



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Università degli Studi di Padova**

**Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia**

U.O.C. Medicina Generale I  
Ospedale Cà Foncello di Treviso  
Direttore: Prof. Carlo Agostini

**Il ruolo dell'acido valproico nello sviluppo delle malattie  
cardiovascolari: studio monocentrico**

Relatore: Prof. Marcello Rattazzi

Correlatrice: Prof.ssa Carla Felice

Laureanda: Martina Pastrello

**Anno accademico 2022/2023**



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Epidemiologia e fattori di rischio</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Anatomia e istologia della valvola aortica</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Patogenesi della calcificazione valvolare</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1 Fase iniziale</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2 Fase di propagazione</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Meccanismi molecolari implicati nel processo di calcificazione</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Stenosi valvolare aortica: fisiopatologia e clinica</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Diagnosi e trattamento</b>	<b>17</b>
<b>1.6.1 Diagnosi</b>	<b>17</b>
<b>1.6.2 Trattamento</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Acetiltransferasi e deacetilasi istoniche</b>	<b>22</b>
<b>1.8 Acido valproico</b>	<b>24</b>
<b>1.8.1 Farmacocinetica</b>	<b>25</b>
<b>1.8.2 Farmacodinamica</b>	<b>26</b>
<b>1.9 Dati preliminari: calcificazione indotta da VPA in vitro</b>	<b>27</b>
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Disegno e popolazione dello studio</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Raccolta dei dati e strumenti utilizzati</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Obiettivi primari e secondari</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Analisi statistica</b>	<b>34</b>
<b>4. RISULTATI</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Prevalenza della stenosi aortica</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Prevalenza dei fattori di rischio cardiovascolari</b>	<b>37</b>
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>39</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>42</b>

## RIASSUNTO

**Introduzione.** L'acido valproico (VPA) è un farmaco antiepilettico che, tra i vari effetti, ha anche la capacità di inibire alcune classi di deacetilasi istoniche, in particolare quelle di classe I. Secondo diversi studi *in vitro* si è scoperto che l'inibizione delle deacetilasi istoniche, indotta dall'acido valproico, potenzi la calcificazione vascolare promuovendo la differenziazione in senso osteoblastico di diverse tipologie di cellule, in primis le cellule valvolari interstiziali (VIC). Si è inoltre osservato come l'acido valproico, oltre a promuovere la maturazione osteoblastica e la riparazione ossea, aumenti l'espressione genica di alcuni marcatori di osteogenesi e di infiammazione quali ALP, RUNX2, BMP-2 e IL-6 nelle VIC. Da questo si evince come l'acetilazione istonica possa essere implicata nella progressione della malattia calcifica della valvola aortica (CAVD).

**Scopo dello studio.** Descrivere la prevalenza di stenosi aortica calcifica in pazienti trattati con VPA per epilessia confrontandoli con un gruppo di pazienti trattato con altri farmaci antiepilettici, sulla base dei dati preliminari inerenti la calcificazione indotta dall'acido valproico *in vitro*.

**Materiali e metodi.** È stato condotto uno studio osservazionale su pazienti affetti da epilessia seguiti presso l'Ambulatorio di Epilessia del reparto di Neurologia dell'Ospedale Universitario Cà Foncello di Treviso, suddivisi in due gruppi: quelli trattati con VPA (casi) e quelli trattati con altri farmaci antiepilettici (controlli). Sono stati raccolti dati anamnestici, farmacologici e dati relativi a fattori di rischio cardiovascolare, all'esecuzione o meno di un ecocardiogramma o di una TC al torace e a diagnosi nota di stenosi aortica. È stato eseguito un confronto tra i due gruppi in termini di prevalenza di stenosi aortica nota e di fattori di rischio cardiovascolare e di exitus.

**Risultati.** Sono stati inclusi nell'analisi 280 pazienti complessivi, di cui 98 trattati con VPA e 182 con altri antiepilettici. La popolazione del nostro studio presenta un'età mediana di 58 e 61 anni, rispettivamente per i pazienti che assumono o hanno assunto per almeno un anno il VPA e per i pazienti che assumono altri farmaci

antiepilettici ( $p=0.036$ ). Non sono emerse altre differenze statisticamente significative negli altri dati demografici e nella prevalenza di diverse comorbidità. Le percentuali di diagnosi nota di stenosi aortica sono risultate sovrapponibili tra i due gruppi: in particolare, 3.1% nei pazienti trattati con VPA contro l'8.8% in quelli trattati con altri farmaci ( $p=0.130$ ). Anche per quanto concerne i principali fattori di rischio cardiovascolari (dislipidemia, ipertensione, diabete, precedenti eventi cardiovascolari), non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti. Allo stesso modo, relativamente ai dati sull'exitus, non si evidenziano differenze statisticamente significative, in particolare, 1% nei pazienti trattati con VPA e 2.7% in quelli trattati con altri farmaci antiepilettici.

**Conclusioni.** I risultati di questo studio al momento non confermano l'azione calcificante del VPA in vivo. Tuttavia, i dati andranno integrati in modo prospettico con informazioni diagnostiche dettagliate sulla presenza o meno di stenosi aortica calcifica e aumentando la numerosità campionaria.

## ABSTRACT

**Introduction.** Valproic acid (VPA) is an antiepileptic drug which, among its various effects, also has the ability to inhibit some classes of histone deacetylases, in particular those of class I. According to several *in vitro* studies it has been discovered that the inhibition of histone deacetylases, induced by valproic acid, potentiates vascular calcification by promoting the osteoblastic differentiation of different types of cells, primarily the interstitial valve cells (VIC). It has also been observed that valproic acid, in addition to promoting osteoblastic maturation and bone repair, increases the gene expression of some markers of osteogenesis and inflammation such as ALP, RUNX2, BMP-2 and IL-6 in VICs. It is clear that histone acetylation may be implicated in the progression of calcific aortic valve disease (CAVD).

**Purpose of the study.** Describe the prevalence of calcific aortic stenosis in patients treated with VPA for epilepsy by comparing them with a group of patients treated with other antiepileptic drugs, based on preliminary data regarding calcification induced by valproic acid *in vitro*.

**Materials and methods.** An observational study was conducted on patients suffering from epilepsy followed at the Epilepsy Clinic of the Neurology department of the Cà Foncello University Hospital in Treviso, divided into two groups: those treated with VPA (cases) and those treated with other antiepileptic drugs (controls). Anamnestic and pharmacological data and data relating to cardiovascular risk factors, whether or not an echocardiogram or chest CT scan was performed and a known diagnosis of aortic stenosis were collected. A comparison was performed between the two groups in terms of prevalence of known aortic stenosis and cardiovascular risk factors and death.

**Results.** A total of 280 patients were included in the analysis, of which 98 treated with VPA and 182 with other antiepileptic drugs. The population of our study has an average age of 58 and 61 years, respectively for patients taking or that have taken VPA for at least one year and for patients taking other antiepileptic drugs ( $p=0.036$ ).

No other statistically significant differences emerged in other demographic data and in the prevalence of various comorbidities. The percentages of known diagnosis of aortic stenosis were comparable between the two groups: in particular, 3.1% in patients treated with VPA versus 8.8% in those treated with other drugs ( $p=0.130$ ). Even with regards to the main cardiovascular risk factors (dyslipidemia, hypertension, diabetes, previous cardiovascular events), no statistically significant differences emerged between the two groups of patients. Similarly, in relation to data on death, no statistically significant differences were highlighted, in particular, 1% in patients treated with VPA and 2.7% in those treated with other antiepileptic drugs.

**Conclusions.** The results of this study currently do not confirm the calcifying action of VPA *in vivo*. However, data will need to be integrated prospectively with detailed diagnostic information on the presence or absence of calcific aortic stenosis and by increasing the sample size.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

La malattia calcifica della valvola aortica (CAVD) è la cardiopatia valvolare più comune nei paesi ad alto reddito e comprende uno spettro di malattie che va dalla sclerosi alla stenosi calcifica della valvola aortica (1). La sclerosi aortica, prima fase della malattia, è una condizione nella quale la formazione di noduli calcifici e l'ispessimento dei lembi valvolari sono processi relativamente lievi e gli individui sono asintomatici, mentre nella stenosi aortica le stesse condizioni portano ad una grave ostruzione del flusso sanguigno attraverso la valvola e gli individui diventano sintomatici.

La sclerosi aortica colpisce tra il 2,3 e il 51,7% degli individui più anziani con una prevalenza che aumenta drammaticamente con l'età. La stenosi aortica è invece osservata nell'1,7% degli individui di età pari o superiore a 65 anni per ritrovarla nel 12,4% degli individui di età superiore a 75 anni.

Forti evidenze implicano l'età avanzata, il sesso maschile, il fumo di sigaretta, l'ipertensione, la dislipidemia, l'obesità e l'insufficienza renale come fattori di rischio per la malattia calcifica della valvola aortica. Prove emergenti suggeriscono che la storia familiare e la lipoproteina (a) siano ulteriori fattori di rischio.

L'età è un importante fattore di rischio per CAVD e a riprova di questo è stato evidenziato come il rischio di sviluppare la malattia raddoppia ogni 10 anni tra i partecipanti al Cardiovascular Health Study (CHS), dopo aver aggiustato i fattori di rischio, e come nello studio multietnico sull'aterosclerosi (MESA), il rischio di avere calcio nella valvola aortica (AVC) è più che raddoppiato ogni decennio. Il sesso maschile è associato ad un rischio maggiore di AVC e stenosi aortica; il 56% in più rispetto al sesso femminile secondo il Framingham Offspring Study (FOS).

Il fumo è stato fortemente associato ad un aumento del rischio di CAVD. Nel FOS un maggior consumo di sigarette è stato associato a probabilità elevate di AVC e nel MESA i fumatori attuali hanno un rischio più che raddoppiato di AVC rispetto ai non fumatori, indipendentemente da altri fattori clinici, sebbene il fumo non fosse associato alla progressione della calcificazione.



Numerosi studi hanno dimostrato un'associazione tra l'ipertensione e CAVD. Nell'Helsinki Ageing Study l'ipertensione era associata all'AVC indipendentemente dagli effetti dell'età e del BMI. All'interno del MESA, è stata osservata una correlazione graduale tra gli stadi di ipertensione e AVC, in particolare, la calcificazione è stata osservata nel 6% dei soggetti normotesi, nell'11% dei soggetti ipertesi borderline, nel 17% dei soggetti con ipertensione di stadio I e il 16% dei soggetti con ipertensione di stadio II. L'ipertensione è stata anche associata ad una progressione più rapida della CAVD, infatti, la velocità di picco del getto aortico, una misura della progressione della stenosi aortica, aumenta più rapidamente nei soggetti ipertesi rispetto ai soggetti normotesi. Nel MESA, un confronto tra le misurazioni della pressione arteriosa e la loro associazione con l'AVC ha dimostrato che l'effetto maggiore è stato osservato per la pressione di polso. Quest'ultima è una misura della rigidità arteriosa e della riflessione delle onde, suggerendo che un'emodinamica anormale può favorire la calcificazione. Coerentemente con questa ipotesi, si è potuto osservare che l'aumento della riflessione delle onde porta ad un maggiore stress di trazione sulle cuspidi della valvola aortica. L'esposizione delle cellule interstiziali della valvola aortica a tale stress avvia il rimodellamento della matrice extracellulare, il quale precede l'ispessimento e la calcificazione della valvola aortica.

Per quanto concerne la dislipidemia, non è ancora chiaro se il colesterolo LDL-C sia un fattore di rischio per CAVD a fronte dei risultati apparentemente discrepanti tra gli studi osservazionali e gli studi randomizzati controllati. Uno studio immunoistologico ha evidenziato che l'apolipoproteina B, l'apolipoproteina (a) e il calcio si ritrovavano contemporaneamente nelle lesioni delle valvole stenotiche, ma si è osservato che le apolipoproteine B e (a) non si riscontravano nelle valvole normali. Inoltre, secondo il Cardiovascular Health Study (CHS) elevati livelli di LDL-C erano associati a maggiore probabilità di sviluppare sclerosi o stenosi aortica. Basandosi su queste evidenze, tre studi randomizzati e controllati hanno valutato l'utilizzo di terapie ipolipemizzanti con l'intento di rallentare o invertire la progressione della stenosi aortica, non ottenendo alcun risultato. Tuttavia, sebbene i risultati di questi studi siano stati deludenti, sarebbe prematuro ignorare il potenziale terapeutico delle statine per la CAVD e perciò sono necessari ulteriori studi.

L'obesità rappresenta un fattore di rischio per CAVD. Nel MESA, la sindrome metabolica e il diabete aumentavano separatamente le probabilità di sviluppare AVC, ma nessuno dei due era associato ad un peggioramento del quadro clinico tra i partecipanti dello studio che presentavano calcificazione fin dall'inizio. Individui sovrappeso o obesi hanno quindi un rischio aumentato di sviluppare stenosi aortica rispetto agli individui normopeso, però sono necessari ulteriori studi per identificare i possibili meccanismi alla base di questa correlazione.

