affetti da stroke/TIA criptogenico:<ol style="list-style-type: none">i. stroke ischemico documentato mediante RM o CT o TIA con caratteristiche tromboemboliche definito tale da specialista neurologo;ii. assenza di fonti tromboemboliche alternative identificabili.• Comprensione della natura dello studio e degli aspetti procedurali e contestuale consenso informato scritto• Elevata <i>compliance</i> del paziente e facile reperibilità per i prossimi 12 mesi
<i>FA = fibrillazione atriale; TIA = attacchi ischemici transitori; RM = risonanza magnetica; CT = tomografia computerizzata.</i>
CRITERI DI ESCLUSIONE
<ul style="list-style-type: none">• Età inferiore ai 18 anni o superiore ai 75 anni• BMI > 30• Assunzione di integratori proteici e/o vitaminici• Storia di neoplasia e/o chemioterapia• Aspettativa di vita < 1 anno• Controindicazioni alla terapia anticoagulante• Disordini linfoproliferativi• Controindicazioni all'esecuzione di ecocardiografia colordoppler per via transesofagea• Patologie esofagee (varici, stenosi)• Ipertensione portale primaria o secondaria• Ipertensione polmonare• Ipertensione arteriosa non controllata• Stato di gravidanza• Controindicazioni alla esecuzione di RM tronco-encefalo

- Schegge o frammenti metallici intracorporei
- Protesi o dispositivi medici non RM compatibili
- Patologie scompensate concorrenti alla disfunzione endoteliale
- Diabete mellito insulino dipendente scompensato
- Dislipidemia non controllata
- Pregressi sindromi micro e macrocircolatorie acute entro 6 mesi o non in terapia ottimale
- OSAS non in terapia
- Controindicazioni alla esecuzione di ablazione di FA
- Evidenza di trombosi intraauricolare
- Infezione sistemica attiva

BMI = Body Mass Index; RM = risonanza magnetica; OSAS = sindrome da apnee ostruttive del sonno; FA = fibrillazione atriale;

La numerosità campionaria è stata determinata considerando per *alfa* un valore cut-off del 5% (0.05), e per *beta* un valore cut-off del 20%. La power analysis ha indicato in 12 il numero minimo di pazienti da reclutare in ogni gruppo. Tra giugno 2021 e dicembre 2023 sono stati arruolati 59 pazienti con FA parossistica ricoverati presso l'Unità di Cardiologia dell'Ospedale Generale "F. Miulli" e 83 pazienti ipertesi senza alterazioni cardiovascolari, che costituiscono il gruppo di controllo (CTRL), che fanno riferimento all'Ambulatorio dell'Unità di Ipertensione Arteriosa "A.M. Pirrelli" del Policlinico Universitario di Bari.

Nei pazienti arruolati presso l'Unità di Cardiologia del Miulli una valutazione diagnostica preventiva è stata condotta da un esperto aritmologo, che ha valutato ciascun paziente come affetto da FA parossistica sintomatica refrattaria alla terapia medica, sia a causa della persistenza dell'aritmia, sia a causa del prolungamento eccessivo del QRS o del prolungamento dell'intervallo QT o della bradicardia persistente. È stata eseguita una valutazione aggiuntiva, che comprendeva un ECG a 12 derivazioni, ecocardiografia precordiale e transesofagea, quest'ultima finalizzata a escludere la trombosi dell'auricola, e imaging cerebrale pre- e post-ablazione tramite risonanza magnetica, eseguiti da cardiologi o neuroradiologi esperti per rilevare eventuali segnali significativi di ischemia prima e dopo l'ablazione.

3.2. Mappa di voltaggio atriale sinistro

Nei soggetti avviati alla ablazione cardiaca per il trattamento della FA, è stata preventivamente misurata l'estensione dell'area di fibrosi atriale. Una volta guadagnato l'accesso all'atrio sinistro mediante puntura transettale una mappa di voltaggio dettagliata ed omogenea è stata ricostruita mediante elettrocateretere LASSO[®] a 20 elettrodi durante ritmo sinusale, in accordo a metodi già validati in letteratura [72].

Al fine di evitare segnali di basso voltaggio, falsi positivi dovuti ad artefatti da movimento del catetere o scarsità di forza di contatto dello stesso, il modulo Confidense non è stato impiegato e l'area di voltaggio è stata acquisita manualmente da un ingegnere esperto che ha verificato a priori stabilità e consistenza degli elettrogrammi. In caso di necessità di mappaggio addizionale, un elettrocateretere bipolare da 3.5-mm (Thermocool SmartTouch[®]) è stato impiegato per rifinire la mappa di voltaggio. Punti di voltaggio sono stati acquisiti per l'intero atrio di sinistra in maniera tale da non residuare zone non mappate. Il filtro passa-banda è stato impostato tra 50 e 500 Hz. Il voltaggio bipolare picco-picco è stato acquisito punto per punto.

È stata definita area di basso voltaggio la percentuale relativa di punti di basso voltaggio (<0,5 mV) rispetto alla totalità dei punti di voltaggio campionati, necessari per acquisire una mappa completa dell'atrio di sinistra. I punti totali acquisiti dovevano essere in numero ≥ 800 .

3.3. Analisi di laboratorio cliniche

Emocromo ed esami di laboratorio di routine sono stati eseguiti al ricovero nei pazienti con FA e acquisiti in ambulatorio di ipertensione nei pazienti del gruppo CTRL. Nei pazienti con FA il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico secondo protocollo standard. I polimorfismi dell'enzima MTHFR sono stati studiati mediante impiego del TaqMan system MTHFR duplex mix tramite real-time PCR in accordo ai protocolli standard di riferimento. I folati sierici e i livelli di Vitamina B12 sono stati misurati con reagenti monouso tramite tecniche di immunochemiluminescenza (Tosoh Bioscience, AIA-PACK, Tessenderlo, Belgio). I livelli di

omocisteina plasmatica sono stati misurati tramite analisi nefelometrica in accordo alla locale expertise.

3.4. Analisi del rapporto L-Arg/ADMA

I campioni ematici prelevati dai pazienti di tutti i gruppi sperimentali sono stati centrifugati e il plasma è stato conservato a -30°C fino all'analisi. I valori di ADMA e L-arginina (L-Arg) sono stati determinati utilizzando un kit ELISA (DLD Diagnostika GMBH, Amburgo, Germania), seguendo le istruzioni del produttore. In breve, gli standard di ADMA e L-Arg, i campioni e il controllo positivo, una volta acilati, sono stati esposti ad anticorpi anti-N-acil-ADMA/L-arginina di coniglio, incubati rispettivamente per 15-20 h a 2-8°C e 18-24°C. Successivamente, dopo 3 lavaggi, è stato aggiunto un secondo anticorpo coniugato con perossidasi, seguito da un ulteriore lavaggio. La tetrametilbenzidina ha rappresentato la soluzione substrato (TMV) aggiunta al termine delle precedenti incubazioni. In tutti i campioni i valori di assorbanza sono stati letti a λ di 450 nm su un lettore automatico per micropiastre. Valori di riferimento: ADMA nel siero 0,4-0,75 micromol/L e L-Arg nel siero 20-80 micromol/L.

3.5. Analisi delle citochine circolanti

I campioni di sangue sono stati centrifugati e il plasma è stato conservato a -30°C fino all'analisi. Citochine e chemochine sono state determinate utilizzando il kit Human XL Cytokine Array (R&D Systems Bio-Techne, Minneapolis, USA), seguendo le istruzioni riportate nel manuale del produttore. Per iniziare l'analisi con il kit Proteome Profiler Array, è stato necessario preparare i campioni di plasma, diluendoli secondo le indicazioni specifiche con Array Buffer 6 in ciascun pozzetto di una piastra a 4 pozzetti, dove si posizionano le membrane con il lato identificativo rivolto verso l'alto. Le membrane sono state incubate su uno shaker per un'ora. Nel frattempo, i campioni diluiti vengono aggiunti ai pozzetti e la piastra si lascia in incubazione a 2-8 °C *over-night*. Il giorno successivo le membrane sono state lavate più volte con Wash Buffer 1X. è stato preparato un cocktail di anticorpi di rilevamento, poi aggiunto alle membrane e incubato per un'ora. Dopo ulteriori lavaggi,

sono stati aggiunti 2 ml di Streptavidin-HRP in ciascun pozzetto e successiva incubazione di 30 minuti. Le membrane sono state poi lavate nuovamente e infine incubate con 1 mL di Chemi Reagent Mix su ciascuna membrana per la rilevazione. Il segnale chemiluminescente sulla membrana è stato acquisito tramite sistema ChemiDoc (Biorad). Il segnale prodotto è proporzionale alla quantità dell'analita rilevato.

3.6. Purificazione di EPCs

Le cellule mononucleate sono state isolate dal sangue periferico di ciascun paziente utilizzando un metodo di stratificazione su gradiente di densità Ficoll-Paque™ PLUS (Sigma Aldrich). Nello specifico, il sangue periferico è stato raccolto in una provetta Falcon da 50 ml e diluito con RPMI1640 privo di fattori di crescita in rapporto 1:3 e successivamente stratificato su Ficoll in rapporto 1:1. Il campione è stato centrifugato a 3000 rpm per 24 minuti a 23°C. L'anello linfomonocitario è stato raccolto, diluito con RPMI1640 privo di fattori di crescita in rapporto 1:1 e successivamente nuovamente centrifugato a 2500 rpm per 5 minuti a 25°C. Al termine della centrifugazione, il pellet ottenuto è stato risospeso in terreno di coltura specifico, Endothelial Cell Growth Medium – 2 BulletKit™ (EGM-2) (Euroclone, Milano, Italia), un mezzo di coltura ricco di fattori di crescita e citochine specifiche per la differenziazione delle cellule mononucleate in cellule endoteliali. Le cellule così ottenute sono state coltivate in piastra a 37°C per circa 27 giorni, fino al raggiungimento di una percentuale di adesione cellulare superiore al 75% della superficie complessiva. Il mezzo di coltura è stato sostituito con EGM-2 fresco ogni 2 giorni.

