

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI E GERONTOLOGICHE

XXXV Ciclo

(Anni 2019-2022)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

TITOLO

POTENZIALE RUOLO CLINICO E FISIOPATOLOGICO DELLA
DEPOSIZIONE VALVOLARE ISOLATA DI AMILOIDE NELLA STENOSI
AORTICA

TUTOR/RELATORE

Prof.ssa Valentina Parisi

CANDIDATA

Dott.ssa Maddalena Conte

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
Stenosi aortica	3
Stenosi aortica: meccanismi fisiopatologici e terapia	3
Amiloidosi cardiaca.....	7
Amiloidosi cardiaca: diagnosi e terapia	9
Stenosi aortica e Amiloidosi	11
Stenosi aortica e deposizione isolata valvolare di amiloide.....	13
METODI	14
Popolazione di Studio.....	14
Valutazione della popolazione di studio	14
Analisi istologica e immunoistochimica	16
Analisi proteomica	17
Isolamento e coltura delle cellule interstiziali valvolari aortiche.....	18
Estrazione dell'RNA e qPCR	18
Analisi statistica	19
RISULTATI	19
Valutazione clinica e istologica.....	19
Analisi proteomica	23
Immunoistochimica.....	26
Livelli circolanti di SAA1	26
Produzione di SAA1 dalle cellule valvolari interstiziali	27
DISCUSSIONE.....	28
Limitazioni dello studio	30
CONCLUSIONI.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	32

INTRODUZIONE

Stenosi aortica

La stenosi aortica (SA) rappresenta la malattia valvolare di più comune riscontro nei paesi industrializzati. La sua prevalenza aumenta con l'età; pertanto, considerato il cambiamento demografico e l'incremento della durata media di vita della popolazione globale, si prevede un aumento significativo della sua prevalenza, tale da rendere questa patologia un enorme onere sanitario e socioeconomico (1). A questo proposito, è stato stimato che, sia negli Stati Uniti che in Europa, entro il 2050 raddoppierà il numero di pazienti anziani (di età pari o superiore a 75 anni), con SA severa sintomatica, dunque con indicazione per il trattamento, che è il gruppo più importante per i sistemi sanitari a causa della complessità e dei costi di gestione (2, 3).

La SA è una malattia lenta e progressiva, caratterizzata da un periodo asintomatico molto lungo, della durata di anni, durante il quale l'ostacolo all'eiezione ventricolare sinistra viene compensato da vari meccanismi, in particolare dall'ipertrofia miocardica. La comparsa dei sintomi si associa a un drammatico peggioramento della prognosi: è stato riportato un tasso medio di sopravvivenza del 50% dopo due anni dall'esordio dei sintomi, e del 20% a cinque anni dall'esordio dei sintomi (4, 5).

Stenosi aortica: meccanismi fisiopatologici e terapia

Negli adulti, specialmente nei pazienti di età superiore ai 70 anni, la degenerazione calcifica rappresenta il principale meccanismo coinvolto nello sviluppo di SA. Diverse evidenze supportano il concetto che la fisiopatologia della SA condivide molti aspetti con l'aterosclerosi vascolare ed è associata con i tradizionali fattori di rischio aterosclerotici come l'età, l'ipercolesterolemia, il fumo, l'ipertensione, il diabete e l'obesità (6, 7).

Per decenni, la degenerazione calcifica della valvola aortica è stata considerata un'inevitabile conseguenza dell'invecchiamento; al giorno d'oggi, è ampiamente riconosciuto che la SA rappresenta invece un processo attivo e complesso, che coinvolge meccanismi fisiopatologici multifattoriali, e che evolve progressivamente, passando da uno stadio precoce, caratterizzato da iniziale calcificazione e focale ispessimento dei lembi con funzione valvolare preservata, alla sclerosi valvolare aortica, fino allo stadio terminale con ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro dovuta alla severa calcificazione e immobilizzazione dei lembi valvolari.

I meccanismi attivi coinvolti nella degenerazione calcifica della valvola aortica sono particolarmente complessi e includono, in particolare, fattori che promuovono l'infiammazione (8). A questo proposito, le sollecitazioni meccaniche a cui è sottoposta la valvola aortica durante il ciclo cardiaco possono svolgere un ruolo importante nel danneggiare l'integrità del tessuto dei lembi valvolari e promuoverne la calcificazione. In particolare, come per l'aterosclerosi, l'aumento dello stress meccanico e la riduzione dello stress di taglio provocano danno e disfunzione delle cellule endoteliali valvolari che perdono la funzione barriera contro insulti meccanici, metabolici e infiammatori. La lesione endoteliale consente l'infiltrazione di cellule lipidiche e infiammatorie nel tessuto valvolare interstiziale. Nelle lesioni valvolari aortiche precoci sono presenti lipoproteine a bassa densità (LDL) e la lipoproteina A, implicate anche nell'aterogenesi, che subiscono modificazioni ossidative diventando altamente citotossiche e promuovendo l'attività infiammatoria e la mineralizzazione mediante la secrezione di citochine proinfiammatorie e profibrotiche (9). Le LDL ossidate stimolano infatti l'attivazione dei fibroblasti valvolari e di conseguenza la formazione di un core per la deposizione di calcio. Nella valvola aortica stenotica è stata descritta una riduzione dell'espressione e dell'attività di enzimi antiossidanti, associata ad importante produzione di radicali liberi, come il superossido e il perossido di ossigeno. Questo aumento dello stress ossidativo svolge un ruolo importante nella patogenesi e nella progressione della SA, promuovendo l'attivazione di segnali pro-fibrotici e pro-osteogenici (10). Inoltre, l'aumentata espressione endoteliale di molecole di adesione come l'E-selectina, la molecola di adesione intercellulare-1 (ICAM-1) e la molecola di adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM-1), permette ai monociti e ai linfociti T di penetrare nell'endotelio valvolare e accumularsi in aree di infiammazione, dove i monociti si differenziano in macrofagi e le cellule T attivate rilasciano citochine e fattori di crescita in grado di indurre fibrosi e progressione della calcificazione. L'infiltrato infiammatorio, attraverso il rilascio di tali mediatori, favorisce il processo di angiogenesi con modificazioni endoteliali in grado di promuovere la progressione della fibrosi e della calcificazione (8). Un altro dei meccanismi coinvolti nella fisiopatologia della SA è l'iperattività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, che genera alti livelli di angiotensina II che, attraverso il recettore dell'angiotensina II di tipo 1 (AT1), contribuisce alla patogenesi della malattia aumentando l'assorbimento di LDL, l'infiammazione e lo stato pro-fibrotico (11).