La CAVD è, inoltre, comunemente osservata tra i pazienti con insufficienza renale, con AVC riportata nel 28% dei soggetti di età pari o inferiore ai 70 anni con malattia renale allo stadio terminale. La disfunzione renale è stata anche collegata ad una progressione più rapida e più grave della malattia; si è visto che i pazienti con stenosi aortica sottoposti a dialisi progrediscono più rapidamente.

In merito ai fattori di rischio emergenti, recentemente, alcuni studi hanno suggerito che la stenosi aortica abbia una componente familiare; in particolare, si è osservato che la storia familiare si associa ad un rischio di sviluppare la CAVD tre volte maggiore rispetto alla popolazione generale.

Infine, secondo un insieme di prove in rapida crescita, la lipoproteina (a) viene indicata come un importante agente causale della CAVD. Uno studio di associazione sull'intero genoma (GWAS) ha identificato una variante nel locus LPA e, successivamente, l'associazione di questa variante con la stenosi aortica è stata ampiamente dimostrata in un certo numero di coorti. Il gene LPA codifica per l'apolipoproteina (a) e più del 90% delle variazioni dei livelli di lipoproteina (a) sono state attribuite alla variazione genetica di LPA. Negli anni successivi alla scoperta della LPA sono state identificate altre mutazioni a carico dei geni PALMD e TEX41. Entrambe le varianti erano anche associate a valvole aortiche bicuspidi e a difetti del setto interatriale, implicando malformazioni cardiache congenite come meccanismo per CAVD (2).

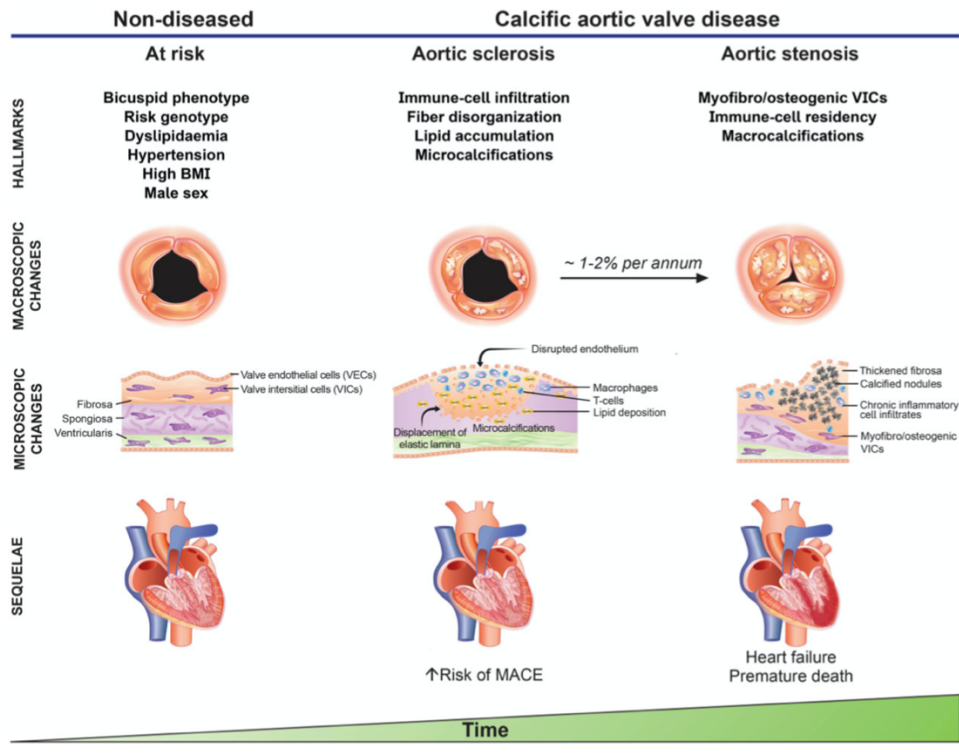


Figura 1. Fattori di rischio, cambiamenti strutturali e conseguenze della malattia calcifica della valvola aortica nei diversi stadi della malattia

## 1.2 Anatomia e istologia della valvola aortica

La funzione di raccogliere ed espellere il sangue è resa possibile dalla strutturazione del cuore in quattro cavità, due a destra e due a sinistra, gli atri e i ventricoli; questi ultimi sono posti sotto agli atri. Dopo la nascita ogni atrio comunica solamente con il ventricolo sottostante attraverso un orifizio controllato da una valvola, la quale assicura che il flusso sia solo anterogrado. Delle quattro valvole cardiache, due sono poste tra le cavità atriali e quelle ventricolari, in particolare la tricuspide a destra e la mitrale a sinistra, e due si trovano tra i ventricoli e i grandi vasi che da questi hanno origine, l'arteria polmonare a destra con la rispettiva valvola polmonare e l'aorta a sinistra con la valvola aortica. Le valvole, oltre a rendere possibile il passaggio unidirezionale anterogrado del sangue, danno il carattere ritmico al flusso ematico grazie ai loro movimenti alterni di apertura e chiusura (3).

La valvola aortica è tipicamente composta da tre lembi che prendono il nome in base alla loro posizione rispetto all'arteria coronaria, specificatamente i lembi coronarico sinistro, coronarico destro e non coronarico (4). Esiste una variante congenita della valvola aortica, costituita da due cuspidi anziché tre,

denominata per l'appunto valvola aortica bicuspidale. La prevalenza va dal 0.5 al 2% e questi pazienti sviluppano precocemente una stenosi valvolare aortica (AVS) grave, a differenza degli individui con valvola aortica tricuspide, e mostrano una calcificazione pronunciata a causa di una maggiore meccanica di tensione sulle cuspidi valvolari (5).

I lembi valvolari sono strutture che consentono alla valvola di aprirsi consentendo al sangue di fluire dal ventricolo sinistro all'intero corpo e consentono allo stesso tempo la chiusura con una forza sufficiente a prevenire il reflusso sanguigno dal circolo sistemico al cuore. Ciascun lembo vascolare può essere diviso in 3 strati distinti: il primo è lo strato esterno rivolto verso l'aorta definito lamina fibrosa (6). Essa rappresenta la principale struttura portante ed è ricca di fibrille di collagene di tipo I e III orientate in maniera circonferenziale (4). La lamina fibrosa svolge un ruolo di supporto strutturale primario ed è utile nel promuovere la coaptazione dei lembi valvolari, soprattutto durante la fase diastolica del cuore. Il secondo strato è lo strato esterno rivolto verso il ventricolo sinistro chiamato lamina ventricolare, nella quale predominano le fibre elastiche orientate radialmente. Pertanto, la lamina ventricolare promuove il movimento della valvola e aiuta a mantenere la forma dei lembi valvolari. Il terzo strato, la lamina spongiosa, si trova tra i due strati precedenti ed è ricco di glicosaminoglicani (GAG). Questo strato può assorbire parte dello stress meccanico, ridurre l'attrito e contemporaneamente promuovere il riarrangiamento delle fibre di collagene e di elastina durante il ciclo cardiaco (6).

I lembi sono ricoperti da uno strato endoteliale, il quale è composto da cellule endoteliali valvolari (VEC) su entrambi i lati. Le VEC si trovano a contatto con il sangue costituendo una barriera che regola la permeabilità della valvola, l'adesione delle cellule infiammatorie e la segnalazione paracrina. Nell'interstizio della valvola la popolazione cellulare principale riscontrata è composta da cellule interstiziali valvolari (VIC), le quali sono fondamentali nel rimodellamento valvolare e, inoltre, regolano sia la sintesi che la degradazione dei componenti della matrice extracellulare. Fisiologicamente, le VIC si trovano in uno stato di quiescenza e hanno caratteristiche simili ai fibroblasti. La stimolazione di VEC e VIC mediante trigger molecolari e meccanici tra cui una pressione sanguigna elevata, un alterato shear stress, citochine e fattori di crescita, contribuisce alla fisiopatologia della CAVD, alterando l'ambiente valvolare locale e rendendolo soggetto a calcificazione (7).

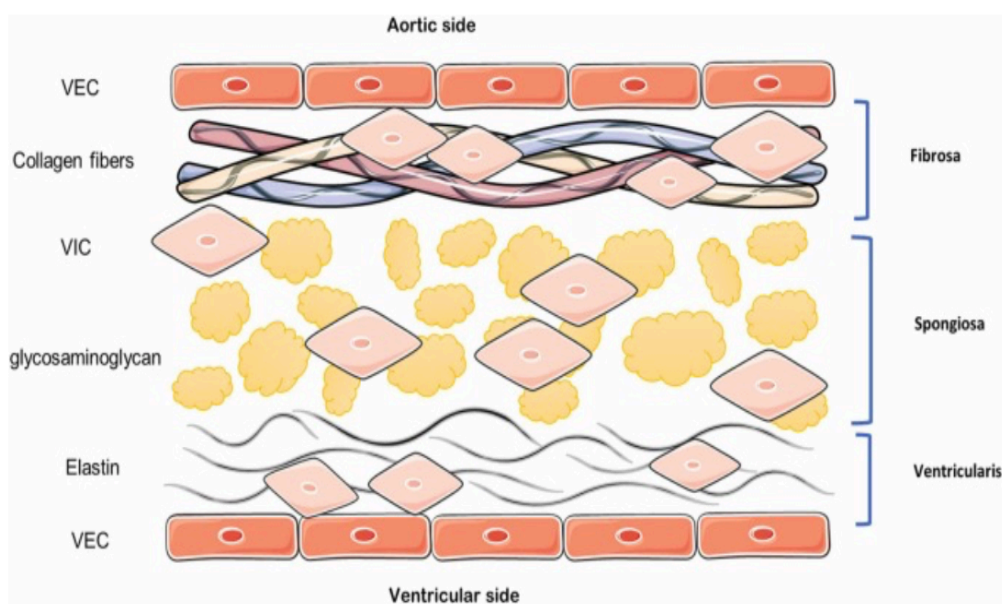


Figura 2. Struttura della valvola aortica

### 1.3 Patogenesi della calcificazione valvolare

L'inizio e la progressione della malattia calcifica della valvola aortica possono essere visti come due fasi distinte, caratterizzate da differenti risposte immunologiche, metaboliche, fisico-meccaniche e cellulari che portano allo stadio finale rappresentato dalla calcificazione. Nella prima fase di inizio avviene la deposizione dei lipidi accompagnata dallo sviluppo di lesioni e infiammazione. Nella seconda fase, definita di propagazione, la

differenziazione osteogenica e la calcificazione sono responsabili della progressione della malattia.

### **1.3.1 Fase iniziale**

#### **1.3.1.1 Disfunzione endoteliale**

L'integrità dello strato endoteliale è un importante fattore nel contesto dell'omeostasi valvolare.

Lo shear stress può indurre una disfunzione endoteliale dello strato VEC che porta, a sua volta, alla deposizione di lipoproteine e all'infiltrazione di cellule immunitarie. Durante l'embriogenesi e la formazione delle valvole si vengono a sviluppare dei cuscinetti cardiaci che altro non sono che un'espansione locale della matrice extracellulare. Questi cuscinetti sono invasi dalle cellule endoteliali endocardiche, le quali possono differenziarsi in cellule progenitrici mesenchimali, uno dei precursori delle VIC, in un processo chiamato transizione endotelio-mesenchimale (EndMT).

Il signalling di Notch aumenta i livelli di TGF- $\beta$  in queste cellule, il quale a sua volta attiva i fattori di trascrizione Zinc finger SNAI 1 e 2 con conseguente diminuzione della VE-caderina. Questo si traduce in un indebolimento della barriera endoteliale a causa della perdita delle giunzioni aderenti. Si ritiene che l'EndMT avvenga anche durante la CAVD negli adulti.

Inoltre, è stato possibile dimostrare in campioni di valvola aortica suina che le cellule endoteliali della lamina fibrosa e ventricolare della valvola hanno fenotipi diversi. Infine, è stata osservata anche una differenza nell'espressione di eNOS nei campioni calcifici rispetto a quelli non calcifici di valvole aortiche umane: il livello di espressione era complessivamente ridotto nelle valvole calcifiche, con un'espressione più elevata riscontrata sul lato ventricolare. Questo potrebbe essere uno dei motivi per cui si osserva frequentemente una calcificazione più pronunciata sul lato aortico delle cuspidi. Pertanto, l'eterogeneità delle cellule endoteliali potrebbe svolgere un ruolo importante nell'inizio della malattia.