3.7. Analisi del fenotipo cellulare

Gli antigeni di superficie cellulare sono stati rilevati utilizzando i seguenti anticorpi monoclonali: CD45, CD34, CD133, Recettore del Fattore di Crescita Endoteliale Vascolare 2 (VEGFR2) e KDR (Recettore del Dominio Inserito nella Chinasi) (tutti da Becton Dickinson-BD, San Jose, CA, USA). L'espressione è stata verificata mediante citometria a flusso utilizzando FACS Canto II (Becton Dickinson-BD, San Jose, CA, USA) e analizzata utilizzando il software FACSDiva

(Becton Dickinson-BD, San Jose, CA, USA). I controlli negativi includevano anticorpi irrilevanti abbinati all'isotipo.

3.8. Saggio di migrazione *in vitro*

Per questo test 1×10^5 EPCs, precedentemente isolate dai vari gruppi di pazienti, sono state piastrate in mutiwells da 12 pozzetti in mezzo completo. A confluenza avvenuta, è stata creata una “ferita” al monostrato cellulare con un puntale sterile. Il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MN, USA) e successivamente coltivate con mezzo completo EGMTM-2. Dopo 48 ore, le cellule in piastra sono state fissate e colorate con Violetto di Cristallo (0,1% in metanolo al 20%). La capacità migratoria delle cellule è stata determinata contando le EPCs migrate nella “ferita” (cellule migrate/campo), indicando la percentuale di chiusura relativa della ferita rispetto al controllo nei vari subsets di EPCs.

3.9. Saggio di angiogenesi *in vivo*

Durante lo sviluppo embrionale dei polli la membrana corioallantoidea (chicken chorioallantoic membrane, CAM) - altamente vascolarizzata, non innervata, extra embrionale - si forma mediante fusione dello strato mesodermico dell'allantoide con lo strato mesodermico del corion. Per valutare la capacità angiogenica delle EPCs sono state utilizzate uova fecondate di gallina di razza Leghorn bianca, incubate a 37°C e umidità costante. Al terzo giorno, il guscio è stato aperto e sono stati rimossi 2-3 mL di albume per staccare la CAM. All'ottavo giorno, le CAM sono state impiantate con anelli sterili di polistirene, caricate con il mezzo condizionato delle EPCs isolate da pazienti del gruppo CTRL e da pazienti con FA con/senza mutazione omozigote di MTHFR C677T. Al dodicesimo giorno, la risposta angiogenica è stata valutata nei diversi subset sperimentali misurando il numero di vasi convergenti verso l'anello e il numero di punti di ramificazione formati. Le immagini sono state acquisite a ingrandimento 40x *in ovo* mediante stereomicroscopio (Olympus Italia Srl, Segrate, Milano, Italia).

3.10. Analisi statistica

Tutti i dati sono espressi come media \pm errore standard di (n) esperimenti. Il t-test di Student è stato utilizzato per il confronto tra gruppi di dati indipendenti solo dopo verifica di distribuzione normale dei dati mediante duplice accertamento secondo test di D'Agostino & Pearson e test and Anderson-Darling. In caso di distribuzione non normale dei dati, lo *U* test di Mann-Whitney è stato usato per il confronto tra due gruppi indipendenti. L'analisi di Kruskal-Wallis seguita da correzione multipla secondo Dunn è stata impiegata per comparazioni indipendenti multiple.

Una analisi di regressione lineare univariata e di correlazione secondo Pearson è stata impiegata per individuare i fattori associati alla fibrosi atriale. Nelle successive analisi di regressione lineare multipla, tutte le variabili significative all'analisi univariata e quelle potenzialmente clinicamente rilevanti sono state incluse e la bontà del modello è stata testata in maniera seriata.

La significatività statistica ($p < 0.05$) è stata determinate utilizzando i test appropriati secondo quanto appena descritto. Il software statistico e grafico impiegato è stato GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc., La Jolla CA).

4. RISULTATI

4.1. Caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti arruolati

I 142 pazienti arruolati nello studio comprendono 59 pazienti con FA e 83 pazienti ipertesi (gruppo CTRL). In base al genotipo di MTHFR, i 59 pazienti con FA sono stati ulteriormente suddivisi in due sottogruppi: 15 pazienti sono risultati portatori della mutazione MTHFR 677 C/T in omozigosi (25.4%); i restanti 44 pazienti sono risultati portatori della mutazione MTHFR 677 C/T in eterozigosi (32 pz; 54,2%) o della variante MTHFR wild-type 677 C/C (12 pz; 20.3%).

Nonostante le variazioni genotipiche 677 C/T in eterozigosi possano comportare una riduzione (approssimativamente stimabile attorno al 30%) della attività enzimatica di MTHFR, le iniziali indagini dei parametri clinico-laboratoristici di questi soggetti hanno rilevato una sostanziale uniformità rispetto ai valori registrati nei portatori della variante wild-type 677 C/C dell'enzima (dati preliminari non mostrati). Pertanto, nel prosieguo dello studio, questi ultimi due sottogruppi di pazienti (portatori di MTHFR C677T in eterozigosi e portatori della variante wild-type) sono stati considerati in una unica sottopopolazione (indicata complessivamente come MTHFR C677T non omozigoti) al fine di mettere in maggior risalto le potenziali differenze rispetto alla presenza della mutazione MTHFR 677 C/T in omozigosi, che comporta una più rilevante riduzione della attività enzimatica e per la quale sono già documentate le potenziali manifestazioni fenotipiche correlate ad aumentato rischio di eventi cardiovascolari.

Le caratteristiche demografiche, cliniche, i dati anamnestici, terapeutici e di laboratorio non mettono in evidenza differenze significative per età, livelli di glucosio, profilo lipidico, valori di pressione arteriosa nei tre gruppi (**Tabella 1**).

Tabella 1. *Caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti*

	OMOZIGOSI MTHFR C677T	NON OMOZIGOSI MTHFR C677T	CTRL
Pazienti (N) (F = donne/M = uomini)	15 (4 F/11 M)	44 (27 F/11 M)	83 (41 F/ 42 M)
Età (anni)	61 ± 13	61 ± 9	65± 8
Fibrinogeno (mg/dL)	307 ± 42,8	299,6 ± 47,9	-
D-dimeri (ng/dL)	154,5 ± 86,8	168,5 ± 94,2	-
Omocisteinemia (µmol/L)	17,6 ± 3,7 *	12,3 ± 4,4	-
Folati (ng/mL)	11,2 ± 6,1	9,3 ± 2,1	-
B12 Vit (pg/mL)	441,5 ± 263,4 *	394,8 ± 140,3	-
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,4
eGFR (mL/min)	91,4 ± 14,8	85,6 ± 17	86,3 ± 12
Glucosio (mg/dL)	100,5 ± 28,7	93,6 ± 18,6	96,5 ± 13
Colesterolo (mg/dL)	173,5 ± 34	179,7 ± 36	172,4 ± 24
Uricemia (mg/dL)	4,9 ± 1,6	5 ± 1	5,2 ± 0,9
LDL (mg/dL)	96,3 ± 28	113,2 ± 12	103,2 ± 21
Trigliceridi (mg/dL)	113,8 ± 76,6	112 ± 70,8	113 ± 59,7
PA sistolica (mmHg)	119 ± 5,2	120 ± 4,5	132,6 ± 2,5
PA diastolica (mmHg)	72 ± 9,5	74 ± 3	76,4 ± 3

PA = Pressione Arteriosa. I risultati sono espressi come media ± SD di (n) pazienti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando l'analisi multivariata della varianza seguita dal t-Test per dati raggruppati con il software GraphPad Prism5. I dati sono espressi come media±deviazione standard (SD). La significatività statistica riportata è per $p < 0.0001$ vs il rispettivo valore nella popolazione di confronto.

In accordo con l'ipotesi alla base dello studio, i livelli plasmatici di omocisteina e vitamina B12, misurati nei pz del gruppo FA, differiscono significativamente nei soggetti con mutazione MTHFR C677T in omozigosi ($p < 0.0001$) rispetto ai pazienti con mutazioni MTHFR C677T in eterozigosi o con genotipo wild-type.

4.2. Correlazione tra genotipo MTHFR e estensione del grado di fibrosi atriale (AFib)

I valori medi della percentuale di area di basso voltaggio (indice surrogato del grado di AFib) sono $62,2 \pm 5,5$ nei pazienti portatori della mutazione MTHFR C677T in omozigosi rispetto a $50 \pm 2,4$ nei restanti pazienti non-C677T omozigoti. I dati ottenuti evidenziano una entità di AFib significativamente differente tra i due gruppi di pazienti ($p < 0,05$), con una intensità di fibrosi proporzionale alla severità della mutazione MTHFR, avvalorando la potenziale relazione tra genotipo MTHFR non funzionale ed estensione del grado di compromissione atriale (**Fig. 14**).

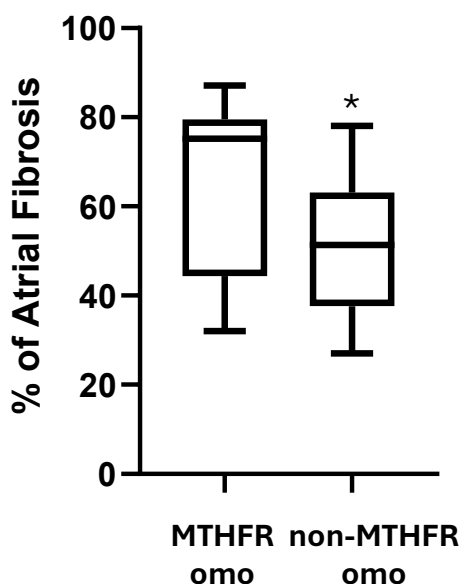


Figura 14. Percentuale (%) dell'area a basso voltaggio mostrata qui come AFib nei due gruppi di pazienti suddivisi in base al genotipo MTHFR. I box plots indicano i valori mediano, massimo e minimo. Il valore p tra i gruppi è stato calcolato dal test t di Student per dati raggruppati, una volta verificata la distribuzione normale dei dati con i test di D'Agostino & Pearson e di Anderson-Darling. * $p < 0,05$

4.3. Analisi multivariata tra grado di AFib e parametri laboratoristici clinici.

Si è poi valutato se il grado di AFib dei pazienti potesse essere indirettamente suggerito da parametri clinici di più facile riscontro e rilevazione. Nel modello di regressione lineare multipla (**Fig.15**) la percentuale di area di basso voltaggio atriale, surrogato di AFib, viene quindi a costituire la variabile dipendente. Le variabili indipendenti considerate sono i valori di conta eritrocitaria (RBC), l'ampiezza di distribuzione del volume eritrocitario (RDW), i valori di folati sierici e omocisteinemia.