Col progredire della malattia, si verifica un rimodellamento della matrice extracellulare promossa dall'attivazione delle metalloproteinasi e delle catepsine, che stimolano la degradazione dell'elastina e la proliferazione dei fibroblasti con conseguente fibrosi,

ispessimento e rigidità valvolare. Nelle fasi più avanzate di malattia, è stata invece descritta nella valvola la presenza di cellule con attività osteoblasto-simile e un aumento dell'espressione genica di diverse proteine specifiche degli osteoblasti e comunemente associate alla formazione dell'osso scheletrico, come l'osteonectina, l'osteopontina e l'osteocalcina, suggerendo che il processo di calcificazione avverrebbe in maniera simile a quella osservato nell'osso (12). Difatti, la formazione dell'osso scheletrico si verifica attraverso l'iniziale deposizione della matrice di collagene, che fornisce una base per la progressiva calcificazione. Un processo molto simile è stato descritto anche nella valvola aortica. La formazione di tessuto osseo a livello valvolare sarebbe la conseguenza dell'attivazione di molteplici vie di segnalazione che portano alla differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti e cellule osteoblasto-simili, con conseguente formazione di noduli di calcificazione (13). Evidenze sempre più crescenti suggeriscono che l'infiammazione, l'infiltrazione delle lipoproteine, lo stress ossidativo e il rimodellamento della matrice extracellulare sono i principali fattori scatenanti e promotori dei processi osteogenici osservati nella degenerazione della valvola aortica (14). Nelle valvole aortiche stenotiche, si osserva un'iperattivazione della via di segnalazione delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMP), con secrezione dall'endotelio valvolare di alti livelli di BMP-2 e BMP-4, che sono implicate nel meccanismo di mineralizzazione ossea. Questo processo aumenta ulteriormente man mano che la compromissione dell'apertura della valvola progredisce (15). Per quanto riguarda l'origine delle cellule osteoblastiche, l'ipotesi più accreditata chiama in causa i miofibroblasti presenti nell'interstizio valvolare, la cui differenziazione verso un fenotipo simil-osteoblastico è modulata da numerose molecole e vie di segnalazione molto complesse. Alcuni dati suggeriscono che tale differenziazione sarebbe mediata da citochine pro-infiammatorie principalmente secrete dai macrofagi, come l'interleuchina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, fattore di crescita insulino-simile 1, fattore di necrosi tumorale (TNF), fattore di crescita trasformante β (TGF- β). Tuttavia, nelle fasi successive della malattia, questa differenziazione sembra essere modulata da complesse vie di segnale che promuovono la mineralizzazione (15-17), tra cui quella del Notch, del Wnt/ β -catenina e dell'attivatore del recettore del fattore nucleare kappa B/attivatore del recettore del fattore nucleare kappa B ligando/osteoprotegerina (RANK/ RANKL/OPG). RANKL è un membro della famiglia delle citochine TNF; RANK è una proteina transmembrana espressa sui precursori degli osteoclasti ma anche sulle cellule interstiziali valvolari. Nel tessuto osseo, il legame di RANKL a RANK favorisce la differenziazione e la maturazione osteoclastica, inducendo il processo di riassorbimento osseo e demineralizzazione. Al contrario, nella

valvola aortica, RANKL si lega a RANK nelle cellule interstiziali valvolari, agendo come un forte induttore della differenziazione osteogenica con successiva deposizione di calcio e formazione di noduli calcifici (18). Questa via è inibita dall'OPG, un recettore solubile che lega RANKL e ne impedisce il legame con RANK, contrastando sia il processo di demineralizzazione ossea che la deposizione di calcio a livello della valvola. RANKL agisce con effetti pro-osteoblastici anche a livello delle cellule muscolari lisce vascolari attraverso la sovraregolazione di BMP-2 (19).

Dunque, la SA rappresenta il risultato di un processo attivo molto complesso che coinvolge diverse linee cellulari, in particolare miofibroblasti e cellule interstiziali valvolari, che subiscono trasformazione in senso osteoblastico e promuovono la formazione di noduli di calcificazione e la deposizione ossea a livello valvolare.

Ad oggi nessun trattamento medico si è dimostrato efficace nell'arrestare o rallentare la progressione della SA. Tuttavia, le vie di segnalazione coinvolte nella fisiopatologia della SA potrebbero essere considerate potenziali bersagli terapeutici utili per controllare lo sviluppo e la progressione della malattia.

Considerando le somiglianze fisiopatologiche con l'aterosclerosi, specialmente nelle prime fasi della malattia, è stata ipotizzata l'utilità delle statine nel rallentare la progressione della SA, anche grazie alla possibilità di sfruttare gli effetti pleiotropici di questa classe di farmaci, prevalentemente antinfiammatori e antitrombotici (20). Tuttavia, i tre trials randomizzati controllati, SALTIRE, ASTRONOMER e SEAS, condotti nei pazienti con SA, non sono riusciti a dimostrare un effetto benefico della terapia con statine (rispettivamente atorvastatina, rosuvastatina e simvastatina più ezetimibe) nell'arrestare o rallentare la progressione della SA nonostante la significativa riduzione delle concentrazioni sieriche di colesterolo LDL (21-23).

Come per le statine, anche gli studi che hanno esplorato l'efficacia di strategie terapeutiche mirate alle diverse vie di segnalazione che contribuiscono alla fisiopatologia della SA, come il sistema renina-angiotensina, lo stress ossidativo, la via RANK-RANKL, non sono riusciti a dimostrare un effetto favorevole sulla progressione della malattia (24). Pertanto, ad oggi, l'unica terapia disponibile in grado di migliorare la prognosi dei pazienti con SA severa è il trattamento chirurgico di sostituzione valvolare aortica (SVA) o l'impianto percutaneo transcatetere di protesi valvolare aortica (TAVI).

Amiloidosi cardiaca

L'amiloidosi è un disordine del metabolismo proteico che identifica un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate dalla deposizione extracellulare di proteine fibrillari anomale insolubili, che alterano la struttura dei tessuti e degli organi coinvolti compromettendone la funzione (25). La presenza di depositi di amiloide nel cuore definisce l'amiloidosi cardiaca, che rappresenta una causa importante di insufficienza cardiaca, in particolare con funzione sistolica preservata. Le catene leggere delle immunoglobuline, responsabili dell'amiloidosi AL, e la transtiretina (TTR), una proteina sintetizzata prevalentemente nel fegato, rappresentano le proteine amiloidogeniche più frequentemente responsabili di amiloidosi cardiaca.