### **1.3.1.2 Deposizione lipidica**

Esistono prove sul fatto che la deposizione di lipoproteine induce fortemente l'infiammazione cronica, la quale rappresenta un segno distintivo delle fasi iniziali della CAVD, e può essere evidenziata molto tempo prima che si sviluppi la calcificazione mediante FDG-PET/CT. Diverse apolipoproteine come apoB, apoA1 e apo (a), così come la disregolazione della pathway di eNOS e gli aumentati livelli di NADPH ossidasi, sono stati identificati nelle valvole aortiche umane espianate. Ancora, si è visto che la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) può agire come stimolo alla calcificazione. Questo aumento dello stress ossidativo promuove anche la formazione di lipoproteine ossidate a bassa densità (ox-LDL) e fosfolipidi ossidati, che innescano la calcificazione nelle cellule vascolari. I fosfolipidi ossidati possono essere trasformati in lisofosfatidilcolina dalla lipoproteina-fosfolipasi A2 (Lp-PLA2) portando le VIC ad apoptosi; i livelli di Lp-PLA2 sono più elevati nel tessuto della valvola aortica stenotica. Le ox-LDL, invece, inducono una sovraregolazione delle molecole di adesione cellulare tra cui ICAM-1 e VCAM-1 e, di conseguenza, si verifica una maggiore adesione e un maggior stravasamento di cellule immunitarie.

### **1.3.1.3 Infiammazione**

I lipidi ossidati innescano anche una risposta infiammatoria nel tessuto valvolare. In seguito all'assorbimento dei lipidi ossidati vengono attivati i macrofagi locali, i linfociti T CD4+ e CD8+ e i mastociti. Ciò è in parte dovuto all'attivazione dei Pattern Recognition Receptors (PRR) e della via NF- $\kappa$ B. I monociti e i macrofagi stimolano la differenziazione osteogenica delle VIC così come la calcificazione attraverso la secrezione di TNF, seguita dall'attivazione di NF- $\kappa$ B e IL-1  $\beta$  e IL-6, probabilmente a causa di un'induzione delle proteine MSX2 e DR4.

È stato recentemente dimostrato che un altro PRR, in particolare CLEC4E, è altamente espresso nel tessuto della valvola aortica stenotica umana. Questo recettore si trova sui monociti e macrofagi e può riconoscere i detriti cellulari e i cristalli di colesterolo, promuoverne l'incorporazione, la degradazione intracellulare e la conseguente infiammazione vascolare e aterogenesi.

La morte cellulare localizzata, come conseguenza della disfunzione endoteliale e dell'inflammatione, determina il rilascio di corpi apoptotici che causano microcalcificazione, la quale è ulteriormente promossa dal rilascio di vescicole extracellulari da parte dei macrofagi e delle VIC. Questo processo mostra delle somiglianze con il processo di formazione ossea, nel quale vengono eliminate le vescicole extracellulari ricche di calcio e fosfato inorganico. Questi complessi calcio-fosfato all'interno delle vescicole possono formare dei cristalli di idrossiapatite che crescono di dimensioni e alla fine distruggono le vescicole. I cristalli entrano in contatto con la matrice extracellulare, dove agiscono come siti di nucleazione per un'ulteriore macrocalcificazione. Quest'ultima innesca una risposta immunitaria ancora più pronunciata, creando un circolo vizioso e portando alla fase di propagazione della malattia (5).

### **1.3.2 Fase di propagazione**

#### **1.3.2.1 Differenziazione miofibroblastica e osteoblastica**

A seguito dell'iniziale fase infiammatoria, nella quale la deposizione di lipidi e l'inflammatione cronica determinano l'inizio della CAVD, il volto della malattia cambia e la calcificazione diventa la forza trainante. La differenziazione delle VIC in fenotipi miofibroblastici e osteoblastici è considerata un passaggio fondamentale durante la fase di propagazione. L'inizio di questa differenziazione sembra essere regolato da citochine secrete dalle cellule immunitarie; tuttavia, durante la progressione della malattia, gli stimoli calcifici diventano sempre più indipendenti dalle cellule immunitarie e il processo di calcificazione è regolato da una serie di vie calcifiche. Grazie ad uno studio del laboratorio di Aikawa, le analisi proteomiche hanno confermato una differente espressione delle proteine nei tre strati delle cuspidi della valvola aortica. Le VIC avevano un maggior potenziale di calcificazione sul lato fibroso della valvola, probabilmente a causa dell'attivazione di vie patogene, come la biosintesi e la modificazione del collagene, la degradazione della matrice extracellulare, il metabolismo dei GAG e dei lipidi. Questi risultati dimostrano una grande eterogeneità spaziotemporale all'interno del tessuto valvolare che contribuisce alle differenze regionali nei modelli di calcificazione e dimostra la grande plasticità di questo tipo di cellula.



La differenziazione miofibroblastica può essere ottenuta in vitro stimolando le VIC con TGF- $\beta$ 1 e può essere inibita da FGF (fattore di crescita dei fibroblasti). Quello che si ottiene dalla stimolazione è una maggiore espressione di  $\alpha$ -SMA, vimentina e miosina del muscolo liscio. Il TGF- $\beta$ 1 può agire sia attraverso l'attivazione della via canonica MAPK tramite le SMAD, sia attraverso l'attivazione della via non canonica di p38; questo porta rispettivamente ad un aumento del legame delle LDL ai GAG e alla formazione di noduli, nonché ad un aumento dell'attività di ALP. Un ulteriore effetto della stimolazione con TGF- $\beta$ 1 è una maggiore espressione della caderina-11 (CDH11) che si lega alla  $\alpha$ -SMA con conseguente formazione di noduli. CDH11 partecipa alla differenziazione da mesenchimale a osteocondrale ed è risultata over-espressa nel 91% delle cellule miofibroblastiche e nel 96% delle cellule osteoblastiche. Il risultato è un aumento dell'attività di ALP e dell'espressione di marcatori degli osteoblasti, come RUNX2 e BMP-2.

La calcificazione del tessuto valvolare può verificarsi, nel 13% dei casi, come risultato della differenziazione osteoblastica delle VIC con formazione di strutture simil-ossee, ma la maggior parte della deposizione minerale, ovvero il restante 83%, viene acquisita tramite calcificazione distrofica, che si ipotizza essere il risultato della precipitazione diffusa di calcio sui detriti cellulari a seguito dell'apoptosi delle VIC (5).

#### **1.4 Meccanismi molecolari implicati nel processo di calcificazione**

Nella fase iniziale della CAVD, la differenziazione osteoblastica sembra essere coordinata dall'infiltrazione dei macrofagi. Durante le fasi successive della malattia assumono maggiore importanza altri percorsi, tra cui le vie di segnalazione RANK/RANKL/OPG, Wnt/ $\beta$ -catenina e Notch (5). La via di segnalazione Notch è una via correlata alla calcificazione scoperta di recente. L'NO è stato identificato come un inibitore della calcificazione e svolge la sua funzione attraverso l'attivazione della via di segnalazione di Notch (8). Notch1 ha guadagnato interesse quando sono state identificate due famiglie con mutazioni frame-shift in Notch1 con conseguente codone di stop prematuro. In queste famiglie è stato osservato un alto tasso di valvola aortica bicuspidale e grave calcificazione della valvola aortica. Ulteriori studi hanno dimostrato che

Notch 1 funzionale reprime l'espressione di BMP-2 e l'attività trascrizionale di RUNX2, proteggendo così le VIC dalla differenziazione e calcificazione osteoblastica.

Wnt/  $\beta$ -catenina è un'altra via di segnalazione strettamente correlata alla calcificazione valvolare aortica e sembra essere un regolatore positivo della differenziazione osteoblastica, in cui il legame di Wnt a LRP5 (proteina 5 correlata al recettore LDL) porta all'attivazione della via canonica Wnt/  $\beta$ -catenina (5,8). La deposizione di calcio porta all'irrigidimento delle cuspidi, con conseguente aumento dello sforzo meccanico, e induce ulteriormente l'attivazione della via Wnt/  $\beta$ -catenina, per arrivare infine a una differenziazione ancora più osteoblastica delle VIC attraverso l'espressione di ENPP1. Questo enzima agisce idrolizzando l'ATP con conseguente liberazione di gruppi fosfato che promuovono la calcificazione. Un polimorfismo a singolo nucleotide nell'introne 9 di ENPP1 è stato associato a CAVD e nelle valvole stenotiche sono stati rilevati livelli di espressione più elevati di ENPP1. Inoltre, la perdita di ATP extracellulare, dovuta alla upregolazione di ENPP1, porta ad un'umentata apoptosi delle VIC, poiché l'ATP agisce come un segnale di sopravvivenza legandosi ai recettori P2Y2 presenti sulle VIC, e ad un aumento dei livelli di IL-6 che promuovono l'espressione di BMP-2 e tutto questo porta a maggiore calcificazione delle VIC.

Un altro percorso coinvolto nella calcificazione cardiovascolare è mediato dalla fetuina-A e dall'MGP (matrix- $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein). L'MGP viene attivata dalla carbossilazione e dalla fosforilazione in modo vitamina K-dipendente e bassi livelli di vitamina K comportano una carbossilazione inefficiente di MGP e quindi a una maggiore calcificazione vascolare; esistono prove che i pazienti che assumono antagonisti della vitamina K, oltre a presentare una maggiore calcificazione, presentano tassi più elevati di degenerazione della valvola aortica. È stato riscontrato, inoltre, che l'assunzione di menachinone (vitamina K2) con la dieta riduce la calcificazione vascolare e la mortalità. Gli effetti della supplementazione di vitamina K sono attualmente oggetto di studio in numerosi studi clinici (5).

### **1.5 Stenosi valvolare aortica: fisiopatologia e clinica**

La malattia calcifica della valvola aortica è caratterizzata da un lento e progressivo rimodellamento fibro-calcifico dei lembi valvolari. Nella prima fase della malattia, la sclerosi aortica, la valvola si ispessisce e diventa leggermente calcificata, ma questi cambiamenti non causano alcuna ostruzione al flusso sanguigno. Nel corso degli anni, la malattia evolve in una grave calcificazione valvolare con alterazione del movimento dei lembi e importante ostruzione del flusso ematico, i quali sono i segni distintivi della stenosi aortica calcifica (4). L'orifizio aortico ha nell'adulto un'area normale di 3-4 cm<sup>2</sup>. Una sua riduzione del 50% genera resistenza all'eiezione ventricolare sinistra, conseguente aumento della pressione intraventricolare sinistra con sviluppo di un gradiente pressorio tra ventricolo sinistro e aorta, la cui entità dipende dal grado di stenosi. La stenosi aortica dell'adulto si sviluppa gradualmente, cosicchè il ventricolo sinistro abbia il tempo di adattarsi al sovraccarico pressorio cronico mediante ipertrofia concentrica, la quale è caratterizzata dall'aumento dello spessore di parete. Il risultato è l'aumento della massa muscolare miocardica senza dilatazione della cavità ventricolare sinistra. Per effetto di questa ipertrofia concentrica, ciascuna miofibrilla è sottoposta in sistole alla stessa tensione di un cuore normale, in modo tale che il postcarico rimanga normale nonostante il sovraccarico pressorio. Naturalmente, un tale modello contrattile implica un dispendio energetico notevole; l'ipertrofia, infatti, comporta un marcato aumento del fabbisogno di ossigeno delle fibre muscolari cardiache. Lo squilibrio tra l'aumento della domanda miocardica di ossigeno e la sua ridotta fornitura al miocardio stesso risulta, nei pazienti con stenosi aortica, in ischemia miocardica con possibili manifestazioni cliniche transitorie come angina, aritmie parossistiche, episodi sincopali o morte improvvisa. Invece, un prolungato cronico squilibrio può produrre fibrosi miocardica focale con compromissione della funzione diastolica o sistolica e insufficienza del ventricolo sinistro. Per molti anni, comunque, il compenso offerto dall'ipertrofia concentrica è perfetto e la contrattilità risulta normale o maggiore del normale e il paziente è asintomatico. Nei pazienti con stenosi aortica si verifica anche una riduzione della frazione di eiezione (FE), che ha fondamentalmente due cause: l'eccesso di postcarico e la disfunzione contrattile

miocardica. La prima condizione indica che l'ipertrofia è inadeguata a normalizzare lo stress parietale, ma è integra la capacità del miocardio di generare forza; rimosso l'ostacolo valvolare aortico con la sostituzione chirurgica della valvola, il postcarico si riduce sensibilmente e migliora la performance ventricolare. Il trattamento chirurgico è invece meno efficace nei pazienti con FE ridotta per intrinseca depressione della contrattilità miocardica e questi pazienti, caratterizzati da bassa portata cardiaca e lieve gradiente aortico, hanno generalmente una cattiva prognosi. Nella stenosi aortica, come già accennato, lo sviluppo di ipertrofia concentrica spesso comporta un'altra conseguenza, ossia la disfunzione diastolica, per via di un limite al riempimento ventricolare, sia per la compromissione del rilasciamento miocardico sia per l'aumento della rigidità diastolica. Nella condizione di ridotta compliance diastolica ventricolare, l'atrio sinistro svolge un ruolo fondamentale nel mantenere la funzione cardiaca attraverso il contributo essenziale della sistole atriale, che sviluppando una pressione più elevata, assume il maggiore carico del riempimento ventricolare, per cui la quota di sangue trasferita dall'atrio al ventricolo sinistro passa dal 25% fino a quasi il 40%.