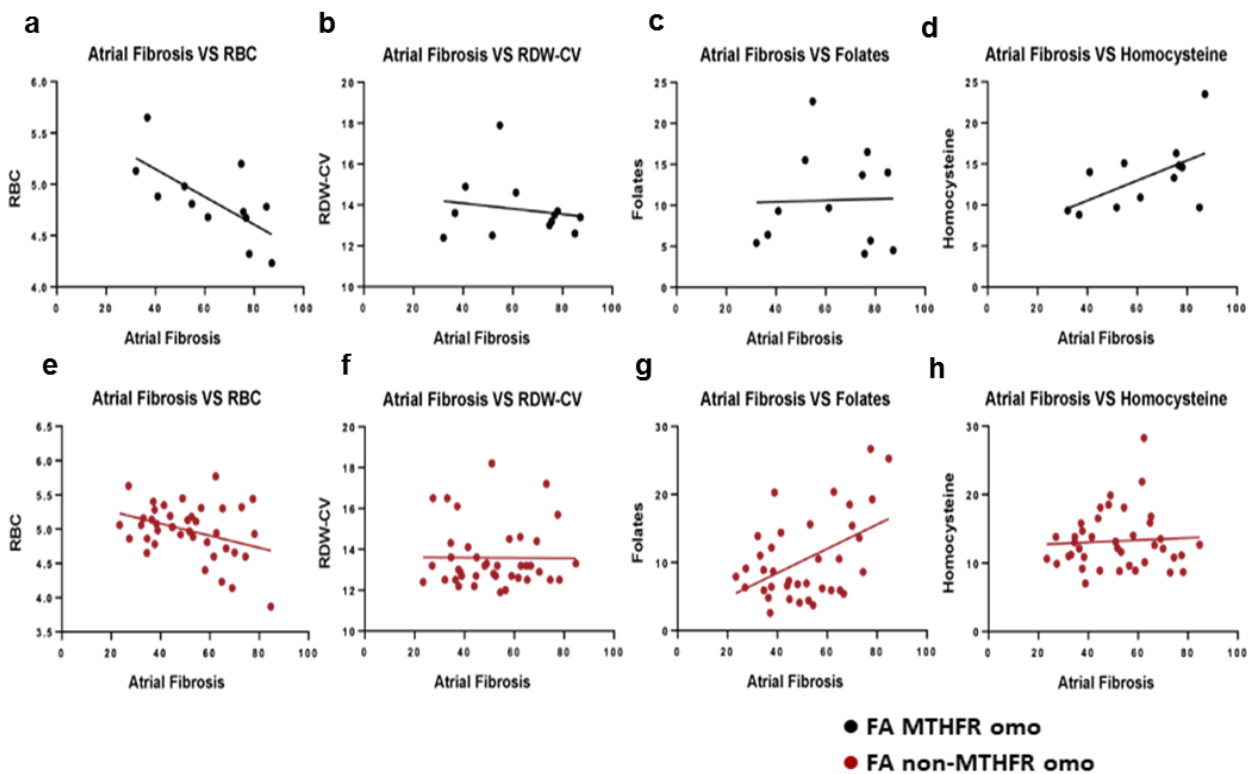


Figura 15. Analisi clinica multivariata: Entrambi i test utilizzati di Shapiro-Wilk and Anderson-Darling hanno dimostrato una distribuzione normale dei dati in entrambi i sottogruppi. Si osserva una correlazione lineare negativa tra percentuale di area di basso voltaggio e RBC e RDW nei pazienti con FA e mutazione MTHFR C677T in omozigoti rispetto alla popolazione non omozigote. (a,b vs. e,f; $p < 0,0005$; $r = -0.46$; $R^2 = 0.21$) l'analisi evidenzia una correlazione lineare positiva tra percentuale di area di basso voltaggio e folati sierici in pazienti non omozigoti, rispetto alla popolazione con omozigoti per MTHFR C677T (c vs. g; $p < 0,01$; $r = 0.35$; $R^2 = 0.12$). I pannelli d e h sottolineano la correlazione positiva tra la percentuale di area di basso voltaggio e i livelli di omocisteina in pazienti con omozigoti per MTHFR C677T, rispetto alla popolazione non omozigote ($p < 0,005$; $r = 0.65$; $R^2 = 0.19$)

In conformità al modello in esame, RBC ed RDW tendono a ridursi nei pazienti con FA e mutazione MTHFR C677T in omozigoti, rispetto ai pazienti non omozigoti per la stessa mutazione. I folati sierici, sebbene non significativamente differenti nelle due popolazioni come già riportato nella Tab 1, presentano una diversa correlazione rispetto al grado di AFib nei due sottogruppi. Analogamente livelli di omocisteina, significativamente più elevati nella popolazione con FA e mutazione per MTHFR C677T in omozigoti rispetto ai pazienti non omozigoti (Tab 1), appaiono correlati all'estensione del grado di AFib. In generale quindi l'analisi ha evidenziato una correlazione significativa tra estensione di AFib e valori di RBC, RDW, folati sierici e omocisteina, con robustezza maggiore nei pazienti con mutazione MTHFR C677T in omozigoti rispetto ai non-omozigoti.

4.4. Relazione tra mutazione MTHFR e indici di disfunzione endoteliale

I risultati del test ELISA sul rapporto L-Arg/ADMA, marker di disfunzione endoteliale e predittore indipendente di eventi cardio-cerebro-vascolari, confermano che il sovraccarico metilico cellulare secondario a turbe del ciclo dei folati si riflette in una riduzione di tale parametro nei pazienti con FA e mutazione in omozigosi per MTHFR C677T, con valori che raggiungono la significatività statistica rispetto a quelli misurati nella popolazione CTRL (**p < 0.002) e, sebbene non statisticamente differenti, con un trend visualizzabile anche rispetto ai pazienti con mutazione MTHFR C677T non in omozigosi (**Fig. 16**). Questo dato sperimentale corrobora quindi il concetto che la funzionalità delle cellule endoteliali possa essere significativamente compromessa in soggetti portatori di alterazioni rilevanti nel ciclo dei folati.

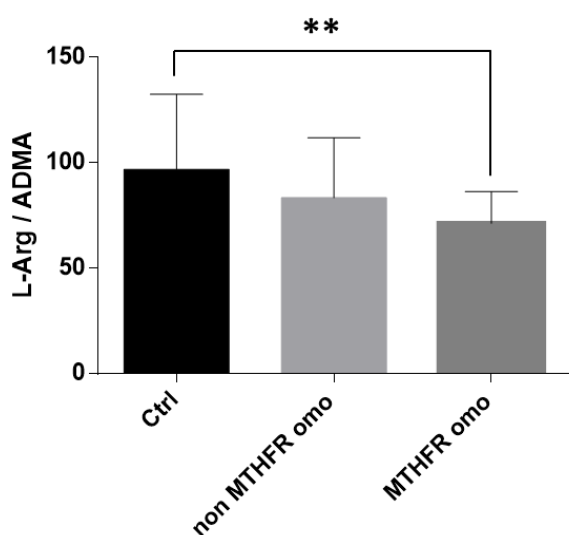
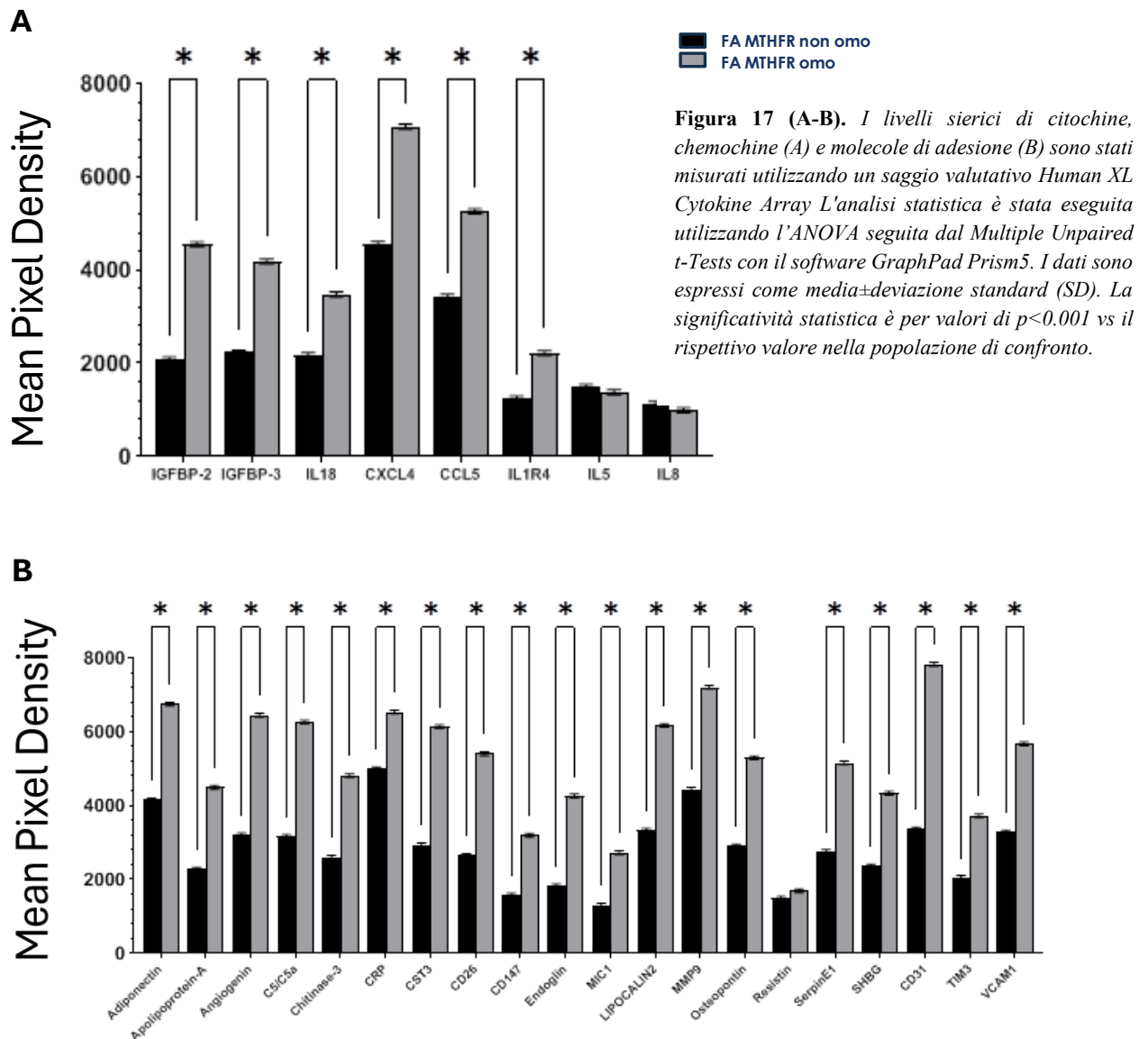