L'amiloidosi AL è causata da tutte le discrasie plasmacellulari o linfocitarie B (mielomi, linfomi, macroglobulinemia), in cui plasmacellule clonali nel midollo osseo producono e secernono in eccesso le immunoglobuline a catene leggere amiloidogeniche, che si depositano come fibrille amiloidi in più organi, interessando il cuore in circa la metà dei casi (26). L'entità dell'interessamento cardiaco è il principale determinante di morbilità e mortalità (27). La presentazione clinica riflette la diversa deposizione sistemica di amiloide: l'infiltrazione dei tessuti molli e dei piccoli vasi determina macroglossia, ingrossamento della ghiandola sottomandibolare e distrofia ungueale; l'infiltrazione epatica o splenica può causare epatomegalia e splenomegalia palpabile; molto comuni sono affaticamento, perdita di peso e la disfunzione renale, di solito sottoforma di proteinuria nefrosica. La neuropatia periferica è relativamente comune, e si presenta con parestesie o disestesie, così come la neuropatia autonoma, da sospettare in presenza di ipotensione ortostatica, diarrea alternata a costipazione e disfunzione erettile.

L'amiloidosi da TTR include forme ereditarie, da mutazioni del gene della TTR, e la forma wild-type (ATTRwt), da TTR non mutata, responsabile della cosiddetta amiloidosi senile.

La vera prevalenza di ATTRwt è sconosciuta, ma probabilmente sottostimata in molti casi. La prevalenza è in aumento con il crescente invecchiamento della popolazione e grazie agli emergenti strumenti diagnostici, tra cui risonanza magnetica cardiaca e scintigrafia miocardica con ^{99m}Tc-3,3-difosfono-1,2-acido propano dicarbossilico (^{99m}Tc-DPD) (28, 29). Il cuore è generalmente il principale organo coinvolto clinicamente, ad eccezione della sindrome del tunnel carpale e di manifestazioni muscoloscheletriche, tra cui la stenosi del canale lombare, che può precedere i sintomi cardiaci anche di 10-15 anni. A livello cardiaco il processo infiltrativo provoca ispessimento della parete bi-ventricolare con rimodellamento ventricolare concentrico e bassa gittata cardiaca. I vasi intramiocardici sono frequentemente

infiltrati dall'amiloide, causando una ridotta perfusione miocardica. Frequente è l'interessamento atriale e del sistema di conduzione, con sviluppo di dilatazione atriale, aritmie atriali (fibrillazione, flutter o tachicardia atriale) e ritardi della conduzione atrioventricolare. Tuttavia, l'amiloidosi cardiaca in fase precoce è una delle principali sfide diagnostiche: le caratteristiche classiche dell'insufficienza cardiaca potrebbero non essere evidenti fino a stadi avanzati di malattia cardiaca.

Molto più raro è il coinvolgimento cardiaco nell'amiloidosi AA, nota anche come amiloidosi secondaria. Si tratta di una sindrome da amiloidosi sistemica innescata e sostenuta da un'attivazione infiammatoria prolungata. Varie malattie infiammatorie croniche sono state implicate nello sviluppo di amiloidosi AA, tra cui infezioni croniche (tubercolosi, osteomielite), disordini reumatologici e autoimmuni (artrite reumatoide, malattia infiammatorie intestinali), condizioni ereditarie (febbre mediterranea familiare), e varie neoplasie solide o ematologiche. La proteina amiloidogenica precursore è la siero amiloide A (SAA), una proteina di fase acuta prodotta dagli epatociti in seguito al rilascio di citochine pro-infiammatorie, come TNF, IL-1 e IL-6 (30). Il coinvolgimento renale è molto comune, con deposizione di amiloide prevalentemente glomerulare, ma anche interstiziale e vascolare, e si manifesta con proteinuria e/o insufficienza renale. L'11% dei pazienti presenta malattia renale allo stadio terminale già alla diagnosi. Il secondo organo più comunemente coinvolto, in circa il 20% dei pazienti, è il fegato, mentre il coinvolgimento cardiaco è raro, circa il 2% dei pazienti, così come risulta raro anche il coinvolgimento gastrointestinale e nervoso (31). La prognosi è variabile, con una sopravvivenza mediana di 11 anni. I fattori prognostici più importanti sembrano essere l'età avanzata, alti livelli sierici di creatinina e di SAA, presenza ed entità del coinvolgimento cardiaco ed epatico (31). Il trattamento è diretto al controllo della malattia di base e del processo infiammatorio che guida la formazione di amiloide. L'obiettivo della terapia è la riduzione dei livelli sierici di SAA, la cui valutazione permette di definire l'efficacia del trattamento. Tra i farmaci utilizzati, la colchicina è estremamente efficace nella prevenzione dell'amiloidosi AA nei pazienti con febbre mediterranea familiare, nella regressione della nefropatia non nefrosica e nella prevenzione della recidiva di malattia dopo trapianto di rene. Per le forme resistenti alla colchicina, è raccomandato come terapia di seconda linea l'uso di farmaci biologici come l'anakinra, antagonista del recettore IL-1 ricombinante, o canakinumab, anticorpo monoclonale mirato all'IL-1 β . Per i pazienti con amiloidosi AA di eziologia incerta, anakinra ha dimostrato di essere sicuro ed efficace. Il trapianto di rene rappresenta un'opzione terapeutica per i pazienti con coinvolgimento renale,

sebbene la sopravvivenza dei pazienti con amiloidosi AA sia ridotta a causa di un più alto tasso di complicanze infettive e cardiovascolari post-trapianto (32).

Amiloidosi cardiaca: diagnosi e terapia

La diagnosi di amiloidosi si basa su un alto indice di sospetto clinico. Tuttavia, la malattia è spesso asintomatica fino agli stadi più avanzati e, quando presenti, i sintomi possono essere molto aspecifici. La diagnosi di amiloidosi di solito richiede la conferma istologica della deposizione di amiloide attraverso la colorazione rosso Congo, che produce la tipica birifrangenza verde quando osservata alla luce polarizzata. Gli aspirati di grasso addominale rappresentano una valida alternativa alle biopsie d'organo più invasive, permettendo di identificare i depositi di amiloide nel 60-80% dei pazienti con amiloidosi AL, meno nel caso dell'amiloidosi da TTR (33). La biopsia endomiocardica fornisce l'evidenza diagnostica definitiva nella cardiomiopatia amiloide se la diagnosi non è confermata dalla biopsia di un altro tessuto.