Dal punto di vista clinico, la stenosi aortica può restare per molti anni asintomatica e può essere individuata occasionalmente, ad esempio, per la scoperta di un soffio cardiaco di eiezione o per la registrazione di un ECG anormale. La fase sintomatica compare in genere solo tardivamente ed è caratterizzata dalla classica triade: dispnea, angina e sincope (3,9).

## **1.6 Diagnosi e trattamento**

### **1.6.1 Diagnosi**

All'esame obiettivo è possibile riscontrare: un polso arterioso piccolo e rallentato, espressione di ridotta ampiezza, dell'aumento del tempo di eiezione e del ritardo del picco di eiezione; un fremito sistolico, generalmente palpabile sul II spazio intercostale destro, talvolta sul manubrio sternale e perfino all'apice; e, all'auscultazione è possibile riscontrare un soffio sistolico con epicentro sull'area aortica (II spazio intercostale destro) con irradiazione verso i vasi del collo e, in casi gravi, la comparsa di un IV tono, poiché l'atrio deve spingere il sangue in un ventricolo poco distensibile per ridotta compliance.

Tra gli esami strumentali di ausilio per arrivare alla diagnosi di stenosi aortica calcifica riscontriamo l'elettrocardiogramma (ECG), il test da sforzo, l'ecocardiogramma e il cateterismo cardiaco.

L'ECG è normale nella stenosi aortica di grado lieve e nel 10-25% dei pazienti con stenosi aortica significativa, specialmente di sesso femminile e nell'anziano. Segni di ipertrofia ventricolare sinistra, associati a modificazioni secondarie del tratto ST e dell'onda T, di direzione opposta alla deflessione maggiore del complesso QRS, sono espressione semplice ed esatta di stenosi aortica con sovraccarico di pressione o sistolico.

Il test ergometrico può essere utile per valutare i pazienti con stenosi aortica moderata che si dicono asintomatici; mediante questo test si può quantificare un'anomala risposta allo sforzo per angina o dispnea o mancato incremento della pressione arteriosa (3).

L'ecocardiogramma transtoracico (TTE) è uno strumento diagnostico di estrema utilità nello studio della CAVD. È una tecnica non invasiva, sicura e ampiamente disponibile che consente la diagnosi precoce di alterazioni valvolari che si verificano come conseguenza della deposizione di calcio. La TTE non solo consente di valutare la morfologia della valvola, l'eziologia della stenosi e il grado di severità, ma fornisce anche informazioni aggiuntive su altri parametri importanti come la funzione ventricolare, la dimensione della cavità o la pressione a livello dell'arteria polmonare che può essere alterata in risposta al sovraccarico pressorio come conseguenza di un complesso processo di rimodellamento ventricolare. In riferimento a quanto detto, le attuali linee guida suggeriscono la necessità di pianificare un follow-up ecocardiografico per questi pazienti, fattore importante nel processo decisionale relativo alla sostituzione della valvola aortica. Dal punto di vista morfologico, l'entità e la gravità della calcificazione valvolare possono essere classificate come lievi (presenza di piccole aree iperecogene con scarso ombreggiamento acustico), moderate (presenza di aree ampie e multiple con densa ecogenicità) e gravi (esteso ispessimento con aumentata ecogenicità ed elevato ombreggiamento acustico). La velocità di picco, il gradiente di pressione transvalvolare medio e il diametro di efflusso del ventricolo sinistro (LVOT) sono misure che consentono di calcolare l'area valvolare aortica (AVA) applicando l'equazione di continuità, basata sul fatto che il LVOT dovrebbe essere uguale al volume

sistolico che passa attraverso la valvola stenotica. Di conseguenza, si ritiene che si tratti di sclerosi aortica quando la velocità di picco del getto aortico è  $\leq 2,5$  m/s e di stenosi aortica grave quando la velocità di picco è  $\geq 4$  m/s, il gradiente medio è  $\geq 40$  mmHg e l'AVA è  $< 1$  cm<sup>2</sup>.

**Table 1. Classification of Aortic Stenosis Severity**

Classification	Transaortic velocity (m per second)	Mean pressure gradient (mm Hg)	Aortic valve area (cm <sup>2</sup> )
Normal	< 2.0	< 10	3.0 to 4.0
Mild	2.0 to 2.9	10 to 19	1.5 to 2.9
Moderate	3.0 to 3.9	20 to 39	1.0 to 1.4
Severe	$\geq 4.0$	$\geq 40$	< 1.0

*Information from reference 20.*

*Figura 3. Classificazione della gravità della stenosi aortica*

Il calcolo dell'AVA mediante ecocardiogramma presenta alcune limitazioni. Oltre alla difficoltà di misurare accuratamente l'LVOT in alcuni casi, i gradienti di velocità e di pressione sono parametri che dipendono dal flusso, perciò alcune determinate situazioni emodinamiche potrebbero alternarne il valore. Un esempio sono i pazienti con basso flusso a livello della valvola che possono presentare stenosi aortica grave con AVA  $< 1$  cm<sup>2</sup>, ma con una velocità di picco e un gradiente medio di  $< 4$  m/s e  $< 40$  mmHg, rispettivamente. In questo caso esiste una discrepanza tra i parametri che definiscono la gravità e che potrebbe ostacolare il processo decisionale; questa circostanza obbliga ad integrare i risultati ecocardiografici con tutte le informazioni cliniche disponibili prima di stabilire l'indicazione all'intervento chirurgico (10).

Infine, il cateterismo cardiaco è la procedura diagnostica preoperatoria obbligatoria specialmente per lo studio della circolazione coronarica e pertanto essenziale per identificare i pazienti suscettibili di by-pass aortocoronarico al momento della sostituzione della valvola aortica. I parametri studiati sono le pressioni intracavitari cardiache, la portata cardiaca, il gradiente transvalvolare

aortico e l'area valvolare aortica, la funzione ventricolare sinistra, la pressione e le resistenze arteriolari polmonari (3).

### **1.6.2 Trattamento**

La sostituzione della valvola aortica è l'unico trattamento efficace per la stenosi aortica sintomatica ed emodinamicamente grave. La sostituzione chirurgica porta ad un miglioramento significativo della sopravvivenza, solitamente accompagnato da un miglioramento dei sintomi (9). La stenosi aortica grave sintomatica ha una prognosi infausta e l'intervento precoce è fortemente raccomandato in tutti i pazienti; le uniche eccezioni sono per coloro nei quali è improbabile che l'intervento migliori la qualità della vita o della sopravvivenza, a causa di gravi comorbidità, o per quelli con condizioni concomitanti associate ad una sopravvivenza inferiore all'anno, ad esempio in caso di tumori maligni. L'intervento è raccomandato nei pazienti sintomatici con stenosi aortica ad alto gradiente, indipendentemente dalla frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF). Tuttavia, la gestione dei pazienti con stenosi aortica a basso gradiente è più impegnativa; la funzione ventricolare sinistra solitamente migliora dopo l'intervento in pazienti con stenosi aortica a basso flusso e a basso gradiente, quando la frazione di eiezione (FE) ridotta è causata da un postcarico eccessivo. Al contrario, il miglioramento è incerto se la causa primaria della FE ridotta è la cicatrizzazione dovuta a un infarto miocardico o ad una cardiomiopatia. L'intervento è raccomandato quando la stenosi aortica grave è confermata dall'ecocardiogramma da stress (stenosi aortica grave vera), mentre i pazienti con stenosi aortica pseudo-grave dovrebbero ricevere un trattamento convenzionale per l'insufficienza cardiaca.

L'intervento è raccomandato nei pazienti asintomatici con stenosi aortica grave e compromissione della funzione ventricolare sinistra senza altra causa e in coloro che sono asintomatici durante le normali attività quotidiane ma sviluppano sintomi durante il test da sforzo. In assenza di caratteristiche prognostiche avverse, generalmente si raccomanda una vigile attesa con un intervento tempestivo qualora comparissero i sintomi. La gestione dei casi di stenosi aortica severa asintomatica rimane controversa ed è necessario valutare i rischi e i benefici nel singolo paziente (11).

L'impianto della valvola protesica può essere effettuato mediante un intervento cardiocirurgico (SAVR) oppure un intervento percutaneo transcateretere (TAVI).

Per molti decenni, la SAVR è stata, ed è tuttora, il gold standard per trattare efficacemente i pazienti con stenosi aortica; tuttavia, a circa il 30% dei pazienti non viene offerta la SAVR a causa del rischio chirurgico o delle variazioni anatomiche. La TAVI è emersa nell'ultimo decennio ed è diventata il pilastro del trattamento per pazienti inoperabili o ad alto rischio chirurgico (12). Questa tecnica consiste nell'inserire, tramite un accesso femorale o arterioso alternativo, un catetere che veicola la protesi all'interno della valvola aortica malata. In alcuni casi è necessario eseguire prima una valvuloplastica, ossia una dilatazione della valvola nativa stenotica mediante l'utilizzo di un palloncino per introdurre poi la protesi sostitutiva (13).

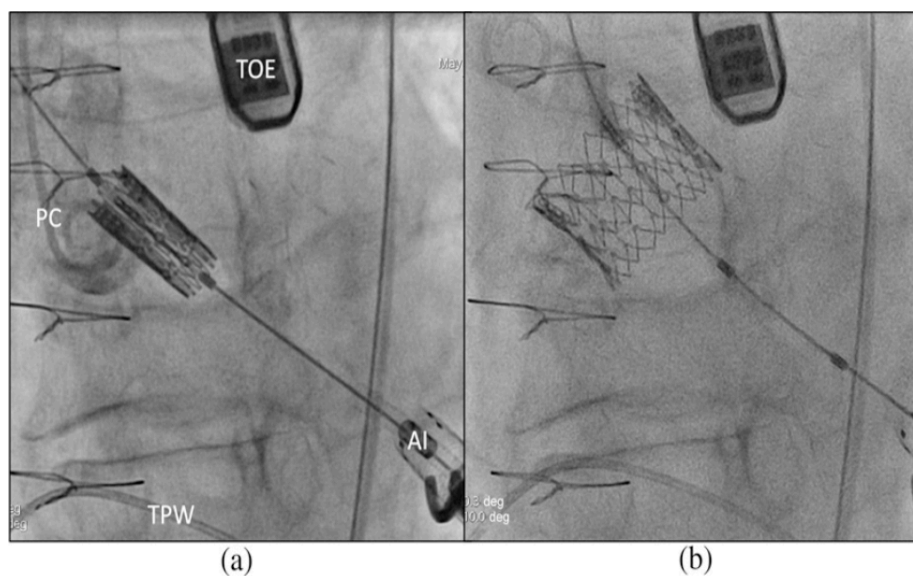


Figura 4. A) Filo guida con stent collassato. B) Protesi espansa in sede.

La SAVR prevede l'impiego di protesi valvolari meccaniche o biologiche. Le attuali protesi meccaniche sono costruite in carbonio pirolitico e risultano costituite da un anello di sostegno al quale vengono incernierati due emidischi. I sostituti valvolari biologici vengono suddivisi a seconda dell'origine del tessuto che li costituisce in autologhi, provenienti dallo stesso paziente, omologhi, provenienti da donatore della stessa specie, ed eterologhi, provenienti da altra specie. Le valvole possono essere montate su un supporto



semirigido (stent) che ne facilita l'impianto conservando la naturale geometria dei lembi valvolari. La presenza dello stent, tuttavia, sembra condizionare sfavorevolmente le performance emodinamiche e di durata delle bioprotesi; da un lato, lo stent riduce l'orifizio utile della valvola determinando la persistenza di un gradiente pressorio residuo transvalvolare; dall'altro lato, l'inserzione della valvola su un supporto artificiale amplifica lo stress meccanico del tessuto valvolare durante i movimenti di apertura e chiusura, riducendo così la durata della protesi. Nel tentativo di superare tali inconvenienti sono state sviluppate nuove generazioni di bioprotesi senza stent, definite per questo *stentless*; le caratteristiche emodinamiche delle bioprotesi *stentless* si avvicinano a quelle della valvola aortica naturale. Le protesi meccaniche si differenziano favorevolmente dalle protesi biologiche per la maggiore durata; tuttavia, queste protesi presentano caratteristiche sfavorevoli in termini di trombogenicità e pertanto necessitano di una terapia anticoagulante cronica, al contrario delle protesi biologiche (3).