Figura 16. I valori del rapporto L-Arg/ADMA indicano una riduzione proporzionata al grado di severità nella mutazione dell'enzima MTHFR. Il valore p tra i gruppi è stato calcolato con l'ANOVA, seguito dal test t di Student per dati raggruppati. ADMA, Dimetil Arginina Asimmetrica. La significatività statistica è per valori di $p < 0.002$ vs il rispettivo valore nella popolazione CTRL.

4.5. Relazione tra mutazione MTHFR, grado di infiammazione e profilo trombotico

L'analisi statistica (t-test multiplo per dati raggruppati) effettuata su campioni sierici prelevati da pazienti con FA suggerisce che il grado di efficienza dell'enzima MTHFR possa avere influenza nell'espressione di citochine pro-infiammatorie (ad esempio IL-18, CXCL4, CCL5), di proteine metaboliche (IGFBP-2 e IGFBP-3) (**Fig. 17A**) e di alcune molecole di adesione (**Fig. 17B**); è stato infatti osservato un incremento significativo dei livelli di molte di queste molecole nei pazienti portatori della mutazione MTHFR C677T in omozigosi rispetto ai pazienti con MTHFR non omo.

Ciò potrebbe indicare una maggiore predisposizione all'infiammazione endoteliale e la propensione ad eventi trombotici in questi soggetti.



4.6. Indici quantitativi di cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPCs)

Per valutare se le alterazioni della funzionalità endoteliale (rapporto L-Arg/ADMA) riscontrate nei soggetti con FA, AFib e mutazione dell'enzima MTHFR potessero interessare anche precursori endoteliali circolanti, è stata inizialmente effettuata una analisi quantitativa della popolazione EPCs nei pazienti con FA rispetto a pazienti del gruppo CTRL. I risultati indicano che la percentuale di EPCs è significativamente maggiore nei CTRL rispetto a quella osservata in pazienti del gruppo FA (Fig. 18). I valori ottenuti sono stati espressi come percentuale di EPCs di ogni singolo paziente nelle

due popolazioni analizzate, media \pm SD (Ctrl 1,3% vs FA 0,2%; $**p \leq 0,002$). Poiché i risultati di questa analisi non hanno consentito di chiarire definitivamente la presenza di differenze statisticamente significative nel numero di EPCs presenti nei soggetti con mutazione MTHFR C677T in omozigosi rispetto alla quantità totale di EPCs nel sottogruppo di pazienti portatori delle altre varianti (MTHFR C677T in eterozigosi e MTHFR wild-type), più specifiche valutazioni sono state effettuate in relazione alle caratteristiche funzionali delle cellule progenitrici.

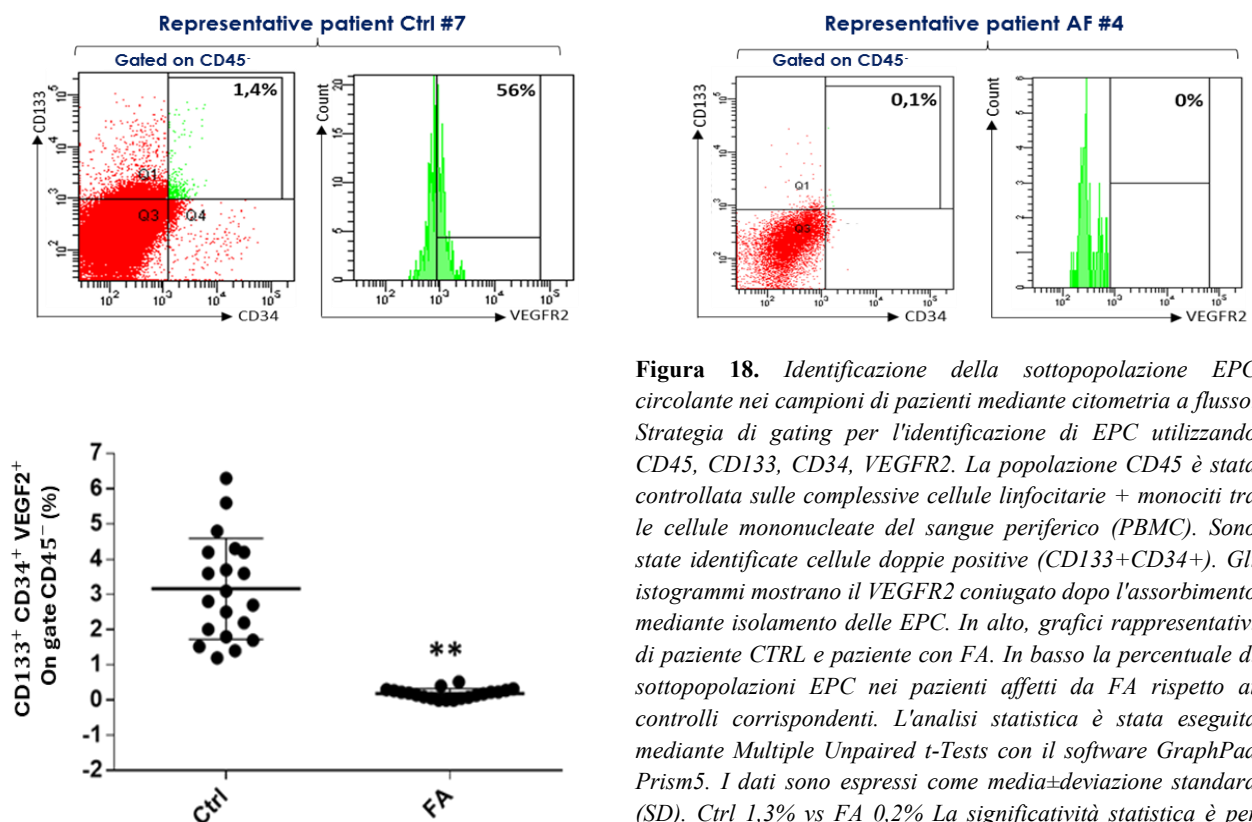


Figura 18. Identificazione della sottopopolazione EPC circolante nei campioni di pazienti mediante citometria a flusso. Strategia di gating per l'identificazione di EPC utilizzando CD45, CD133, CD34, VEGFR2. La popolazione CD45 è stata controllata sulle complessive cellule linfocitarie + monociti tra le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Sono state identificate cellule doppie positive (CD133+CD34+). Gli istogrammi mostrano il VEGFR2 coniugato dopo l'assorbimento mediante isolamento delle EPC. In alto, grafici rappresentativi di paziente CTRL e paziente con FA. In basso la percentuale di sottopopolazioni EPC nei pazienti affetti da FA rispetto ai controlli corrispondenti. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Multiple Unpaired t-Tests con il software GraphPad Prism5. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD). Ctrl 1,3% vs FA 0,2% La significatività statistica è per valori di $p < 0.002$ vs il rispettivo valore nella popolazione di confronto.

4.7. Relazione tra mutazione MTHFR e indici di funzionalità delle EPCs

È quindi seguita una valutazione del grado di funzionalità delle EPCs isolate dai pazienti dei tre sottogruppi sperimentali, attraverso un saggio che misura la capacità di migrazione mediante l'efficienza nella "guarigione della ferita". I risultati (**Fig. 19**), mettono in luce che le EPCs derivate da pazienti con FA e mutazione MTHFR C677T in omozigosi presentano una ridotta capacità di migrazione spontanea rispetto alle EPCs dei pazienti CTRL, che a sua volta non differisce

significativamente nelle EPCs derivate da pazienti con FA e mutazione non omozigotica (CTRL 119%, FA MTHFR non omo 96%, FA MTHFR omo 20%, *** $p < 0,0003$). Ad integrazione dei risultati ottenuti nelle le indagini quantitative, ed a maggiore conforto della ipotesi sperimentale, il saggio funzionale di guarigione della ferita sottolinea quindi come le EPCs isolate da pazienti con FA siano nettamente meno efficienti nella capacità migratoria, con una disfunzionalità direttamente proporzionale alla gravità della mutazione dell'enzima MTHFR (intesa come ridotta efficienza fenotipica dell'attività enzimatica)