La mancanza di sintomi o la presenza di sintomi aspecifici fa sì che il sospetto di amiloidosi cardiaca venga spesso avanzato solo in seguito all'esecuzione di indagini strumentali. L'ispessimento della parete ventricolare secondaria all'infiltrazione miocardica determina la riduzione dell'ampiezza dei voltaggi QRS all'elettrocardiogramma, spesso associata a deviazione dell'asse elettrico cardiaco. La valutazione ecocardiografica con doppler tissutale, strain rate e speckle tracking, con il tipico pattern dell'apical sparing, ovvero una spiccata riduzione del valore dello strain longitudinale nei segmenti basali e medi del ventricolo sinistro rispetto ai segmenti apicali, sono emersi come strumenti clinici utili per l'identificazione dell'amiloidosi cardiaca e possono aiutare nella diagnosi differenziale con altre cause di ispessimento di parete, come ipertensione e cardiomiopatia ipertrofica. La risonanza magnetica cardiaca permette un'accurata caratterizzazione tissutale e le più recenti tecniche di valutazione del "late gadolinium enhancement" forniscono immagini utili per la diagnosi di amiloidosi cardiaca AL e ATTR con un'eccellente accuratezza diagnostica (34). L'infiltrazione amiloide provoca infatti l'espansione dello spazio extracellulare, che può essere visualizzato con il "late gadolinium enhancement" e misurato con la mappatura T1, fornendo un utile strumento per monitorare l'accumulo di amiloide nel cuore e la risposta al trattamento (35). Tuttavia, l'ecocardiogramma e la risonanza magnetica cardiaca possono supportare la diagnosi di cardiomiopatia infiltrativa, ma non possono diagnosticare l'amiloidosi o distinguere i tipi di amiloidosi. La scintigrafia con tracciante osseo ($^{99m}\text{Tc-DPD}$) è recentemente emersa come strumento altamente sensibile per l'identificazione dell'amiloidosi

cardiaca da TTR, positiva in presenza di evidenza scintigrafica di assorbimento cardiaco di grado 2 o 3 del tracciante osseo. In pazienti con insufficienza cardiaca associata ad ecocardiogramma o risonanza magnetica cardiaca compatibile con amiloidosi, la scintigrafia positiva permette di diagnosticare l'amiloidosi cardiaca ATTR (29), anche in assenza di prove istologiche, dopo aver escluso la diagnosi di amiloidosi AL (assenza di un'immunoglobulina monoclonale rilevabile nel sangue e nelle urine). La conferma diagnostica definitiva del sospetto clinico di amiloidosi si basa sulla dimostrazione istologica della presenza dei depositi attraverso una biopsia del grasso periombelicale, cardiaca, o più raramente delle ghiandole salivari.

I metodi di tipizzazione dei depositi di amiloide differiscono nella loro sensibilità e specificità. Il metodo più affidabile è l'analisi proteomica basata sulla spettrometria di massa (MS), che identifica direttamente la proteina nel deposito di amiloide. La MS è in grado di tipizzare l'amiloide con una sensibilità e specificità vicine al 100%, così da essere considerata il gold standard per la tipizzazione (36). Tuttavia, la MS è un metodo costoso, non ampiamente disponibile, e richiede attrezzature di laboratorio specializzate. Le tecniche di immunoistochimica o di immunofluorescenza, sebbene meno sensibili e specifiche della MS, sono validi metodi alternativi di tipizzazione, specialmente se eseguiti in laboratori esperti (37, 38).

La caratterizzazione tissutale dei depositi e la definizione del tipo di amiloidosi sono necessari per l'impostazione della gestione terapeutica adeguata.

Nel caso dell'amiloidosi AL il cardine del trattamento è la chemioterapia diretta verso la popolazione plasmacellulare clonale responsabile. Bortezomib, un inibitore del proteasoma usato in monoterapia o in terapia di combinazione, è emerso come il trattamento di prima linea più utilizzato nell'amiloidosi AL, associato a tassi di risposta ematologica fino al 90% (39). Melfalan ad alte dosi con trapianto di cellule staminali autologhe è associato a remissioni più durature, ma l'alto rischio di mortalità legato al trattamento, soprattutto nei pazienti anziani con coinvolgimento cardiaco o nervoso autonomo avanzato, richiede una rigorosa selezione dei pazienti (40).

Nel caso dell'amiloidosi da TTR ereditaria il trapianto di fegato, che sostituisce la sede primaria di produzione della proteina mutante, può essere efficace soprattutto in alcune mutazioni della TTR e se eseguito all'esordio della malattia, in presenza di neuropatia precoce e senza coinvolgimento cardiaco. L'amiloidosi cardiaca presente al momento del trapianto di fegato purtroppo continua a progredire inesorabilmente nella maggior parte dei casi.

Numerosi farmaci hanno dimostrato di stabilizzare i tetrameri di TTR che circolano nel plasma, inibendo il misfolding della TTR e la formazione di fibrille e rallentando effettivamente la progressione della malattia neuropatica nell'amiloidosi ATTR (41, 42). Il silenziamento del gene TTR, utilizzando RNA anti-senso o "RNA interference" per bloccare la traduzione del TTR in mRNA, come nel caso del patisiran e dell'inetersen, riduce efficacemente i livelli sierici di TTR e migliora gli esiti neurologici in circa il 50% dei pazienti (43, 44).

Nel caso dell'ATTRwt, il trapianto di fegato non rappresenta un'efficace terapia, ma la stabilizzazione della TTR utilizzando il tafamidis in pazienti con cardiomiopatia amiloide legata alla TTR, ha dimostrato di ridurre la mortalità per tutte le cause e le ospedalizzazioni per cause cardiovascolari (42), offrendo un'importante possibilità terapeutica.

Stenosi aortica e Amiloidosi

Evidenze sempre più crescenti suggeriscono un'elevata prevalenza di amiloidosi cardiaca nei pazienti con SA, variabile dall'8% al 16%. Due recenti metanalisi confermano questa prevalenza consistente di amiloidosi cardiaca nell'ambito della SA, ma confermano anche il dato dell'incertezza sul tasso reale di prevalenza, riportando rispettivamente una prevalenza del 9% e del 14% (45, 46). Tale variabilità probabilmente origina dal numero limitato di pazienti arruolati nella maggior parte degli studi condotti, e da alcune caratteristiche specifiche delle popolazioni di studio, quali genere e età. Nei prossimi anni ci si aspetta un importante ulteriore aumento della prevalenza, favorito dall'invecchiamento della popolazione e dal miglioramento e la diffusione dell'algoritmo diagnostico (28, 29).

Tipicamente l'amiloidosi cardiaca si manifesta insieme a un ampio numero di segni e sintomi extracardiaci, definiti "red flags", che possono guidare il sospetto diagnostico. Tuttavia, l'identificazione delle "red flags" di amiloidosi cardiaca nei pazienti con SA rappresenta spesso una sfida diagnostica in quanto le due malattie condividono diversi aspetti clinico-strumentali. Diversi studi hanno analizzato le caratteristiche cliniche di pazienti con concomitante SA e amiloidosi cardiaca e hanno concluso che tali pazienti presentano manifestazioni di malattia più avanzata, come livelli più elevati di frammento N-terminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP), maggior grado di ipertrofia ventricolare sinistra e disfunzione diastolica avanzata (47, 48). Alcuni autori hanno proposto uno score clinico (score RAISE) per predire e standardizzare la valutazione di amiloidosi cardiaca nella SA. Tale score è basato su diversi parametri: rimodellamento ventricolare sinistro (ipertrofia/disfunzione diastolica), età, danno miocardico (troponina ad alta sensibilità),

coinvolgimento sistemico (tunnel carpale) ed alterazioni elettriche (bassi voltaggi/blocco di branca all'elettrocardiogramma). A ciascun parametro veniva assegnato un peso diverso e i pazienti con un punteggio >2 sono stati identificati come pazienti a rischio che necessitano di un ulteriore screening mediante scintigrafia ossea e valutazione delle catene leggere (49).