### **1.7 Acetiltransferasi e deacetilasi istoniche**

Nelle cellule eucariotiche le molecole di DNA che costituiscono i cromosomi sono strettamente associate a proteine, costituendo il complesso nucleoproteico chiamato cromatina. Tra queste proteine troviamo gli istoni, proteine basiche che rappresentano i veri costituenti strutturali della cromatina. Quest'ultima presenta una struttura ripetitiva e appare come una collana costituita da grani impilati su un filo, dove i grani rappresentano i nucleosomi, le unità elementari della struttura della cromatina. Il nucleosoma è costituito da un tratto di DNA di circa 200 pb associato con un ottamero di proteine istoniche, che consiste di due copie di ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3 e H4, e che rappresenta il core del nucleosoma. Quest'ultimo è inoltre associato esternamente ad una molecola dell'istone H1. Le proteine istoniche presentano una struttura conservata costituita da tre regioni ad  $\alpha$ -elica e da una coda N-terminale. Le code N-terminali sono regioni bersaglio di una serie di modificazioni chimiche, principalmente acetilazione e metilazione di lisine e fosforilazione di serine, che cambiano la carica netta della molecola proteica riducendone la basicità. Tali modificazioni sono svolte da dei complessi proteici con attività enzimatica, tra

cui l'istone acetiltransferasi (HAT) e l'istone deacetilasi (HDAC), che, diminuendo il carattere basico degli istoni, rendono in genere meno stabile l'interazione tra l'ottamero istonico e il DNA carico negativamente, favorendo lo spostamento del nucleosoma stesso. L'acetilazione degli istoni avviene sui gruppi amminici e dei residui di lisina evolutivamente conservati situati a livello delle code N-terminali. Questa modifica epigenetica neutralizza la carica positiva della lisina e in questo modo viene meno l'interazione con il DNA, carico negativamente, favorendo la trascrizione (14). L'acetilazione degli istoni centrali deriva dall'equilibrio tra le attività opposte dell'istone acetiltransferasi e dell'istone deacetilasi; la prima lega gruppi acetile ai residui amminoacidici, in particolare alla lisina, la seconda viceversa rimuove i gruppi acetile. Di conseguenza, l'iperacetilazione è associata ad un aumento dell'attività trascrizionale, al contrario l'ipoacetilazione è associata alla repressione dell'espressione genica (14,15).

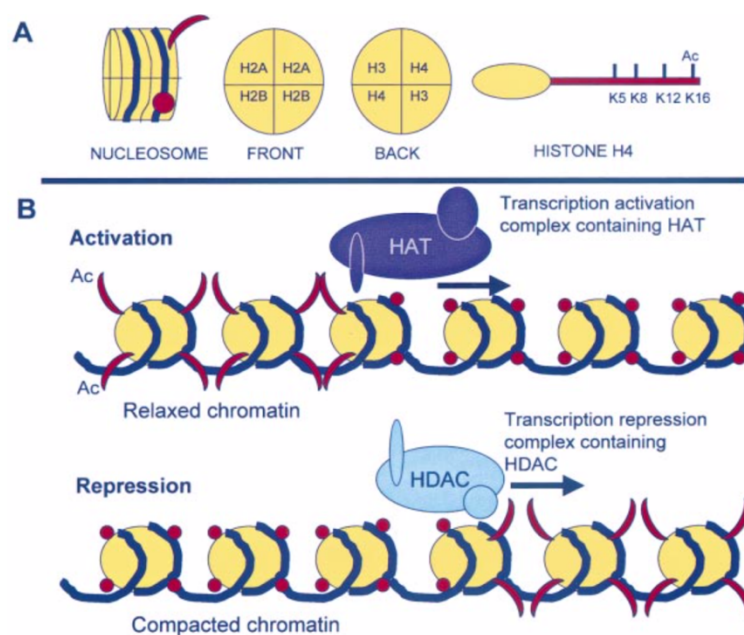


Figura 5. A) Rappresentazione schematica di un nucleosoma. B) Attivazione e repressione trascrizionale nella cromatina.

Le acetiltransferasi possono essere classificate in due tipi a seconda della loro localizzazione; il tipo A si localizza a livello nucleare, mentre il tipo B a livello citoplasmatico. Le HAT di tipo A regolano principalmente la trascrizione dei geni e sono divisi in 5 sottogruppi: MYST, GANT, p300/CBP, famiglia dei co-attivatori dei recettori nucleari e fattori di trascrizione basale (16). La più

studiata è p300, la quale è fondamentale per la regolazione di geni specifici degli osteoblasti, come il co-regolatore del fattore chiave osteogenico RUNX2 (17). Legando RUNX2 avviene un aumento di osteocalcina che induce osteogenesi negli osteoblasti (16).

La famiglia HDAC, invece, comprende 18 membri classificati in: classe I (HDAC 1, 2, 3, 8), IIa (HDAC 4, 5, 7, 9), IIb (HDAC 6, 10), III (SIRT) e IV (HDAC 11) (18).

Gli inibitori delle HDAC possono essere suddivisi in 4 classi in base alla loro struttura chimica: acidi grassi a catena corta (come l'acido valproico), derivati dell'acido idrossamico (come la tricostatina-A e il vorinostat), benzamidi e peptidi ciclici. La classe più studiata è quella degli inibitori dell'idrossamato (19).

In alcuni studi è stato ipotizzato che gli inibitori delle HDAC possano avere una funzione benefica per alleviare la calcificazione vascolare. Quello che però si è scoperto, eseguendo uno studio preliminare con l'uso di inibitori di HDAC, è che in realtà questi ultimi potenziano la calcificazione vascolare. È stato osservato che il trattamento con tricostatina A non ha influenzato il contenuto di calcio nelle cellule muscolari lisce valvolari (VSMC) in coltura; tuttavia, la tricostatina A ha potenziato la calcificazione vascolare indotta dal fosfato inorganico nelle VSMC o dalla vitamina D3 nei topi. Si è quindi scoperto che la perdita dell'attività di HDAC1 provoca un importante aumento della calcificazione vascolare. Andando a esaminare ulteriormente i livelli di espressione degli HDAC di classe I è stato evidenziato che la calcificazione vascolare riduce il livello di espressione di HDAC1 a causa dell'attivazione della via di degradazione delle proteine mediante poliubiquitinazione (20). In conclusione, alcuni inibitori delle HDAC, come la tricostatina A o il vorinostat, peggiorano la calcificazione valvolare; altri inibitori, come l'acido valproico (VPA), invece hanno dimostrato un possibile effetto terapeutico (16).

### **1.8 Acido valproico**

L'acido valproico (VPA) è un acido grasso ramificato a catena corta derivato dall'acido valerico presente in natura. Il VPA è utilizzato principalmente nel

trattamento dell'epilessia, ma è usato anche nell'emicrania, nei disturbi bipolare, dell'umore, nell'ansia e in altri disturbi psichiatrici.

### 1.8.1 Farmacocinetica

Il VPA si lega fortemente alle proteine con conseguente bassa clearance. Esistono almeno tre vie del metabolismo del VPA negli esseri umani: la glucuronidazione, la  $\beta$ -ossidazione nei mitocondri e l'ossidazione mediata dal citocromo P450. Le prime due sono considerate le vie principali e rappresentano rispettivamente il 50% e il 40% della dose, mentre l'ultima è considerata una via minore e rappresenta circa il 10% della dose. Il valproato glucuronide è il principale metabolita urinario del VPA e la glucuronidazione avviene da parte di UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7 e UGT2B15 (21). La biodisponibilità del sodio valproato è prossima al 100% dopo somministrazione orale o endovenosa (22). L'acido valproico è disponibile in forma acida e in forma salina con rivestimento enterico (divalproex sodico): quest'ultimo fornisce un rilascio e un assorbimento ritardati dall'intestino, ma l'entità dell'assorbimento da parte delle due formulazioni è equivalente (23).

Il volume di distribuzione si limita soprattutto al sangue e al liquido extracellulare di rapido scambio. La concentrazione di acido valproico nel liquido cerebrospinale è vicina alla concentrazione plasmatica libera. È da ricordare che il valproato attraversa la barriera placentare; diversi studi hanno valutato la concentrazione di VPA nel cordone ombelicale dei neonati al momento del parto e si è visto che la concentrazione sierica di VPA nel cordone ombelicale era simile o leggermente superiore a quella delle madri. Somministrato durante l'allattamento, il valproato viene escreto nel latte materno a concentrazioni molto basse. Per quanto concerne l'eliminazione, come già accennato, il legame proteico del VPA è molto elevato, dose dipendente e saturabile. La molecola di valproato può essere dializzata, ma viene escreta solo la forma libera (circa il 10%). Diversamente dalla maggior parte degli altri antiepilettici, il sodio valproato non accelera la propria degradazione, né quella di altri agenti come gli estroprogestinici. L'emivita è di circa 8-20 ore, anche se nei bambini generalmente è più breve (22).

### 1.8.2 Farmacodinamica

Il VPA mostra i suoi effetti farmacodinamici in diversi modi: agisce sui livelli di acido  $\gamma$  amino butirrico (GABA) nel cervello, blocca i canali ionici voltaggio-dipendenti e agisce anche come inibitore delle HDAC (21). Il VPA modula la scarica neuronale migliorando i livelli di GABA nei neuroni pre e postsinaptici. Il legame del GABA al proprio recettore porta all'afflusso di ioni cloruro nel neurone postsinaptico portando all'iperpolarizzazione dei neuroni. Il VPA potenzia l'azione del GABA aumentandone la sintesi e ritardandone il metabolismo. Inoltre, il VPA incrementa l'espressione dei recettori GABA, amplificando quindi la risposta neuronale al GABA (24). Oltre ad aumentare i livelli di GABA, il VPA può anche avere attività antiepilettica riducendo l'attivazione ad alta frequenza dei neuroni bloccando i canali del sodio, del potassio e del calcio voltaggio-dipendenti. Tuttavia, è ancora controverso se il VPA aumenti o diminuisca la conduttanza dei canali del potassio. Recentemente, è stato dimostrato che il VPA è un inibitore di HDAC1 e di altre HDAC (21). È stato descritto che le proteine corrispondenti svolgono ruoli importanti nell'attività cellulare e potrebbero influenzare diversi processi importanti come la regolazione del ciclo cellulare, la differenziazione, l'apoptosi e la riparazione del DNA. Pertanto, più azioni sono state riportate in diversi studi di ricerca: ad esempio, il VPA ha ridotto l'azione di HDAC6 e HDAC8 in un modello di ipertrofia cardiaca; nella fibrosi renale, ha inibito l'effetto di HDAC4 e HDAC5. Ha inoltre soppresso l'attività di HDAC1 e 2 nella fibrosi epatica (24).

Il meccanismo attraverso il quale l'acido valproico influenza il comportamento delle cellule tumorali differisce dal suo effetto antiepilettico poiché l'efficacia degli effetti antineoplastici e antiepilettici è diversa tra i vari analoghi. L'acido valproico, a differenza di un altro inibitore dell'HDAC, la tricostatina A (TSA), non inibisce l'attività delle HDAC di classe II 6 e 10. Ciò implica che il VPA potrebbe essere un inibitore delle HDAC più selettivo del TSA. Il VPA colpisce sia gli HDAC di classe I che quelli di classe II, ma l'effetto su queste due classi è diverso: è stato dimostrato che il VPA inibisce selettivamente l'attività catalitica degli HDAC di classe I e induce la degradazione proteasomiale degli HDAC di classe II. (25)

### 1.9 Dati preliminari: calcificazione indotta da VPA *in vitro*

Dati preliminari *in vitro* hanno descritto i potenziali effetti del VPA sulla differenziazione in senso pro-calcifico di cellule interstiziali della valvola aortica.

Per gli esperimenti sono state utilizzate colture primarie di cellule interstiziali valvolari umani (hVIC) isolate da valvole umane sane di un singolo donatore, che rappresentano un modello di valvola cardiaca *in vitro*. Il terreno utilizzato per il mantenimento delle cellule in coltura è stato formulato per fornire un ambiente nutrizionale preciso che promuovesse selettivamente la proliferazione e la crescita di fibroblasti cardiaci umani.

In seguito allo scongelamento delle cellule e alla fase di espansione cellulare è stata eseguita, per la sperimentazione con i trattamenti previsti, la semina delle cellule in piastre multipozzetto. In questo studio le cellule sono state trattate con diversi terreni:

- Terreno “fibroblast medium-2” (FM-2) addizionato con siero fetale bovino (FBS) (5%), 1% di glutammina e 1% di penicillina-streptomina (condizione di controllo);
- Terreni osteogenici: terreno di controllo addizionato con desametasone (100 nM), acido ascorbico 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $\beta$ -glicerofosfato (2 mM) (OM1) oppure fosfato inorganico (2 mM) (OM2).