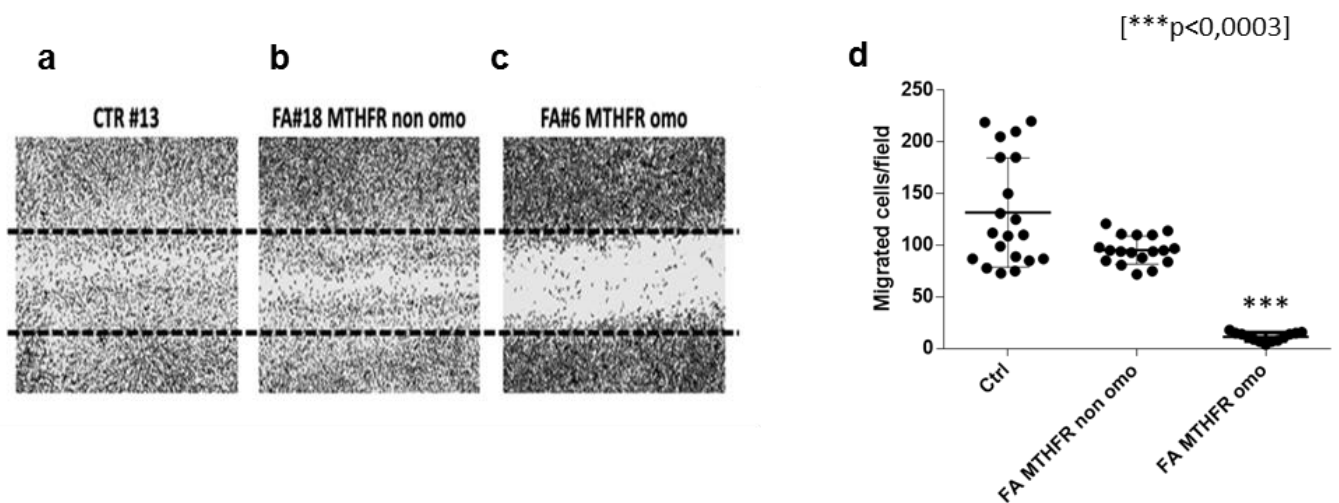


Figura 19. Migrazione spontanea nel test di guarigione della ferita in EPCs da paziente rappresentativo (CTR) (A) ed EPC da pazienti rappresentativi FA (B-C). Sono mostrate immagini rappresentative di tre chiusure di ferite indipendenti, evidenziate da linee tratteggiate, 48 ore dopo la ferita. Ingrandimento originale, X200. Il grafico rappresenta le cellule migrate per campo (D). L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA ad una via con il software GraphPad Prism5. I dati sono espressi come media±deviazione standard (SD). La significatività statistica è per valori di $p < 0,0003$ vs il rispettivo valore nella popolazione CTRL.

4.8. Relazione tra mutazione MTHFR e capacità angiogenica delle EPCs

Accanto alla valutazione della attività migratoria, è stata poi effettuata una misurazione della capacità angiogenica delle EPCs provenienti dalle popolazioni in studio, attraverso saggi *in vivo* su CAM. Rispetto ai risultati ottenuti nel gruppo CTRL, il mezzo condizionato ottenuto dalle EPCs di pazienti con FA e mutazione MTHFR C677T in omozigosi ha mostrato una evidente e significativa riduzione nella capacità angiogenica, misurata sia come estensione della superficie totale dei nuovi vasi sia come numero di rami collaterali emergenti. Un comportamento intermedio è stato osservato negli esperimenti condotti con EPCs provenienti da pazienti con FA e mutazioni MTHFR C677T non omozigotiche (**Fig. 20**)

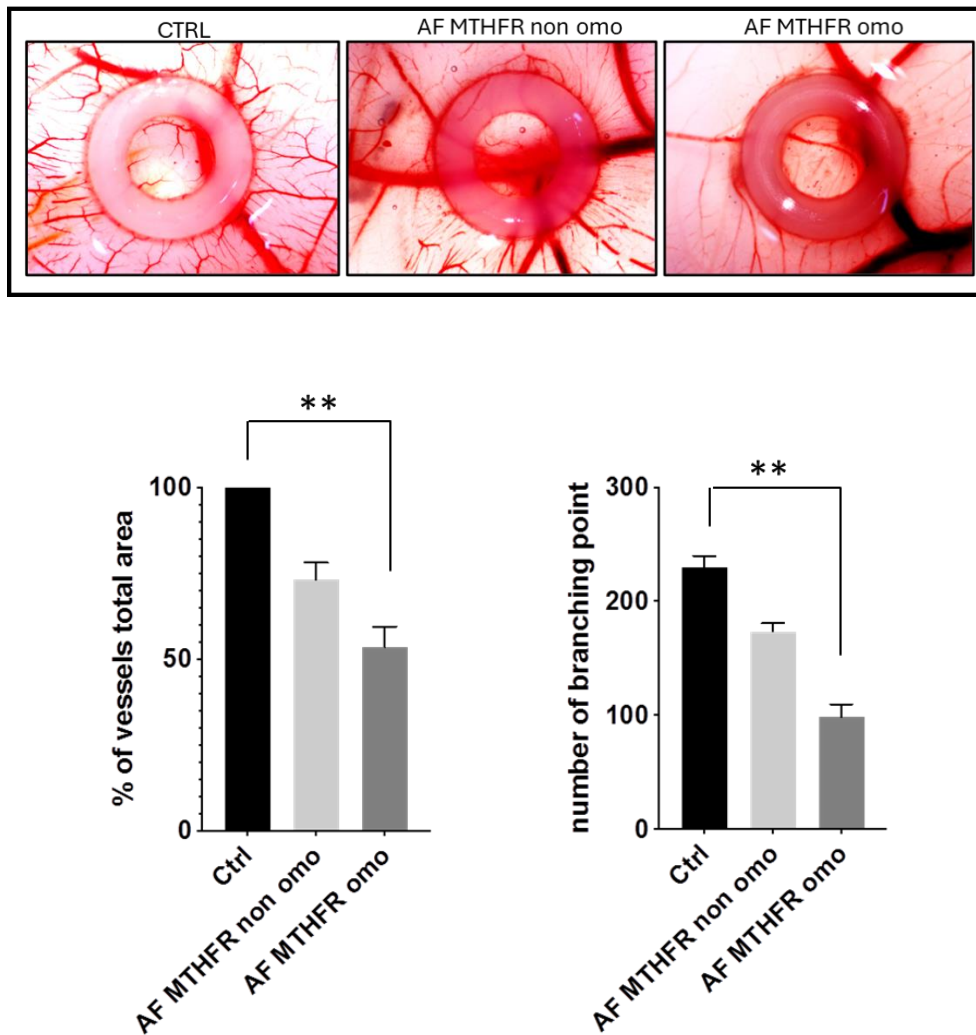


Figura 20. Il mezzo condizionato delle EPCs di pazienti con FA e mutazione omozigote MTHFR C677T mostra una ridotta % di area dei vasi e un numero ridotto di punti di ramificazione rispetto al terreno condizionato con EPCs di pazienti CTRL. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA ad una via con il software GraphPad Prism5. I dati sono espressi come media±deviazione standard (SD). La significatività statistica è per valori di $p < 0.002$ vs il rispettivo valore nella popolazione CTRL.

4.9. Effetti di alterazione farmacologicamente indotta sul ciclo dei folati.

I risultati ottenuti sembrano confermare l'idea che alterazioni genetiche a carico dell'enzima MTHFR possono tradursi in un alterato turnover sia di cellule residenti che di progenitori circolanti, partecipando quindi ai processi di trasformazione fibrotica dell'atrio (permissiva di FA) e alla maggiore vulnerabilità a processi pro-infiammatori, pro-aggreganti e disrigenerativi negli endoteli (favorente la trombogenesi). È pertanto ragionevole ipotizzare che, accanto a mutazioni genetiche, anche alterazioni farmacologicamente indotte del ciclo dei folati possano comportare effetti analoghi.

Il MTX è un antimetabolita analogo dell'acido folico con elevata affinità per l'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR), impiegato come chemioterapico e immunosoppressore. Gli effetti di una esposizione a dosi crescenti di MTX (1 μ M, 10 μ M, 20 μ M) è stata valutata sia su cellule endoteliali adulte (cellule endoteliali di origine aortica bovina, BAECs), e su popolazioni di EPCs isolate da pazienti del gruppo CTRL. In entrambe le popolazioni cellulari (**Fig. 21 a-b-c-d**) il MTX ha inficiato la capacità migratoria delle cellule in maniera dose-dipendente, riproducendo gli effetti osservati in EPCs isolate da soggetti con mutazione MTHFR C677T in omozigosi.