Il crescente interesse della comunità scientifica nei confronti di questa malattia ha portato alla pubblicazione di una recente metanalisi (50) che ha riportato una prevalenza di amiloidosi cardiaca nei pazienti con SA del 15.4%, e addirittura maggiore, del 18.2% nei pazienti ultraottantenni. I risultati di tale metanalisi hanno suggerito che diverse specifiche caratteristiche cliniche, elettrocardiografiche ed ecocardiografiche possono essere considerate "red flags" di amiloidosi cardiaca nei pazienti con SA. I pazienti con entrambe le diagnosi erano più spesso maschi, avevano un indice di massa corporea inferiore, erano più inclini ad avere un fenotipo di SA del tipo low flow-low gradient con frazione di eiezione ventricolare sinistra ridotta, avevano peggiore funzione diastolica e un maggior grado di ipertrofia del setto interventricolare. Livelli più elevati di NT-proBNP e troponina ad alta sensibilità e specifiche alterazioni elettrocardiografiche, quali un più basso indice di Sokolow-Lyon, una maggiore durata del QRS e una maggiore prevalenza di blocco di branca destra, sono risultati significativamente associati con la presenza di amiloidosi cardiaca nei pazienti con SA (50).

Risultati contrastanti riguardano l'outcome dei pazienti con concomitante amiloidosi cardiaca e SA. Alcuni studi attribuiscono all'amiloidosi cardiaca un ruolo prognostico importante nel contesto della SA (49, 51, 52). Per contro, altri autori hanno mostrato che la diagnosi di amiloidosi cardiaca non ha un impatto significativo sulla prognosi dei pazienti con SA (53-55). Tuttavia, l'ultima metanalisi effettuata, che ha incluso una popolazione complessiva di 1398 pazienti, 178 affetti sia da SA che da amiloidosi cardiaca, ha confermato l'evidenza di una prognosi peggiore nei pazienti con entrambe le patologie, riportando una mortalità significativamente più alta ad un follow-up di 19 mesi nel gruppo di pazienti con amiloidosi cardiaca e SA rispetto al gruppo di pazienti con sola SA (50). Nonostante l'impatto prognostico negativo della diagnosi di amiloidosi cardiaca, questo studio ha confermato i benefici della terapia con sostituzione valvolare rispetto alla terapia medica anche nei pazienti con entrambe le patologie: pazienti sottoposti a SVA o a TAVI avevano un rischio di mortalità complessivo simile, ma inferiore rispetto ai pazienti trattati con terapia medica.

Stenosi aortica e deposizione isolata valvolare di amiloide

In un'alta percentuale di pazienti con SA (16%) è stata riportata la presenza di amiloidosi da TTR con prevalente localizzazione miocardica (47), associata ad un fenotipo di SA low flow-low gradient con ridotta frazione di eiezione.

La deposizione di amiloide è stata descritta anche all'interno di lembi di valvole aortiche stenotiche rimosse chirurgicamente (56), tuttavia, non sono stati chiariti la sua caratterizzazione e il suo significato clinico. Non è inoltre chiaro se la presenza dei depositi di amiloide nella valvola aortica sia il risultato di un "coinvolgimento valvolare" nel contesto dell'amiloidosi miocardica/sistemica o sia un fenomeno distinto.

Il riscontro di amiloide nella valvola anche in assenza di coinvolgimento miocardico suggerisce la possibilità di una deposizione isolata di amiloide a livello valvolare. Tale entità sembra essere molto frequente, ancor più rispetto al coinvolgimento concomitante di valvola e tessuto miocardico (57). La storia naturale della SA è caratterizzata da uno stato pro-infiammatorio sin dalle prime fasi della malattia (58) e le citochine prodotte all'interno della valvola promuovono la differenziazione delle cellule interstiziali, processo che è alla base della calcificazione dei lembi (60, 61). La presenza di SA potrebbe essa stessa favorire la formazione e la deposizione di fibrille amiloidi. L'elevato stress meccanico e l'infiammazione locale, caratterizzanti tipicamente la SA, potrebbero favorire il processo amiloidogenico e giustificare l'elevata prevalenza dell'accumulo di fibrille amiloide all'interno delle valvole stenotiche espantate.

Gli autori che hanno tipizzato la deposizione di amiloide nella valvola aortica (57) hanno identificato TTR in circa il 57% delle valvole stenotiche con depositi di amiloide, in pazienti senza deposizione di amiloide nel miocardio. Tale dato suggerisce la possibilità di altre proteine amiloidogeniche potenzialmente responsabili di deposizione isolata valvolare di amiloide.

Dunque, la deposizione di amiloide all'interno delle valvole aortiche stenotiche appare frequente anche in assenza di amiloidosi cardiaca. Tuttavia, nonostante gli enormi avanzamenti della ricerca relativa alla deposizione di amiloide nel contesto della SA, vi sono una serie di aspetti non del tutto chiari: quali sono le proteine che oltre alla TTR possono concorrere alla deposizione di fibrille amiloidi all'interno delle valvole aortiche stenotiche; quale è il significato clinico della deposizione di amiloide valvolare isolata e il suo potenziale ruolo nella fisiopatologia della SA. Dunque, col presente studio, ci proponiamo di chiarire il tasso di deposizione di amiloide valvolare isolata e il suo potenziale significato clinico e fisiopatologico nella SA.

METODI

Popolazione di studio.