A questi terreni è stato poi aggiunto l'acido valproico alla concentrazione finale di 2.5 mM o 5.0 mM. I trattamenti hanno avuto una durata di 3-6-12 giorni.

Dopo 12 giorni di coltura sono stati analizzati: l'attività e i livelli proteici di ALP, il livello di calcio extracellulare, l'H3 acetilato e l'espressione genica di alcuni marcatori di osteogenesi (ALP e BMP-2) e di infiammazione (IL-6).

I risultati del dosaggio di calcio extracellulare sulle hVIC hanno evidenziato un aumento importante dello stesso nelle cellule trattate con terreno osteogenico OM2 e OM2 addizionato con VPA (5.0 mM) rispetto al controllo. Nelle cellule trattate con il solo acido valproico, il calcio depositato è paragonabile invece alla condizione di controllo (figura 6).

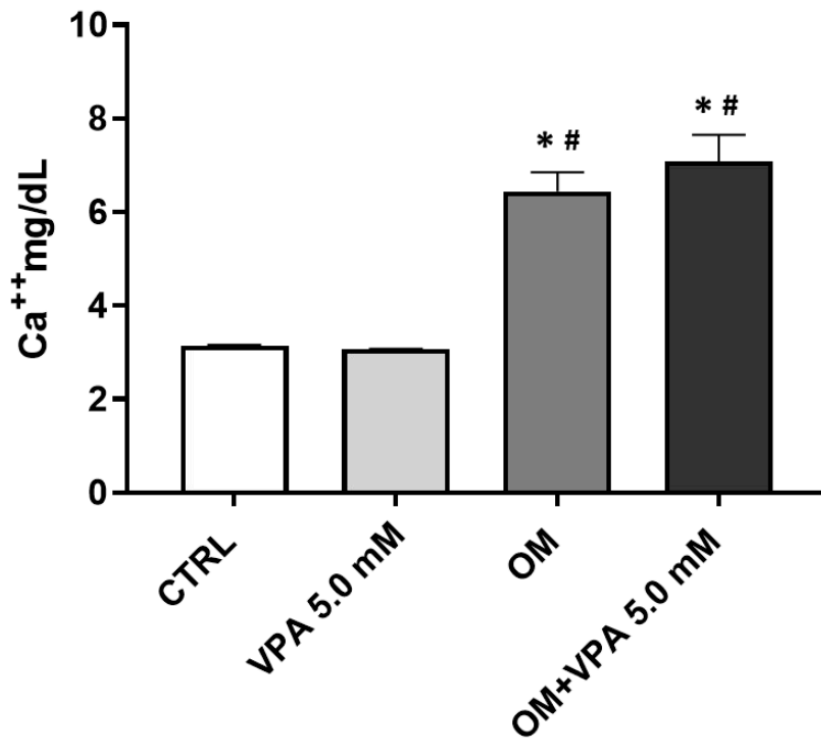


Figura 6. Misurazione del calcio tramite metodo colorimetrico. I trattamenti sono: terreno base (CTRL), terreno osteogenico (OM) con desametasone, acido ascorbico e fosfato inorganico, VPA 5.0 mM e OM addizionato con VPA 0.5 mM.

In riferimento all'attività di ALP, i risultati mostrano a 12 giorni che è molto più elevata nel gruppo OM2 addizionato a VPA rispetto alle altre condizioni di trattamento e si accompagna con la deposizione di calcio extracellulare.

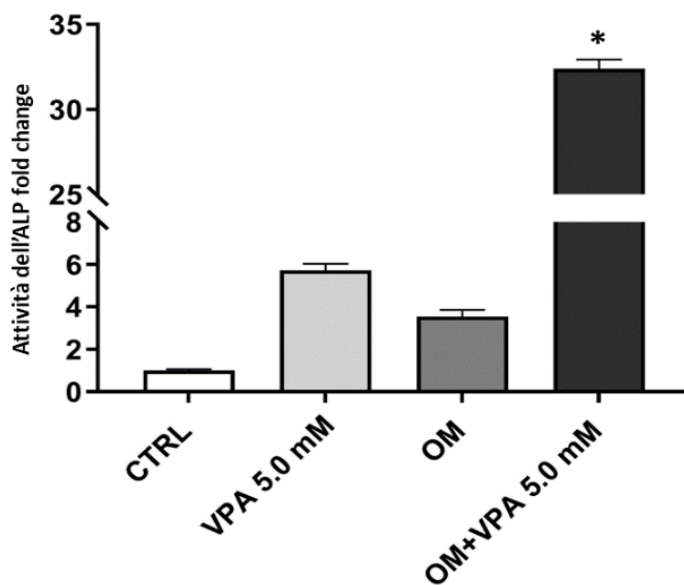


Figura 7. Attività di ALP in cellule valvolari interstiziali umane

Al contrario, confrontando la figura 6 e la figura 7, il trattamento con solo VPA aumenta l'attività enzimatica di ALP senza però indurre deposizione di calcio; con il solo terreno OM2 le cellule calcificano ma l'attività di ALP è paragonabile a quella osservata nelle cellule trattate con il terreno di controllo o con il solo acido valproico (figura 7).

Per quanto riguarda l'espressione genica, a 12 giorni, l'ALP risulta aumentata in tutte le condizioni rispetto al controllo. L'incremento è particolarmente evidente con il trattamento OM2 addizionato con VPA 5.0 mM, riflettendo l'andamento dell'attività enzimatica. Allo stesso modo, anche l'espressione genica di BMP-2 e IL-6 aumenta in modo significativo nei due gruppi trattati con acido valproico.

Per chiarire meglio la possibile correlazione tra VPA e stimolazione osteogenica, le hVIC sono state trattate con diverse concentrazioni di farmaco; nello specifico, il VPA è stato aggiunto al mezzo osteogenico a concentrazioni di 2.5 mM e 5.0 mM, mentre l'analisi dell'attività e dell'espressione genica di ALP e di RUNX2 è stata eseguita dopo 3 e 7 giorni di trattamento. L'analisi dei risultati ottenuti dal dosaggio dell'attività di ALP ha messo in luce un incremento dell'attività di ALP in presenza di VPA e ha permesso di comprendere come tale aumento sia concentrazione e tempo-dipendente; l'aumento dell'attività enzimatica risulta infatti essere 2 volte più elevata con il VPA 5.0 mM rispetto al trattamento con VPA 2.5 mM. Comparando i risultati ottenuti a 3 e a 7 giorni è evidente che la risposta risulti aumentare con il tempo di trattamento (figura 8).



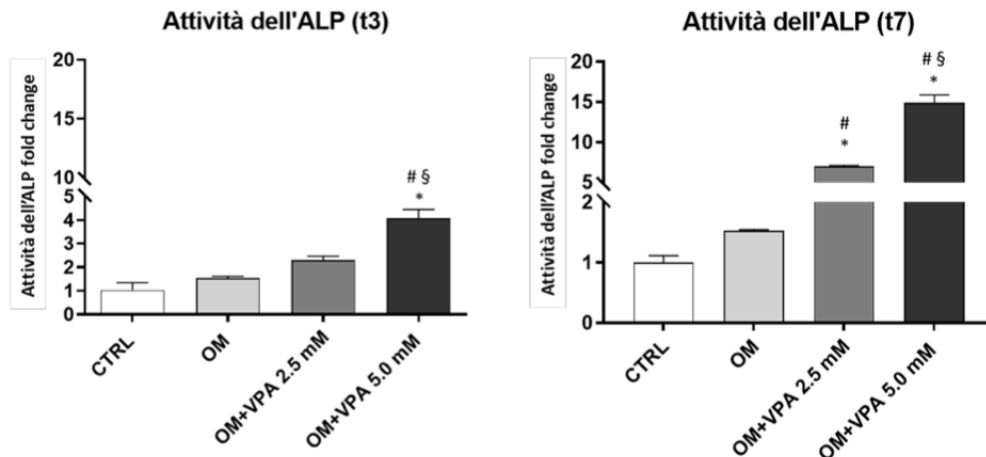


Figura 8. Attività enzimatica dell'ALP in cellule valvolari interstiziali umane con terreni osteogenici addizionati con VPA 2.5 mM e 5.0 mM a 3 e a 7 giorni

Per quanto riguarda l'espressione genica di ALP e di RUNX2, i risultati hanno evidenziato un aumento di ALP a 3 e a 7 giorni di trattamento con il terreno osteogenico OM2. Se a quest'ultimo viene aggiunto il VPA, l'espressione genica risulta essere ulteriormente aumentata ed è tale da avere un effetto sull'attività enzimatica che non è riscontrabile nelle altre condizioni. Allo stesso modo, anche l'espressione genica del RUNX2 aumenta in modo importante dopo 3 o 7 giorni di trattamento con il terreno OM2 addizionato con VPA 2.5 mM e 5.0 mM.

Questi risultati suggeriscono un effetto sinergico, sia a livello di attività enzimatica sia di espressione genica, dei due marker osteogenici (figura 9).

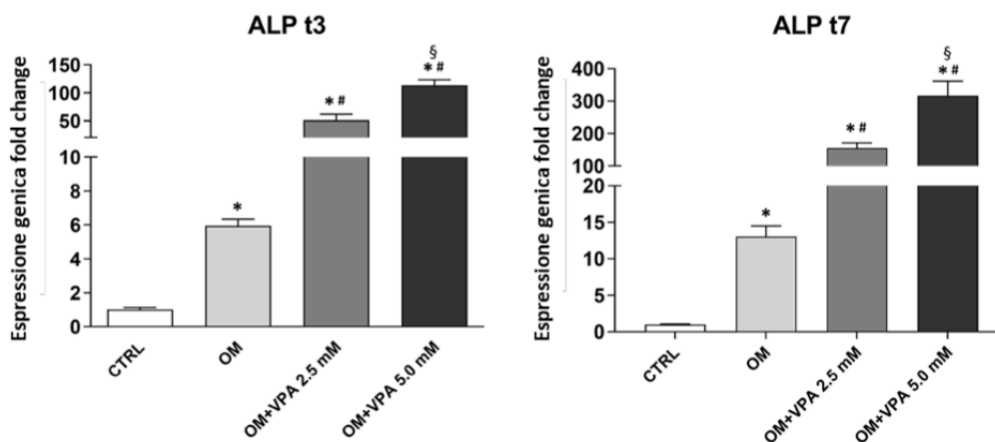


Figura 9. Espressione genica di ALP in cellule valvolari interstiziali umane

Al fine di comprendere se l'effetto del VPA sulla calcificazione avvenga attraverso l'inibizione delle HDAC è stata effettuata un'analisi di espressione proteica dell'istone H3 acetilato, la quale ha evidenziato un aumento significativo dell'acetilazione nelle hVIC trattate con terreno osteogenico addizionato con VPA e tale osservazione conferma l'azione regolatoria di VPA sulle HDAC. Infine, l'analisi istologica di lembi valvolari aortici calcifici umani ha evidenziato la presenza dell'istone H3 acetilato nel tessuto valvolare patologico.

Attraverso questo studio *in vitro* è stato, quindi, dimostrato che il VPA, in qualità di inibitore degli HDAC, promuove la maturazione osteoblastica e la riparazione ossea, nonché aumenta l'espressione di ALP, RUNX2 e di BMP-2 nelle VIC; pertanto, i risultati suggeriscono come il VPA abbia un effetto sulla differenziazione in senso osteoblastico e come l'acetilazione istonica possa essere implicata nella progressione della CAVD.

## **2. SCOPO DELLO STUDIO**

Visti i dati preliminari di aumento della calcificazione indotto in vitro dal VPA su cellule valvolari, lo scopo principale di questo studio è stato quello di descrivere la prevalenza di stenosi aortica calcifica in pazienti trattati con VPA per epilessia e confrontarla con un gruppo di pazienti trattato con altri farmaci antiepilettici. Inoltre, come scopo secondario, lo studio ha analizzato le differenze tra i pazienti trattati con VPA e quelli trattati con altri farmaci antiepilettici in termini di fattori di rischio cardiovascolare ed exitus.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Disegno e popolazione dello studio**

Il disegno dello studio è osservazionale, caso-controllo. Sono stati arruolati i pazienti seguiti presso l'Ambulatorio di Epilessia del reparto di Neurologia dell'Ospedale Universitario Ca' Foncello di Treviso, suddivisi in due gruppi: quelli trattati con acido valproico (casi) e quelli trattati con altri anti-epilettici (controlli).

I criteri di inclusione utilizzati per la selezione dei pazienti sono stati i seguenti:

- Diagnosi di epilessia;
- Trattamento farmacologico con acido valproico proseguito per almeno un anno, in atto o pregresso (casi), oppure con altri farmaci anti-epilettici (controlli);
- Età uguale o superiore a 40 anni;
- Disponibilità della documentazione relativa a valutazioni cliniche e strumentali per la diagnosi e il follow-up.