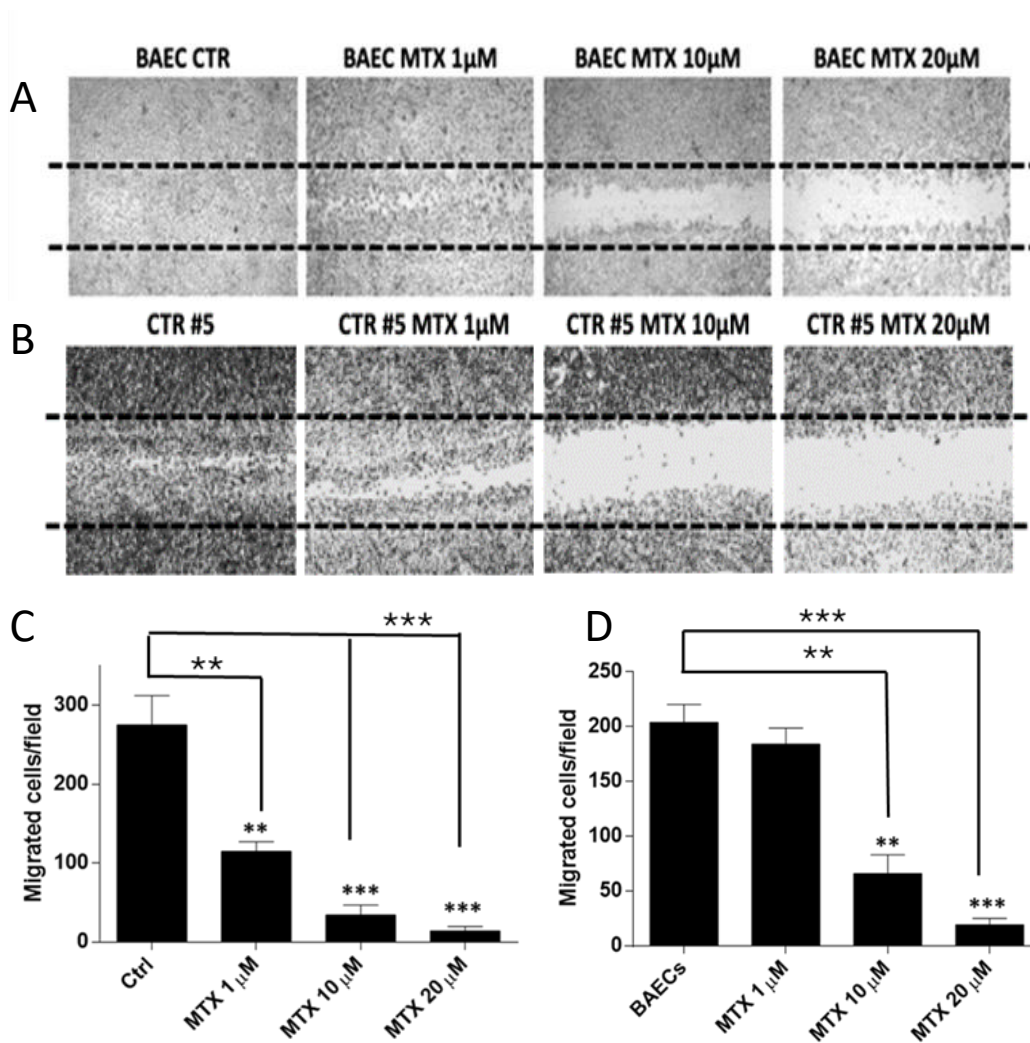


Figura 21. L'esposizione a dosi crescenti di MTX ha determinato una significativa riduzione dose-correlata della capacità migratoria in cellule endoteliali adulte di origine aortica bovina (BAEC) (a-c) e in EPCs provenienti da pazienti di controllo (b-d). L'analisi statistica è stata eseguita con il test T di Student per dati raggruppati utilizzando il software GraphPad Prism5. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD) di almeno tre esperimenti ripetuti su campioni indipendenti per ciascuna condizione. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0005$ vs i rispettivi valori in assenza di MTX.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'interesse crescente verso la comprensione dei fattori di rischio coinvolti nella patogenesi dello stroke criptogenico nasce dalle evidenti controversie sulle più accreditate teorie patogenetiche. In tempi recenti i risultati di 3 importanti trials clinici randomizzati, il NAVIGATE-ESUS [73], il RE-SPECT ESUS [74] e l'ARCADIA [75], hanno dovuto registrare la scarsa efficacia del trattamento anticoagulante nei soggetti con pregresso ictus, sottolineando indirettamente la mancanza di una stringente relazione causa-effetto tra tromboembolismi ed episodi di ischemia cerebrale, e rimarcando – nello studio ARTESIA - i rischi aggiuntivi legati a potenziali sanguinamenti anche laddove si registrasse una minore incidenza di ulteriori episodi ischemici cerebrali [76].

Queste nuove evidenze, in aggiunta alle perplessità già espresse negli studi TRENDS [15] e ASSERT [16] circa la mancanza di un chiaro vincolo temporale tra i parossismi di FA e gli episodi di ictus, accanto alla ridotta efficacia delle terapie antiaritmiche ablativo o farmacologiche nella riduzione degli eventi di stroke, hanno stimolato la ricerca verso condizioni comuni, sottese ai singoli fattori già individuati, che fossero in grado di spiegare i molteplici aspetti patogenetici alla base dello stroke criptogenico.

Questa ricerca nasce dal presupposto ipotetico che alterazioni di cicli cellulari metabolici fondamentali come quello dei folati, seppure non in grado di indurre cambiamenti clinicamente apprezzabili nei singoli organi, possano però coinvolgere numerose funzionalità confluenti, partecipando quindi alla determinazione di un substrato comune di rischio significativo per lo stroke. L'attenzione si è quindi primariamente rivolta alla caratterizzazione dell'assetto cardiovascolare in soggetti con FA e pregresso evento ischemico in base al genotipo di MTHFR, un enzima chiave nel ciclo dei folati.

Correlazione tra mutazioni MTHFR C677T e AFib. Sebbene le mutazioni dell'enzima MTHFR siano estremamente comuni e frequentemente non rilevanti dal punto di vista clinico, la presenza della variante MTHFR C677T in omozigosi nel gruppo di pazienti con FA e pregresso episodio di stroke si è dimostrata fortemente correlata non soltanto ai valori di omocisteina plasmatica, confermando dati di letteratura [77], ma anche all'estensione delle aree di basso voltaggio atriale, calcolate in percentuale rispetto all'intero mappaggio endocavitario. Questo parametro, indice surrogato riconosciuto di AFib [78], sottolinea la correlazione tra gravità della mutazione MTHFR e l'estensione del grado di AFib: infatti, sia i livelli di omocisteinemia che il grado di AFib si sono rivelati proporzionalmente maggiori nei soggetti con mutazione più severa di MTHFR se confrontati con i pazienti portatori di polimorfismi poco impattanti sulla funzionalità dello stesso enzima. Il dato acquista ancora più rilevanza se si considera che i pazienti di tutti i gruppi analizzati presentavano valori omogenei per variabili confondenti quali profilo lipidico, livelli glicemici e pressione arteriosa, potendo quindi rappresentare un fattore indipendente rispetto ad altri già riconosciuti elementi di rischio cardiovascolare.

Se queste evidenze suggeriscono che la compromissione della attività di MTHFR possa contribuire in maniera rilevante al rimodellamento atriale, favorendo quindi una condizione predisponente alla FA, ulteriori elementi emersi dallo studio concorrono a proporre il potenziale ruolo nello stroke: dalla analisi della correlazione tra il grado di AFib e parametri biochimici ed ematologici, emerge infatti un rapporto significativo e diretto non soltanto con i livelli di folati o di omocisteina, ma anche con alterazioni a carico del numero e delle caratteristiche distributive dei globuli rossi (RBC, RDW). Non è certo inaspettato il concetto che una corretta disponibilità di folati sia essenziale per tutti i tessuti con elevato indice proliferativo [79]; che quindi soggetti con mutazioni severe della funzionalità di MTHFR presentino maggiore tendenza alla AFib, e che l'estensione di AFib correli a sua volta con turbe della eritropoiesi midollare -quali la ridotta conta eritrocitaria o l'aumentata anisocitosi eritrocitaria- sostiene l'ipotesi iniziale di un meccanismo biocellulare la cui

alterazione si traduce in una molteplicità di effetti su citotipi differenti, ma potenzialmente collegati, e tutti coinvolti nella predisposizione ad accidenti cerebro vascolari. Le indagini successive hanno quindi valutato l'impatto del dismetabolismo dei folati su cellule direttamente coinvolte nella struttura dei vasi e nella omeostasi cardiocircolatoria.

Relazione tra mutazione MTHFR C677T, disfunzione endoteliale e assetto trombofilico.

Il marker più precoce di rischio cardiovascolare è rappresentato dalla disfunzione endoteliale [80, 81], valutabile clinicamente tramite la misurazione ecografica della dilatazione flusso-mediata in arteria brachiale (Flow-Mediated Dilation, FMD) e la quantificazione dell'indice di iperemia reattiva (Reactive Hyperaemia Index, RHI) tramite tonometria arteriosa periferica. Dal punto di vista laboratoristico, l'indice più accreditato di disfunzione endoteliale è rappresentato dalle alterazioni del rapporto L-Arg/ADMA [82], che indirettamente misura la biodisponibilità di NO in base all'equilibrio tra il substrato L-Arg e la componente inibitoria ADMA. In soggetti con iperomocisteinemia, il maggior rischio cardiovascolare è stato associato anche alla alterata attività trasformativa omocisteina-indotta delle dimetilarginina-dimetil-aminoidrolasi (DDAH), enzimi deputati alla degradazione di ADMA. Nel nostro studio, la valutazione della funzionalità endoteliale ha chiaramente indicato che nei pazienti con mutazione MTHFR C677T in omozigosi è presente una significativa riduzione del rapporto L-Arg/ADMA.

Sebbene non sia stata direttamente analizzata la funzionalità degli enzimi deputati alla produzione endoteliale di NO (eNOS), di quelli coinvolti nel pathway di "salvataggio" della BH4, importante cofattore di eNOS (DHFR), o degli enzimi DDAH, queste evidenze riflettono l'impatto del dismetabolismo dei folati sull'endotelio, confermando la maggiore vulnerabilità dei soggetti portatori di mutazione a carico della MTHFR a fenomeni che ne compromettono la funzione protettiva, perfino quando paragonata a condizioni di disfunzione endoteliale già accertata in pazienti ipertesi del gruppo CTRL. A maggiore conferma di un assetto vascolare "permissivo" a cui la disfunzione endoteliale espone, il dosaggio delle citochine, chemochine e fattori di crescita ha

confermato livelli circolanti in generale più elevati nei soggetti con polimorfismo MTHFR C677T in omozigosi rispetto ai portatori di mutazioni meno rilevanti, suggerendo quindi una maggiore predisposizione all'infiammazione endoteliale e la propensione ad eventi trombotici in questi soggetti, direttamente proporzionale al grado di compromissione dell'enzima MTHFR.