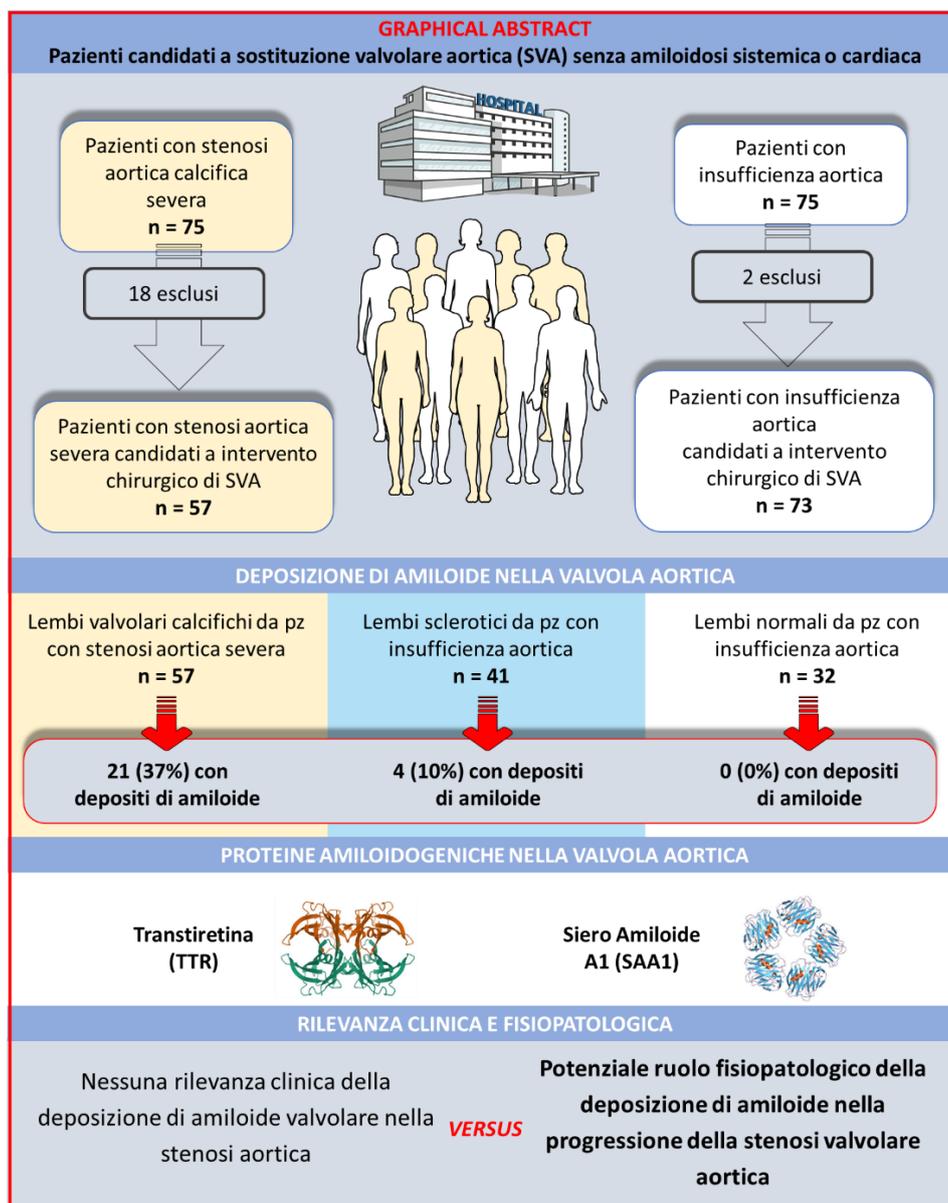
Abbiamo arruolato prospetticamente 150 pazienti valutati per intervento di SVA, di cui 75 pazienti con SA calcifica severa e 75 pazienti con insufficienza aortica. Sono stati esclusi pazienti candidati a TAVI, pazienti con malattia valvolare reumatica, con amiloidosi sistemica sospetta o confermata, pazienti con malattia infiammatoria/autoimmune cronica, o con anamnesi di endocardite infettiva. Sulla base di tali criteri di esclusione, sono stati esclusi 15 pazienti con SA selezionati per TAVI, 3 pazienti con SA per sospetta storia di endocardite pregressa e 2 pazienti con insufficienza aortica per malattia reumatica. Pertanto, la popolazione finale dello studio è risultata composta da 130 pazienti, 57 con SA e 73 con insufficienza aortica. Dei 73 pazienti con insufficienza aortica, 41 pazienti avevano sclerosi valvolare aortica all'ecocardiografia, definita come calcificazione valvolare aortica e ispessimento in assenza di stenosi, mentre 32 pazienti, senza sclerosi valvolare, sono stati utilizzati come controlli.

Valutazione della popolazione di studio

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a un esame clinico ed ecocardiografico completo (Vivid E9, GE) prima dell'intervento cardiocirurgico. In tutti i pazienti è stato effettuato il dosaggio delle catene leggere libere sieriche per escludere la diagnosi di amiloidosi AL. Inoltre, abbiamo effettuato in tutti i pazienti un ulteriore prelievo di sangue venoso: il campione è stato centrifugato e il siero è stato conservato a -80 ° C e quindi sottoposto a screening per la concentrazione dei livelli circolanti di SAA utilizzando un kit ELISA (Novus Biologicals, USA). L'intervento di SVA è stato eseguito attraverso sternotomia mediana standard e bypass cardiopolmonare.

Durante l'intervento cardiocirurgico di SVA, le valvole aortiche espianate sono state raccolte e quindi analizzate mediante istologia, immunohistochimica e analisi proteomica. In tutti i pazienti con evidenza di deposizione di amiloide valvolare all'istologia, è stata esclusa la presenza di amiloidosi cardiaca da TTR mediante scintigrafia con ^{99m}Tc -HMDP (61). In tutti i pazienti è stato condotto un follow-up periodico e sono stati raccolti i dati sulla sopravvivenza dopo SVA.

Graphical abstract. *Popolazione dello studio e i principali risultati dello studio.*



Analisi istologica e immunoistochimica

Il tessuto fresco dei lembi valvolari è stato sezionato trasversalmente, fissato in formalina neutralizzata al 10% e successivamente incluso in paraffina. Le valvole ricche di depositi di calcio sono state pretrattate con una soluzione disincrostante (Bioptica ref. 05-03004Q) per 12h. Le sezioni FFPE (4 µm) sono state analizzate istopatologicamente e immunoistochimicamente. Per le analisi patologiche, le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina, con colorazione tricromica di Mallory e colorazione rosso Congo.

Al microscopio ottico, la fibrosi e la deposizione di calcio sono state valutate e classificate come 0, 1+, 2+ e 3+, rispettivamente quando assenti o osservate in <10%, 10-50% e nel >50% del campione. La colorazione rosso Congo è stata utilizzata per valutare la presenza di deposizione di amiloide, considerata positiva quando i depositi inizialmente visualizzati al microscopio ottico mostravano la tipica birifrangenza verde quando visualizzati alla luce polarizzata.

All'immunoistochimica abbiamo valutato la presenza delle proteine amiloidogeniche suggerite dalla proteomica nelle valvole aortiche espianate. I vetrini sono stati incubati in soluzione di recupero dell'antigene (Target Retrieval Solution Citrate [pH 6], Dako) a 110 °C per 10 minuti. Dopo il recupero dell'antigene, i vetrini sono stati lasciati raffreddare. I vetrini sono stati risciacquati con TBS e la perossidasi endogena è stata inattivata con perossido di idrogeno al 3%. Dopo il blocco proteico (BSA 5% in PBS 1×), i vetrini sono stati incubati con anticorpo primario a 4°C durante la notte. Le sezioni sono state incubate con anticorpi secondari IgG biotinilati anti-topo per 40 minuti. L'immunoreattività è stata visualizzata mediante kit di reagenti del complesso avidina-biotina-perossidasi (Novocastra, Newcastle, UK) come substrato cromogenico. Infine, le sezioni sono state debolmente controcolorate con ematossilina e montate. I risultati dell'immunoistochimica sono stati considerati positivi solo se l'immunoreattività si osservava all'interno delle aree di deposizione di amiloide.