I criteri di esclusione sono stati:

- Pazienti non contattabili o persi al follow-up.

#### **3.2 Raccolta dei dati e strumenti utilizzati**

La raccolta dei dati è stata eseguita tramite revisione delle cartelle cliniche informatizzate dei pazienti presenti nel registro del centro di riferimento. Tutti i pazienti sono stati inoltre sottoposti ad un questionario per via telefonica o durante le visite neurologiche di controllo per l'inquadramento cardiovascolare.

In particolare, per ciascun paziente sono stati raccolti i seguenti dati:

- Dati demografici quali età e sesso;
- Abitudine al fumo di sigaretta;
- La presenza di eventuali comorbidità, quali ipertensione arteriosa, dislipidemia, malattie cardiovascolari croniche, diabete mellito, neoplasia attiva o pregressa, insufficienza renale cronica, malattie genetiche, patologie autoimmuni;
- Dati relativi ai farmaci utilizzati nel trattamento dell'epilessia. Nel caso di trattamento con VPA sono state raccolte informazioni relative alla

posologia, alla data di inizio dell'assunzione, all'eventuale data di sospensione, e all'eventuale assunzione concomitante di altri farmaci antiepilettici;

- Esecuzione o meno di un ecocardiogramma e di una TC al torace, con la relativa data;
- Diagnosi nota di stenosi aortica;
- Eventuale exitus con la causa e la data.

### **3.3 Obiettivi primari e secondari**

L'obiettivo primario è confrontare la prevalenza di stenosi aortica nota tra i pazienti trattati con VPA per almeno un anno e quelli trattati con altri farmaci anti-epilettici.

L'obiettivo secondario è confrontare i due gruppi anche in termini di fattori di rischio cardiovascolare e di exitus.

### **3.4 Analisi statistica**

Le caratteristiche demografiche e cliniche e i principali *outcome* clinici dei due gruppi di pazienti sono stati descritti come percentuali o mediane con IQR (*interquartile range*) a seconda del tipo di variabile. I dati sono stati confrontati attraverso test parametrici o non parametrici, come più appropriato. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Non è stata effettuata correzione per test multipli. L'analisi statistica è stata effettuata con SPSS versione n. 28 per MAC.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Popolazione in studio

I pazienti seguiti presso l'ambulatorio dell'epilessia dell'Ospedale Universitario Ca' Foncello inizialmente considerati per l'arruolamento nello studio sono stati 535, di cui 186 (34.8%) trattati con VPA e 349 (65.2%) trattati con altri farmaci antiepilettici. Di questi, 169 pazienti sono stati esclusi perché di età < 40 anni, mentre altri 86 sono stati esclusi per altri motivi (figura 10): in particolare, dei pazienti trattati con VPA 18 sono stati esclusi per dati incompleti riguardo la durata di terapia o per durata di terapia <1 anno. Il numero finale di pazienti inclusi nello studio è stato 280 (52.3% del totale), di cui 98 trattati con VPA (35%) e 182 (65%) trattati con altri farmaci antiepilettici.

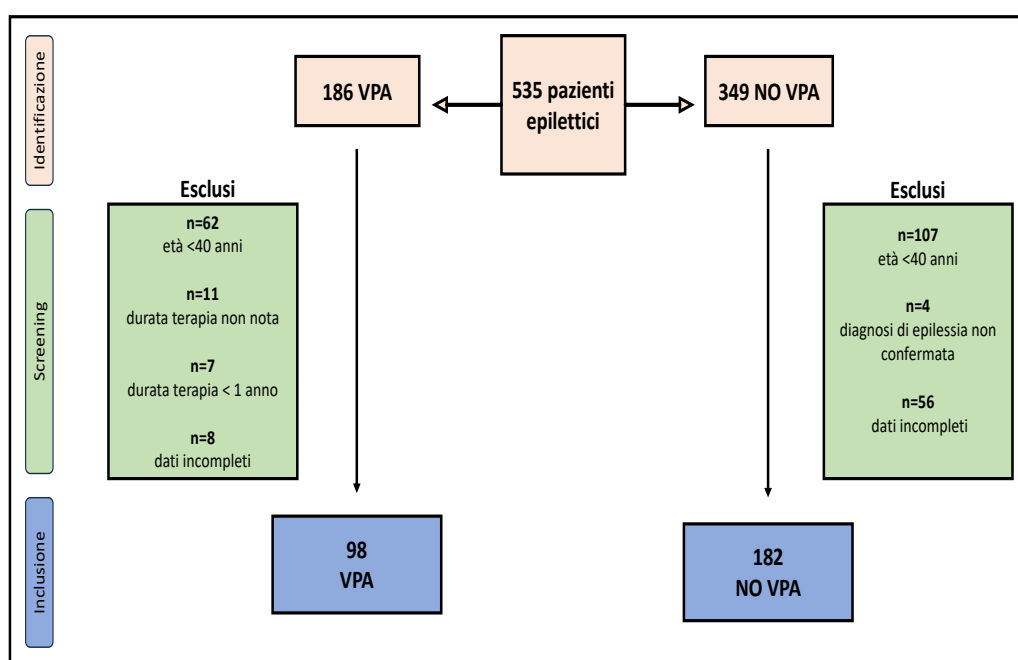


Figura 10. Screening dei pazienti arruolati nello studio

Le principali caratteristiche dei due gruppi sono descritte nella tabella n. 1. In particolare, sebbene siano stati selezionati solo pazienti di età superiore ai 40 anni, i due gruppi differiscono in modo statisticamente significativo per l'età ( $p=0.036$ ), essendo i pazienti trattati con VPA mediamente più giovani di quelli trattati con altri farmaci. Per il resto, non sono emerse differenze statisticamente significative negli altri dati demografici e nella prevalenza di diverse

comorbidità. Dei 98 pazienti trattati con VPA, 65 sono risultati in trattamento ancora attivo mentre 33 hanno interrotto la terapia con VPA, proseguita comunque per un periodo complessivamente superiore a un anno. La durata mediana di terapia con VPA è stata di 11 anni (IQR 18).

Tabella n. I **Caratteristiche dei pazienti inclusi nello studio.**

	VPA (n=98)	No VPA (n=182)
Età (mediana, IQR)	58 (17)	61 (24)*
Sesso maschile (n, %)	47 (48.0)	99 (54.4)
Fumo (n, %):		
- Non fumatori	69 (72.6)	99 (61.1)
- Fumatori	13 (13.7)	20 (12.3)
- Ex fumatori	13 (13.7)	43 (26.5)
Durata terapia VPA (anni, mediana, IQR)	11 (18)	---
Comorbidità (n, %):		
- Tumori	26 (28.0)	47 (26.6)
- MCV	12 (16.9)	40 (28.8)
- Decadimento cognitivo	9 (12.7)	15 (10.8)
- IRC/dialisi	4 (5.6)	8 (5.8)
- Patologie immunologiche	16 (22.5)	31 (22.3)
- Malattie genetiche	7 (9.9)	6 (4.3)
- Altro	44 (62.0)	94 (67.6)
Exitus (n, %)	1 (1.0)	5 (2.7)

VPA: acido valproico, IQR: range interquantile; MCV: malattie cardiovascolari (ictus, infarto del miocardio, patologie dei vasi periferici); IRC: insufficienza renale cronica. \*p<0.05

#### 4.2 Prevalenza della stenosi aortica

Le percentuali di diagnosi nota di stenosi aortica sono risultate sovrapponibili tra i due gruppi (figura 11, 3.1% nei pazienti trattati con VPA versus 8.8% in quelli trattati con altri farmaci, p=0.130). Le diagnosi sono state fatte sulla base di referti ecocardiografici o radiologici. Dei pazienti con almeno un ecocardiogramma

disponibile (n=97), la data di esecuzione del più recente risale ad una mediana di 22 mesi (IQR 36) nel gruppo trattato con VPA e 34 mesi (IQR 36) nei pazienti trattati con altri antiepilettici (p=0.039). Una minoranza di pazienti ha avuto il riscontro occasionale di calcificazione aortica in corso di TC torace (3 pazienti totali, di cui 2 trattati con VPA e 1 con altri farmaci). La maggior parte dei pazienti, tuttavia, non è mai stata sottoposta ad esami idonei a diagnosticare o escludere la stenosi aortica calcifica (57.1% nel gruppo VPA e 58.5% nel gruppo NO VPA).

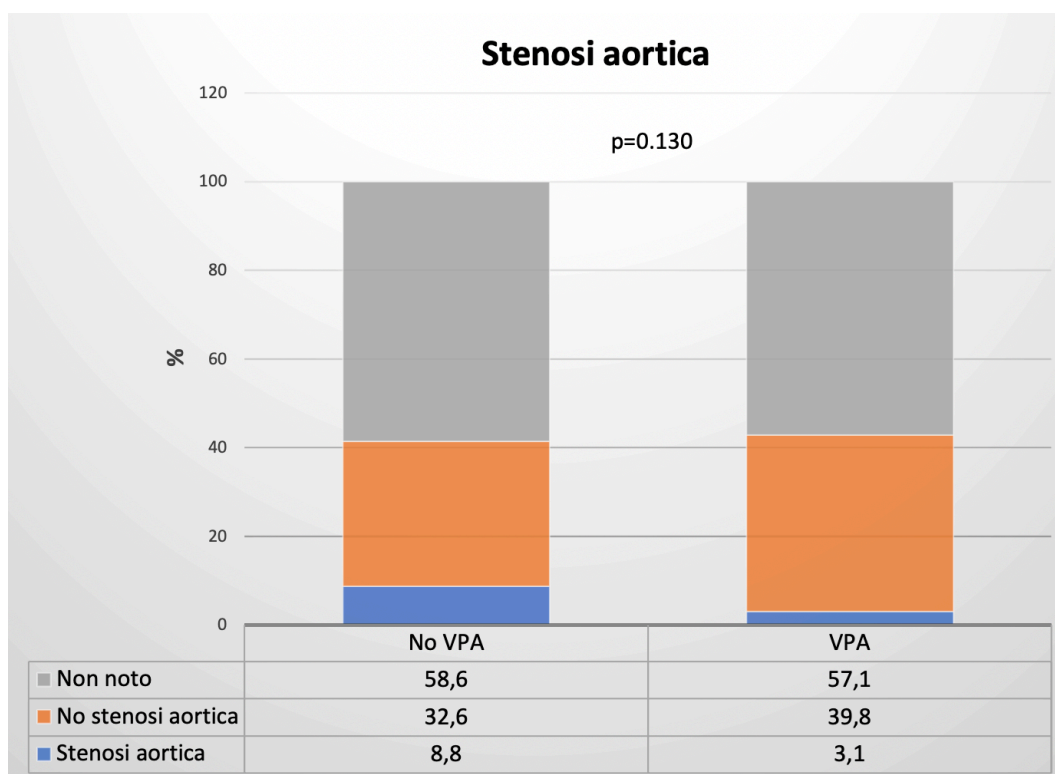


Figura 11. Prevalenza in percentuale della stenosi aortica nei due gruppi di pazienti

### 4.3 Prevalenza dei fattori di rischio cardiovascolari

Dal punto di vista della prevalenza dei principali fattori di rischio cardiovascolari, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti in termini di dislipidemia, ipertensione arteriosa, diabete mellito e pregresso evento cardiovascolare (figura 12).



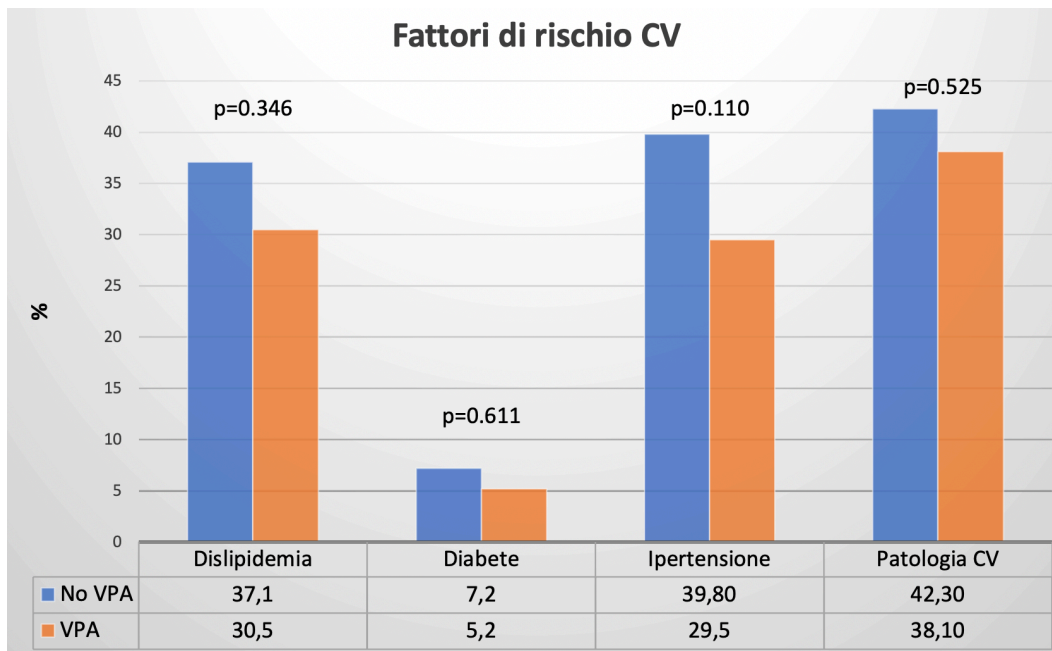


Figura 12. Prevalenza in percentuale dei fattori di rischio cardiovascolari nei due gruppi di pazienti

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La stenosi calcifica della valvola aortica è una delle più comuni patologie cardiache nel mondo occidentale. Sulla base dei dati preliminari ottenuti *in vitro*, con il presente studio ci siamo proposti, come obiettivo primario, quello di descrivere la prevalenza di stenosi aortica in pazienti trattati con acido valproico per almeno un anno, confrontando la stessa con pazienti trattati con altri farmaci anti-epilettici. È stato inoltre effettuato un confronto tra i due gruppi in termini di fattori di rischio cardiovascolare, obiettivo secondario di questa tesi.