Relazione tra mutazione MTHFR C677T e progenitori endoteliali circolanti. Un elemento innovativo della ricerca è rappresentato dallo studio delle alterazioni nei progenitori endoteliali circolanti, cellule fondamentali per il mantenimento della funzione vascolare. Le conoscenze sugli squilibri delle popolazioni di progenitori circolanti nei pazienti con FA sono ancora limitate, e ancor meno è noto riguardo alla loro relazione con la AFib. Tuttavia, nei pazienti con FA persistente si registra una significativa riduzione del pool di EPCs (identificati come CD45⁻CD34⁺KDR⁺), mentre, al contrario, il pool di monociti intermedi (CD14⁺⁺CD16⁺) risulta marcatamente aumentato. Questa evidenza suggerisce uno squilibrio a favore delle cellule di origine mieloide midollare (CD45⁺CD14⁺) rispetto a quelle emangioblastiche con una differenziazione più avanzata, incluse le cellule endoteliali (CD45⁻CD34⁺CD133⁺CD117⁺). Tale squilibrio potrebbe riflettere un'alterazione nei processi di transdifferenziazione cellulare, come la transizione endotelio-mesenchimale, che potrebbe favorire una transdifferenziazione fibroblastica a livello degli atri, contribuendo così alla AFib e conseguentemente alla maggiore frequenza di episodi di FA [83]. Nei pazienti con mutazione MTHFR C677T in omozigosi, è stata osservata una significativa riduzione del pool di EPCs e un'alterazione delle loro capacità funzionali, valutate tramite saggi *in vivo* e *in vitro*. Queste alterazioni, che si traducono quindi sia in un deterioramento della capacità migratoria e riparativa (analizzata tramite il saggio di guarigione della ferita) sia nella inefficiente attività di turnover degli endoteli (valutabile tramite la capacità neoangiogenica) sono coerenti con il ruolo cruciale del ciclo dei folati nei processi di proliferazione cellulare, già riconosciuto in patologie ematologiche come l'anemia megaloblastica [84], e si ricollegano alle modificazioni già osservate sulle caratteristiche delle cellule della serie rossa nei pazienti con mutazione MTHFR C677T in omozigosi. Se a livello vascolare l'alterata funzionalità delle EPCs potrebbe riflettere uno sbilanciamento nella

differenziazione dei progenitori midollari verso un fenotipo fibrocitico e monocitico, a scapito dei progenitori endoteliali, contribuendo sia alla disfunzione endoteliale sia alla predisposizione tromboembolica, a livello atriale potrebbe rappresentare un possibile meccanismo patogenetico alla base della AFib, in cui il processo di transizione endotelio-mesenchimale promuove la transdifferenziazione cellulare verso un fenotipo fibroblastico.

Alla luce della triade di Virchow (ipercoagulabilità, stasi e danno endoteliale), i fenomeni descritti richiamano alcuni dei meccanismi patogenetici dello stroke criptogenico, con particolare riferimento a stasi ematica e disfunzione endoteliale. La stasi può essere favorita dall'AFib, che determina ipocontrattilità atriale e promuove fenomeni trombotici; se a ciò si aggiunge la propensione a turbe elettriche che innescano trigger fibrillanti, l'impatto su condizioni di rischio embolico risultano ancor più potenziate. D'altro canto, la disfunzione endoteliale, di per se già predisponente a fenomeni pro-aggreganti, è peggiorata dalla riduzione numerica e funzionale delle EPCs, con effetti sinergici sulla predisposizione alla trombosi.

Dismetabolismo dei folati da causa iatrogena. Una condizione geneticamente acquisita come la mutazione dell'enzima MTHFR sembra quindi riflettersi, attraverso la disregolazione del ciclo dei folati e del ciclo della metionina, nella alterazione di molteplici steps della proliferazione e maturazione cellulare, comportando una serie di conseguenze che, nel nostro caso, sembrano tutte convergere verso la predisposizione all'insorgenza di eventi ischemici. Parallelamente, l'effetto di farmaci antimetaboliti come il MTX, che agisce come substrato alternativo all'acido folico e inibisce le attività di enzimi fondamentali nella formazione di tetraidrofolato, fornisce ulteriori indicazioni: l'esposizione a dosi-crescenti di MTX si è dimostrata in grado di riprodurre, in vitro, alterazioni nella capacità migratoria -sia di cellule endoteliali adulte che di precursori endoteliali- di entità sovrapponibile a quella osservata nei pazienti con mutazione MTHFR C677T in omozigosi. Sebbene queste osservazioni siano del tutto preliminari e limitate alla sola osservazione in vitro, confermano dati di letteratura che riportano un aumento dei livelli di omocisteina plasmatica [85] e un incremento

del grado di apoptosi delle cellule endoteliali [86] in pazienti che assumano trattamenti a base di MTX.

Conclusioni e limiti dello studio. L'ipotesi che una mutazione MTHFR C677T in omozigosi possa rappresentare un fattore di rischio per lo stroke criptogenico offre nuove evidenze che collegano la disfunzione del ciclo dei folati, le alterazioni delle EPCs e il grado di AFib, ponendo in risalto l'importanza di studi ulteriori per la comprensione approfondita delle relazioni patogenetiche tra FA, tromboembolismi e stroke. Analizzando complessivamente i risultati emersi ciò che appare con forza è il potenziale clinico di parametri facilmente rilevabili, ripetibili, non invasivi e relativamente poco costosi in un contesto diagnostico-predittivo: il genotipo MTHFR e il riconoscimento di varianti poco funzionali, se accompagnato dall'alterato rapporto L-Arg/ADMA, dei livelli di citochine pro-infiammatorie, dei valori di omocisteina plasmatica e di indici di anisoeritrocitosi, potrebbe fornire indicazioni importanti per il monitoraggio terapeutico di pazienti con eventi ischemici pregressi, oltre che per l'identificazione di fattori di rischio in individui con una storia familiare di stroke. Inoltre, le osservazioni legate alle indagini con MTX, noto per il suo impatto sui precursori ematopoietici ed endoteliali, suggeriscono possibili rischi aggiuntivi associati al suo utilizzo, specialmente nelle condizioni cliniche in cui è comunemente impiegato per tempi lunghi ed in soggetti anche giovani.

Nonostante gli interessanti risultati ottenuti, diversi limiti devono essere presi in considerazione. Un primo limite riguarda l'interpretazione delle turbe significative del ciclo dei folati, basata sulla presenza di una sola mutazione genetica in omozigosi di un enzima cardine, la MTHFR. Sebbene sia ampiamente riconosciuto che la mutazione C677T in omozigosi aumenti il rischio di tromboembolismo venoso, conferendo un buon potere predittivo per disfunzioni del ciclo dei folati, le restanti mutazioni della MTHFR, come la forma eterozigote o la doppia eterozigosi con A1298C, non sono altrettanto indicative. Inoltre, non si può escludere che altri difetti a carico di enzimi correlati al ciclo dei folati possano influire sul rischio metabolico di un paziente, anche se questo non appare come MTHFR omozigote. Un secondo limite riguarda la limitata numerosità campionaria del sottogruppo di pazienti studiati per i progenitori endoteliali circolanti. Sebbene i risultati suggeriscano

che la disfunzione e la scarsità di questi progenitori siano più marcate rispetto ai controlli, l'esigua disponibilità di dati non consente analisi più approfondite sul possibile ruolo causale delle turbe del ciclo dei folati.

Rispetto a queste criticità, che sono inevitabili nello stato attuale della ricerca, gli studi in corso potranno ulteriormente confermare e rafforzare le informazioni raccolte finora. L'auspicio è che la migliore comprensione complessiva di questi processi patologici possa contribuire ad un approccio più consapevole alla gestione clinica di soggetti con fattori di rischio cerebrovascolare.

6. BIBLIOGRAFIA

1. GBD 2019 Stroke Collaborators. *Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. *Lancet Neurol.* 2021; 20:795-820...
2. Adams HP, et al. *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. *Stroke.* 1993;24:35–41.
3. Hart RG, et al.. *Embolic Stroke of Undetermined Source. A Systematic Review and Clinical Update*. *Stroke* 2017; 48:867-872.
4. Ntaios G, et al. *Embolic strokes of undetermined source: a clinical consensus statement of the ESC Council on Stroke, the European Association of Cardiovascular Imaging and the European Heart Rhythm Association of the ESC*. *Eur Heart J.* 2024 ;45:1701-1715.
5. Li L, et al. *Oxford Vascular Study. Age-specific risks, severity, time course, and outcome of bleeding on long-term antiplatelet treatment after vascular events: a population-based cohort study*. *Lancet.* 2017;390:490–499.
6. Sanna T, et al. *Cryptogenic stroke and underlying atrial fibrillation*. *N Engl J Med* 2014 Jun 26; 370: 2478–2486.
7. Mas JL, et al. *Recurrent cerebrovascular events associated with patent foramen ovale, atrial septal aneurysm, or both*. *N Engl J Med.* 2001;345:1740–1746.
8. Chatterjee A, Hillegass WB. *Embolic stroke of undetermined source and patent foramen ovale closure: Practice insights from meta-analysis?* *Catheter Cardiovasc Interv.* 2018; 92:1161-1162..
9. Hara H, et al. *Patent foramen ovale: current pathology, pathophysiology, and clinical status*. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1768.
10. Bang OY, et al. *Patent Foramen Ovale and Stroke-Current Status*. *J Stroke.* 2015 17:229-37.
11. Srivastava TN, Payment MF. *Paradoxical embolism — thrombus in transit through a patent foramen ovale*. *N Engl J Med.* 1997;337:681–681.
12. Kasner SE, et al. *Uncertainties and Controversies in the Management of Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack Patients With Patent Foramen Ovale*. *Stroke* 2021; 52, e806-e819
13. Benjamin EJ, et al., *American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation.* 2019;139:e56-e528..
14. Hill AB, *The Environment and Disease: Association or Causation?* *Proc R Soc Med,* 1965. 58: 295-300.