Analisi proteomica

Due valvole aortiche stenotiche positive per la deposizione di amiloide all'istologia e quattro valvole aortiche negative sono state frantumate in azoto liquido. I campioni sono stati sospesi in un volume minimo di EDTA 0,5 M durante la notte a 4°C, quindi sono stati lisati in sodio dodecilsolfato al 3% (SDS, Biorad) mediante frantumazione e quindi sonicazione con 3 impulsi di 3 secondi per 5 cicli. Ogni estratto proteico è stato quantificato mediante il dosaggio dell'acido bicinconinico (Thermo Fisher). L'equivalente di 50 µg di estratto proteico per ciascun campione è stato digerito dalla tripsina su filtri S-Trap (62). Le miscele peptidiche sono state analizzate da un LTQ Orbitrap XL (ThermoScientific, Waltham, MA) accoppiato a un sistema nanoLC (nanoEasy II). I campioni sono stati frazionati su una colonna capillare di fase inversa C18 (200 mm, 75 µm, 5 µm) con una portata di 250 nl/min, utilizzando un gradiente lineare di eluente B (0,2% acido formico in acetonitrile al 95%) in A (0,2% di acido formico e 2% di acetonitrile in acqua di grado LC-MS, Merck) dal 5% al 60% in 270 minuti. Le analisi MS/MS sono state eseguite utilizzando la modalità Data-Dependent Acquisition: una scansione MS (intervallo di massa da 400 a 1800 m/z) è stata seguita da scansioni MS/MS dei dieci ioni più abbondanti, applicando una finestra di esclusione dinamica di 40 secondi. Tutti i campioni sono stati eseguiti in duplicati tecnici. I dati ottenuti da nanoLC-MS/MS sono stati analizzati con MaxQuant 1.5.2 integrato con il motore di ricerca Andromeda, per l'identificazione delle proteine nel database Homo Sapiens Uniprot, utilizzando i seguenti parametri: minimo 4 peptidi, almeno 2 unici; è stato applicato un tasso di false discovery FDR<0.01. La quantificazione delle proteine è stata eseguita utilizzando almeno 4 rasoï non modificati + peptidi unici (63). L'analisi LFQ è stata impiegata per valutare la significatività statistica delle intensità MaxQuant LFQ per ciascun campione (64). La significatività statistica è stata determinata dal test non appaiato con un cut-off FDR di 0,05; I valori LFQ zero sono stati corretti in base al tipo di imputazione MinDet che stimava il

valore minimo come il q-esimo quantile (default $q = 0,01$) dei valori osservati in quel campione (65). Per confermare i dati della spettrometria di massa, il campione valvolare positivo alla SAA1 è stato ulteriormente analizzato con anticorpo anti-SAA1 mediante saggio western blot.

Isolamento e coltura delle cellule interstiziali valvolari aortiche

In 12 valvole aortiche, 6 valvole stenotiche e 6 valvole di controllo, è stato effettuato l'isolamento delle VICs implementando un metodo precedentemente descritto (66). I lembi valvolari aortici sono stati incubati per 20 minuti a 37°C in 2 mg/mL di collagenasi di tipo II (Worthington Biochemical Corp.) nel mezzo di Eagle modificato di Advanced Dulbecco (Ad DMEM, Life Technologies) contenente il 10% di siero bovino fetale (FBS β), l'1% di penicillina, l'1% di streptomina e l'1% di L-glutamina. Una volta rimosse le cellule endoteliali, i lembi sono stati digeriti meccanicamente utilizzando un bisturi e quindi incubati per almeno 4 ore in 2 mg/ml di collagenasi di tipo II a 37°C. Alla fine dell'incubazione, le VICs sono state opportunamente seminate. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule in coltura tra il loro secondo e quinto passaggio. L'IL-1 β (PeproTech) a 15 ng/ml è stata utilizzata come stimolo infiammatorio ed è stata aggiunta al mezzo cellulare a giorni alterni per 7 giorni.

Estrazione dell'RNA e qPCR

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita dalle VICs utilizzando il Total RNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek Corp). L'RNA è stato quantificato utilizzando Nanodrop e utilizzato per l'amplificazione PCR in due fasi con il kit di reagenti di trascrizione inversa TaqMan (Life Technologies). L'RNA totale (1 μ g) è stato convertito in cDNA. La Real Time PCR (qPCR) è stata eseguita su ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems), secondo le istruzioni del produttore e le analisi sono state eseguite utilizzando il software SDS2.4 (Life Technologies).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando la piattaforma statistica R (vers. 4.0.1). Le caratteristiche del campione sono state riportate utilizzando statistiche descrittive standard: media \pm deviazione standard con range in caso di variabili numeriche e frequenze assolute e percentuali in caso di variabili categoriche. Le variabili numeriche con una distribuzione altamente asimmetrica sono state descritte utilizzando la mediana, l'intervallo interquartile [25°-75° percentile] e range. I confronti tra gruppi erano basati sul T test o sul test U di Mann-Whitney in caso di variabili numeriche e sul test del chi quadrato o sul test esatto di Fisher in caso di variabile categorica. Per il confronto di più di due gruppi, sono stati utilizzati il test ANOVA o Kruskal-Wallis come statistiche omnibus seguite dal test T o dal test U di Mann-Whitney. Le differenze aggiustate tra i gruppi sono state stimate utilizzando la regressione mediana. Il test dei ranghi logaritmici è stato utilizzato per l'analisi degli eventi nel tempo e le probabilità di sopravvivenza sono state stimate utilizzando il metodo Kaplan-Meier. In tutte le analisi sono stati considerati statisticamente significativi valori di p inferiori a 0.05.