Dati preliminari dimostrano come *in vitro* cellule valvolari in coltura con VPA aumentino l'attività e i livelli proteici di ALP, così come il livello di calcio extracellulare, l'H3 acetilato e l'espressione genica di alcuni marcatori di osteogenesi (ALP e BMP-2) e di infiammazione (IL-6). Tuttavia, l'azione pro-calcifica e in questo caso pro-infiammatoria del VPA potrebbe essere cellulo-specifica, visto che su altri modelli di colture sia tissutali che cellulari provenienti per esempio dall'intestino l'azione prevalente è anti-infiammatoria, con dimostrata riduzione dei livelli genici e proteici di IL-6 (26). Nei modelli di calcificazione della valvola aortica, l'attivazione di p300, l'acetiltransferasi maggiormente studiata, determina un aumento dell'acetilazione degli istoni (H3 e H4) o di RUNX2, sovraregolando così i geni correlati agli osteoblasti come l'osteocalcina e l'ALP; (16) questo spiega come una maggiore acetilazione degli istoni sia coinvolta nella calcificazione dei lembi della valvola aortica. (17) Al contrario, C646, il più potente inibitore di p300, si è scoperto ridurre significativamente la calcificazione della valvola aortica sopprimendo l'acetilazione di H3 e H4, suggerendo che l'inibizione delle acetiltransferasi possa essere una potenziale strategia terapeutica per la stenosi calcifica della valvola aortica. (16,17) Altri studi, sintetizzati in una recente review e tutti su modelli sperimentali *in vitro*, sottolineano effetti contrastanti dell'acetilazione istonica sulla calcificazione vascolare, non solo valvolare (16). Questo studio è nato quindi dalla necessità di valutare sui pazienti trattati cronicamente con un noto inibitore degli HDAC, come l'acido valproico, la prevalenza di patologia calcifica valvolare aortica o di problematiche cardiovascolari.

I risultati mostrano percentuali di diagnosi nota di stenosi aortica sovrapponibili tra i due gruppi di pazienti confrontati, in particolare 3.1% nei pazienti trattati con VPA contro 8.8% in quelli trattati con altri farmaci antiepilettici. La maggior parte delle diagnosi è stata fatta con test ecocardiografico mentre solo in una minoranza di casi la diagnosi di stenosi valvolare aortica calcifica è stata fatta incidentalmente in corso di TC torace per altra indicazione. Tuttavia, la maggior parte dei pazienti in entrambi i gruppi non è mai stata sottoposta ad esami specifici per diagnosticare o escludere la stenosi aortica calcifica. Sebbene il dato sia limitato dalla natura puramente descrittiva dello studio, ad oggi questo rappresenta il primo studio in letteratura che offre una fotografia della situazione attuale di una selezionata categoria di malati, confrontandoli con un gruppo controllo. Inoltre, il fatto che si tratti di uno studio monocentrico da un lato è un limite per la numerosità campionaria ma dall'altro garantisce una omogeneità di trattamento (soprattutto nelle indicazioni a specifiche terapie antiepilettiche) e di informazioni raccolte. Sicuramente c'è la necessità di approfondire il quadro diagnostico per la stenosi aortica di questa casistica di malati, magari studiandoli in modo sistematico con ecocardiogramma, ma intanto i risultati non confermano i dati preliminari riscontrati in vitro, perché sembra che il VPA non sia associato ad un aumento della prevalenza di stenosi aortica. I dati sperimentali presenti in letteratura ci mostrano come diversi inibitori degli HDAC possano avere effetti diversi sulla calcificazione valvolare aortica (17), per cui i dati contrastanti emersi con il VPA potrebbero rispecchiare il fatto che la non selettività del farmaco nella inibizione di diverse isoforme di HDAC riduce in vivo l'effetto pro-calcificante emerso in vitro, potendo coinvolgere numerosi altri meccanismi compensatori nei confronti dei pathway che regolano la calcificazione valvolare o vascolare in generale. Inoltre, le concentrazioni di VPA utilizzate per le colture cellulari (2.5 mM e 5 mM) rispecchiano quelle che si raggiungono in circolo con le dosi terapeutiche di farmaco; tuttavia, i pazienti valutati assumevano dosi differenti di farmaco e solo di pochi era disponibile il dosaggio ematico.

Per quanto concerne i fattori di rischio cardiovascolari, non sono emerse differenze statisticamente rilevanti tra i due gruppi in termini di prevalenza di ipertensione arteriosa, dislipidemia e diabete mellito. Rispetto ai dati di prevalenza nella popolazione generale, che riportano una prevalenza mediana standardizzata per età di ipertensione arteriosa in Europa pari a 25% (27), della dislipidemia

superiore al 50% nei paesi con elevato status socio-economico e del diabete in Italia del 6.4% (28), le prevalenze emerse da questo studio hanno confermato simili percentuali di diabete mellito (5.2% e 7.2% nei pazienti trattati con VPA o altri antiepilettici, rispettivamente), mentre la dislipidemia è risultata presente intorno al 30% in entrambi i gruppi e l'ipertensione nel 29.5% del gruppo VPA e 39.8% nell'altro (differenza non statisticamente significativa, figura 12) (16)(17)(16,17)I punti di forza di questo studio sono rappresentati dal fatto che sono stati inclusi 280 pazienti totali tra quelli che assumono o hanno assunto VPA per almeno 1 anno e quelli che assumono altri farmaci antiepilettici e quindi si tratta di una numerosità discreta; inoltre, un altro punto a favore è che si tratta di uno studio monocentrico e questo fa sì che si riducano i bias legati a diversi algoritmi terapeutici dell'epilessia che possono essere presenti tra i vari centri ospedalieri o i vari paesi. Un ulteriore punto di forza di questo lavoro è dovuto al fatto che è il primo studio in cui viene descritto il profilo cardiovascolare dei pazienti trattati con acido valproico. D'altro canto i limiti principali dello studio sono rappresentati dai seguenti fattori: la mancanza di alcuni dati per escludere o diagnosticare la stenosi aortica calcifica, per cui il dato risulta essere preliminare e andrà confermato nel contesto di studi prospettici osservazionali, la non disponibilità dei livelli ematici di acido valproico dei pazienti che lo assumono e, infine, la mancanza di dati diagnostici su un numero consistente di pazienti.

In conclusione, per la prima volta questo studio descrive la prevalenza di stenosi aortica calcifica e altre problematiche cardiovascolari in una popolazione di pazienti trattati per almeno un anno con un noto inibitore degli HDAC. Sebbene i risultati non siano dirimenti in termini di una possibile azione procalcifica del VPA, i dati meritano di essere integrati con metodiche diagnostiche accurate, proseguendo il follow-up in modo prospettico a lungo termine, visto che anche in letteratura i dati non sono ancora univoci e c'è grande interesse nel trovare nuovi target terapeutici per la riduzione del rischio cardiovascolare.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Kraler S, Blaser MC, Aikawa E, Camici GG, Lüscher TF. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy. Vol. 43, *European Heart Journal*. Oxford University Press; 2022. p. 683–97.
2. Chen HY, Engert JC, Thanassoulis G. Risk factors for valvular calcification. Vol. 26, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 96–102.
3. Dalla Volta S, Daliento L, Razzolini R. *Malattie del Cuore e dei Vasi*. Terza Edizione. McGraw-Hill, editor. 2005. 3–228 p.
4. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 3;2.
5. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, et al. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. Vol. 40, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 885–900.
6. Shu L, Yuan Z, Li F, Cai Z. Oxidative stress and valvular endothelial cells in aortic valve calcification. Vol. 163, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2023.
7. Peeters FECM, Meex SJR, Dweck MR, Aikawa E, Crijns HJGM, Schurgers LJ, et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment. Vol. 39, *European heart journal*. NLM (Medline); 2018. p. 2618–24.
8. Pan W, Jie W, Huang H. *Vascular calcification: Molecular mechanisms and therapeutic interventions*. Vol. 4, *MedComm*. John Wiley and Sons Inc; 2023.
9. Grimard BH, Safford RE, Burns EL. *Aortic Stenosis: Diagnosis and Treatment* [Internet]. Vol. 93. 2016. Available from: [www.aafp.org/afp](http://www.aafp.org/afp)
10. Izquierdo-Gómez MM, Hernández-Betancor I, García-Niebla J, Marí-López B, Laynez-Cerdeña I, Lacalzada-Almeida J. Valve calcification in aortic stenosis: Etiology and diagnostic imaging techniques. Vol. 2017, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2017.
11. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2022 Jun 1;75(6):524.
12. Melidi E, Latsios G, Toutouzas K, Vavouranakis M, Tolios I, Gouliami M, et al. Cardio-anesthesiology considerations for the trans-catheter aortic valve implantation (TAVI) procedure. Vol. 57, *Hellenic Journal of Cardiology*. Hellenic Cardiological Society; 2016. p. 401–6.
13. Clayton B, Morgan-Hughes G, Roobottom C. Transcatheter aortic valve insertion (TAVI): A review. Vol. 87, *British Journal of Radiology*. 2014.
14. Amaldi F, Benedetti P, Pesole G, Plevani P. *Biologia Molecolare*. Seconda Edizione. 2014. 84–486 p.
15. De Ruijter AJM, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg A! BP. Histone deacetylases (HDACs) : characterization of the classical HDAC family. Vol. 370, *Biochem. J*. 2003.

16. Kwon DH, Ryu J, Kim YK, Kook H. Roles of histone acetylation modifiers and other epigenetic regulators in vascular calcification. *Int J Mol Sci.* 2020 May 1;21(9).
17. Gu J, Lu Y, Deng M, Qiu M, Tian Y, Ji Y, et al. Inhibition of acetylation of histones 3 and 4 attenuates aortic valve calcification. *Exp Mol Med.* 2019 Jul 1;51(7).
18. Everix L, Seane EN, Ebenhan T, Goethals I, Bolcaen J. *Introducing HDAC-Targeting Radiopharmaceuticals for Glioblastoma Imaging and Therapy.* Vol. 16, Pharmaceuticals. MDPI; 2023.
19. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(4).
20. Kwon DH, Kim YK, Kook H. New aspects of vascular calcification: Histone deacetylases and beyond. Vol. 32, *Journal of Korean Medical Science.* Korean Academy of Medical Science; 2017. p. 1738–48.
21. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, et al. Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(4):236–41.
22. AIFA. *Banca Dati Farmaci.* 2023. p. 23–4.
23. Tang JY, Kiang TKL, Ensom MHH. Pharmacokinetic Interactions between Valproic Acid and Lorazepam (PIVOtAL Study): A Review of Site-Specific Practices. Vol. 70, *CJHP.*
24. Singh D, Gupta S, Singh I, Morsy MA, Nair AB, Ahmed ASF. Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. Vol. 142, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* Elsevier Masson s.r.l.; 2021.
25. Kostrouchová M, Kostrouch Z. Valproic Acid, a Molecular Lead to Multiple Regulatory Pathways.
26. Felice C, Lewis A, Iqbal S, Gordon H, Rigoni A, Colombo MP, et al. Intestinal Inflammation is Linked to Hypoacetylation of Histone 3 Lysine 27 and can be Reversed by Valproic Acid Treatment in Inflammatory Bowel Disease Patients. Vol. 11, *CMGH.* Elsevier Inc.; 2021. p. 889-891.e6.
27. *ESC Cardiovascular Realities 2022.*
28. <https://data.worldbank.org/indicator/SH.STA.DIAB.ZS>.