15. Glotzer TV, et al., *The relationship between daily atrial tachyarrhythmia burden from implantable device diagnostics and stroke risk: the TRENDS study*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2009, 2: 474-80.
16. Nuotio I, et al., *Time to cardioversion for acute atrial fibrillation and thromboembolic complications*. *JAMA*, 2014. 312: 647-9.
17. Flaker G, et al., *Efficacy and safety of dabigatran compared to warfarin in patients with paroxysmal, persistent, and permanent atrial fibrillation: results from the RE-LY (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy) study*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 59: 854-5.
18. Healey JS, et al., *Subclinical atrial fibrillation and the risk of stroke*. *N Engl J Med*, 2012. 366: 120-9.
19. Kamel H, et al., *Atrial Fibrillation and Mechanisms of Stroke: Time for a New Model*. *Stroke*, 2016. 47: 895-900.
20. Frustaci A, et al., *Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation*. *Circulation*, 1997. 96:1180-4
21. Cai H, et al., *Downregulation of endocardial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in atrial fibrillation: potential mechanisms for atrial thrombosis and stroke*. *Circulation*, 2002. 106: 2854-8.
22. Darlington A and McCauley MD, *Atrial Cardiomyopathy: An Unexplored Limb of Virchow's Triad for AF Stroke Prophylaxis*. *Front Cardiovasc Med*, 2020. 7: 11.
23. Hirsh BJ, Copeland-Halperin RS, and Halperin JL, *Fibrotic atrial cardiomyopathy, atrial fibrillation, and thromboembolism: mechanistic links and clinical inferences*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. 65: 2239-51.
24. Bonetti PO, Lerman LO, and Lerman A. *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23: 168-75.
25. Case J, Ingram DA, and Haneline LS. *Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10: 1895-907.
26. Kato T., et al., *Endothelial-mesenchymal transition in human atrial fibrillation*. *J Cardiol*, 2017. 69: 706-711.
27. Huang C., et al., *Endothelial progenitor cells are associated with plasma homocysteine in coronary artery disease*. *Acta Cardiol*, 2011. 66: 773-7.
28. Evans TC and Jehle D., *The red blood cell distribution width*. *J Emerg Med*, 1991. 9: 71-4.
29. Peng YF and Pan GG, *Red blood cell distribution width predicts homocysteine levels in adult population without vitamin B12 and folate deficiencies*. *Int J Cardiol*, 2017. 227: 8-10.
30. Danese E, Lippi G., and Montagnana M., *Red blood cell distribution width and cardiovascular diseases*. *J Thorac Dis*, 2015. 7: E402-11.

31. Dabbah S., et al., *Relation between red cell distribution width and clinical outcomes after acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2010. 105: 312-7.
32. Adamsson Eryd, S., et al., *Red blood cell distribution width is associated with incidence of atrial fibrillation*. J Intern Med, 2014. 275: 84-92.
33. Shao Q, et al., *Red blood cell distribution width as a predictor of atrial fibrillation*. J Clin Lab Anal, 2018. 32: e22378.
34. Saliba W, et al., *The association between red cell distribution width and stroke in patients with atrial fibrillation*. Am J Med, 2015. 128:192 e11-8.
35. Li,H, et al. *Red blood cell distribution width and the recurrence of atrial fibrillation after ablation in patients with paroxysmal non-valvular symptomatic atrial fibrillation*. Int J Cardiol, 2016. 203: 834-6.
36. Juo S. et al. *The MTHFR 677 C/T polymorphism influences plasma levels of adhesion molecules and nitric oxide*. Thrombosis Res, 2008, 121, 549-554.
37. Moll S, & Varga EA. *Homocysteine and MTHFR mutations*. Circulation, 2015, 132, e6-e9.
38. Zhang Q, et al., . *MTHFR Polymorphism and Folic Acid Supplementation Influence Serum Homocysteine Levels in Psoriatic Patients Treated with Methotrexate*. J Clin Med. 2022, 11, 4580.
39. Merkle CJ, et al., *Methotrexate causes apoptosis in postmitotic endothelial cells*. Biol Res Nurs. 2000 ;2:5-14..
40. Nygård O, et al., *Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study*. JAMA. 1995 ;274:1526-33.
41. Wald DS, Law M, & Morris JK. *Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis*. Br Med J. 2002, 325, 1202.
42. Harker LA, et al, *Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis*. J Clin Invest, 1976, 58, 731-741.
43. Berg MVD, et al.,*Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease*. Eur J Clin Invest, 1995, 25, 176-181.
44. Welch GN, Upchurch Jr, G., & Loscalzo, J. *Hyperhomocyst (e) inemia and atherothrombosis*. Annals NYAcad Sci. 1997, 811, 48-59.
45. Loscalzo, J. *The oxidant stress of hyperhomocyst (e) inemia*. J Clin Invest, 1996, 98(1), 5-7.
46. Tsai JC, et al. *Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis*. PNAS, 1994, 91, 6369-6373.
47. Upchurch GR, et al. *Homocyst (e) ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1997, 272: 17012-17017.
48. Topal G, et al. *Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin*. Free Rad Biol Med, 2004, 36, 1532-1541.

49. Leone A, et al. *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*. The Lancet, 1992, 339, 572-575.
50. Frederiksen J, et al. *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study*. Blood 2004. 104: 3046-51.
51. Cooke JP. *Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?* Circulation. 2004;109:1813-8..
52. Stuhlinger MC, et al. *Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine*. Circulation, 2003. 108: 933-8.
53. Juo SH, et al. *The MTHFR 677 C/T polymorphism influences plasma levels of adhesion molecules and nitric oxide*. Thromb Res, 2008. 121: 549-54.
54. Cooke JP. *Does ADMA cause endothelial dysfunction?* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000, 209:2032-7.
55. Schnabel R. et al., *Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study*. Circ Res. 2005 ;97: e53-9.
56. Stern LL, et al. *Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000 9, 849-853.
57. Zhu JH, et al. *Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells*. J Mol Cell Cardiol. 2006; 40: 648-52.
58. Liew SC, Gupta ED. *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases*. Eur J Med Genet. 2015;58:1-10..
59. Otto S, et al., *Endothelial progenitor cells and plaque burden in stented coronary artery segments: an optical coherence tomography study six months after elective PCI*. BMC Cardiovasc Disord, 2017, 17: 103.
60. Urbich C. and Dimmeler S. *Endothelial progenitor cells functional characterization*. Trends Cardiovasc Med, 2004, 14: 318-22.
61. Stromhaug A. and Warren DJ. *A comparison of the effects of nine folate analogs on early and late murine hematopoietic progenitor cells in vitro*. Cancer Chemother Pharmacol, 2000, 45:450-6.
62. Zhang D, et al., *Homocysteine accelerates senescence of endothelial cells via DNA hypomethylation of human telomerase reverse transcriptase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35: 71-8.
63. Lemarie CA, et al., *Mthfr deficiency induces endothelial progenitor cell senescence via uncoupling of eNOS and downregulation of SIRT1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300: H745-53.

64. Nelson J, et al. *Hyperhomocysteinemia suppresses bone marrow CD34+/VEGF receptor 2+ cells and inhibits progenitor cell mobilization and homing to injured vasculature—a role of beta1-integrin in progenitor cell migration and adhesion.* FASEB J, 2015, 29: 3085-99.
65. Meier B, et al., *Percutaneous closure of patent foramen ovale in cryptogenic embolism.* N Engl J Med, 2013, 368: 1083-91.
66. Whitsett J., et al. *Human endothelial dihydrofolate reductase low activity limits vascular tetrahydrobiopterin recycling.* Free Radic Biol Med, 2013, 63: 143-50.
67. He L, et al. *Homocysteine impairs coronary artery endothelial function by inhibiting tetrahydrobiopterin in patients with hyperhomocysteinemia.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. 299: E1061-5.
68. Kayacelebi AA, et al. *Biosynthesis of homoarginine (hArg) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) from acutely and chronically administered free L-arginine in humans.* Amino Acids, 2015, 47: 1893-908.
69. Lemarie CA, et al. *Mthfr deficiency induces endothelial progenitor cell senescence via uncoupling of eNOS and downregulation of SIRT1.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300: H745-53.
70. Marti-Fabregas J, et al., *Endothelial progenitor cells in acute ischemic stroke.* Brain Behav, 2013, 3: 649-55.
71. Suehiro H, et al., *Circulating intermediate monocytes and toll-like receptor 4 correlate with low-voltage zones in atrial fibrillation.* Heart Vessels, 2020, 35: 1717-1726.
72. Rolf S, et al., *Tailored atrial substrate modification based on low-voltage areas in catheter ablation of atrial fibrillation.* Circ Arrhythm Electrophysiol, 2014, 7: 825-33.
73. Hart RG, et al., *Rivaroxaban for Stroke Prevention after Embolic Stroke of Undetermined Source.* N Engl J Med, 2018, 378: 2191-2201.
74. Diener HC, et al. *Dabigatran for Prevention of Stroke after Embolic Stroke of Undetermined Source.* N Engl J Med, 2019, 380: 1906-1917.
75. Kamel H, et al. *Apixaban to Prevent Recurrence After Cryptogenic Stroke in Patients With Atrial Cardiopathy: The ARCADIA Randomized Clinical Trial.* JAMA, 2024, 331: 573-581.
76. Healey JS, et al., *Apixaban for Stroke Prevention in Subclinical Atrial Fibrillation.* N Engl J Med, 2024, 390: 107-117.
77. Frosst P, et al. *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.* Nat Gen, 1995, 10: 111-113..
78. Vlachos K, et al. *Low-voltage areas detected by high-density electroanatomical mapping predict recurrence after ablation for paroxysmal atrial fibrillation.* J Cardiovasc Electrophysiol. 2017;28:1393-1402.
79. Blount BC, et al. *Folate Deficiency Causes Uracil Misincorporation into Human DNA and Chromosome Breakage: Implications for Cancer and Neuronal Damage.* PNAS, 1997, 94:3290-5.

80. Anderson TJ, et al. *Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations*. J Am Coll Cardiol. 1995;26:1235-41.
81. Corretti MC, et al. *International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force*. J Am Coll Cardiol. 2002;39:257-65..
82. Böger RH. *Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials*. Vasc Med. 2005; 10: S19-25.
83. Kato T, et al., *Endothelial-mesenchymal transition in human atrial fibrillation*. J Cardiol, 2017, 69: 706-711.
84. Green R, & Miller JW. *Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status*. Seminars in hematology, 1999, 36, 47–64.
85. Cafaro G, et al. *Methotrexate improves endothelial function in early rheumatoid arthritis patients after 3 months of treatment*. Arthritis Res Ther. 2022; 24:236.
86. Micha R, et al. *Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease*. Am J Cardiol. 2011; 108:1362-70.