RISULTATI

Valutazione clinica e istologica

Le caratteristiche cliniche ed ecocardiografiche dei pazienti con SA sono riportate nella Tabella 1. Il gruppo con sclerosi valvolare era composto da 41 pazienti (32% femmine) con un'età media di 68 ± 7 anni. Il gruppo di controllo era composto da 32 pazienti (44% femmine) con un'età media di 57 ± 14 anni. In tutti i pazienti, non sono stati riscontrati segni di amiloidosi sistemica e il test del rapporto delle catene leggere libere delle immunoglobuline sieriche ha mostrato un valore normale.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche ed ecocardiografiche dei pazienti con SA

Età (anni)	68.9±7.8 (50 to 84)
Sesso femminile (n, %)	30 (72.6)
BMI (kg/m²)	27.3±3.6 (16.4 to 35.3)
Ipertensione (n, %)	51 (89.5)
Diabete (n, %)	17 (29.8)
Abitudine tabagica (n, %)	
Mai	36 (63.2)
Corrente	15 (26.3)
Pregressa	6 (10.5)
Dislipidemia (n, %)	29 (50.9)
Beta-bloccanti (n, %)	35 (64.8)
Calcio antagonisti (n, %)	10 (18.5)
Ace-inibitori/sartani (n, %)	34 (61.8)
Statine (n, %)	28 (50.9)
Antiaggreganti piastrinici (n, %)	39 (70.9)
Frazione di eiezione LV (%)	62.4±9.5 (37 to 80)
E/A	0.7 [0.6; 0.9] (0.3 to 3.8)
E/E'	13.1±5.2 (3.7 to 29)
Area valvola aortica (cm²)	0.8±0.2 (0.4 to 1.2)
Gradiente medio (mmHg)	47.7 [38.8; 55] (22.3 to 90)
LVEDD (mm)	46.9±5.9 (38 to 58)
LVESD (mm)	28.1±7 (12 to 46)
LV massa (g)	204±61.4 (101 to 365.4)
LV massa indicizzata (g/m²)	116.3±46.6 (1.1 to 261.8)
Stroke volume index (ml/m²)	49.8±13.8 (23.2 to 78)

SA= stenosi aortica; BMI=indice di massa corporea; LV=ventricolo sinistro; LVEDD=diametro telediastolico del ventricolo sinistro; LVESD= diametro telesistolico del ventricolo sinistro.

Le valvole aortiche espantate durante l'intervento cardiocirurgico di SVA sono state valutate per la deposizione di amiloide all'istologia (Figura 1). La microscopia ottica ha rivelato depositi di amiloide in 21 valvole con SA su 57 (37%), in 4 valvole sclerotiche su 41 (10%) e in nessuna delle valvole aortiche espantate dai controlli. La presenza di deposizione di amiloide valvolare è risultata associata a maggior grado sia di fibrosi che di calcificazione valvolare (p=0,0082 e p<0,0001, rispettivamente). In tutti i pazienti con deposizione di

amiloide valvolare la scintigrafia ossea è risultata negativa per l'assorbimento di tracciante a livello miocardico, escludendo così un'amiloidosi cardiaca da TTR.

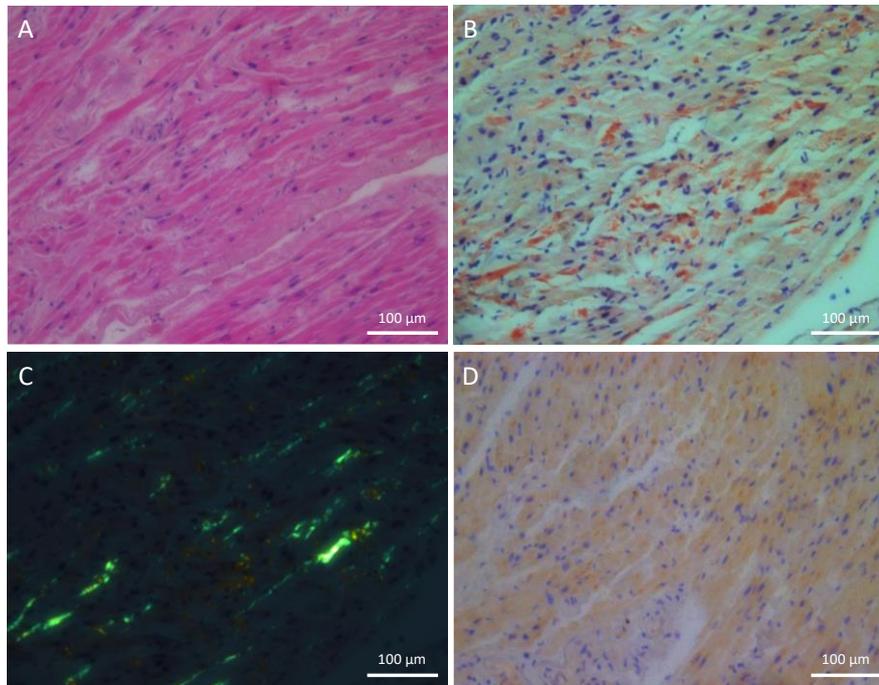


Figura 1. Valvola aortica: analisi istologica e immunoistochimica A) *Colorazione ematossilina e eosina di valvola aortica stenotica; B) Depositi di amiloide alla colorazione Rosso Congo; C) Birifrangenza verde mela al microscopio a luce polarizzata nella stessa area; D) Colorazione positiva di SAA1 all'immunoistochimica.*

Per studiare il potenziale significato clinico della deposizione di amiloide valvolare isolata nella SA, la popolazione dello studio è stata suddivisa in due gruppi in base alla presenza di depositi di amiloide nella valvola aortica. Tra i due gruppi, non sono state evidenziate differenze significative nei parametri clinici ed ecocardiografici (Tabella 2).

Tabella 2. Caratteristiche cliniche ed ecocardiografiche dei pazienti con SA con e senza deposizione di amiloide valvolare

	No depositi valvolari di amiloide	Deposizione valvolare di amiloide	P
Età (anni)	69.4+-7.1 (52 to 84)	67.9+-8.9 (50 to 82)	0,504
Sesso femminile (n, %)	22 (61.1)	8 (38.1)	0,16
BMI (kg/m²)	27.3+-3.6 (16.4 to 35.3)	27.3+-3.8 (19.2 to 34.5)	0,998
Ipertensione (n, %)	32 (88.9)	19 (90.5)	1
Diabete (n, %)	10 (27.8)	7 (33.3)	0,887
Abitudine tabagica (n, %)			0,838
Mai	23 (63.9)	13 (61.9)	
Corrente	10 (27.8)	5 (23.8)	
Pregressa	3 (8.3)	3 (14.3)	
Dislipidemia (n, %)	17 (47.2)	12 (57.1)	0,654
LV Frazione di eiezione (%)	62.5+-8.9 (40 to 75)	62.2+-10.8 (37 to 80)	0,912
E/A	0.7 [0.6 ; 1] (0.3 to 3.8)	0.8 [0.6 ; 0.9] (0.5 to 1.1)	0,928
E/E'	13.4+-5.8 (5 to 29)	12.5+-4.2 (3.7 to 20)	0,544
AV area (cm²)	0.8+-0.2 (0.4 to 1.2)	0.7+-0.2 (0.5 to 1)	0,347
Gradiente medio (mmHg)	45.5 [38 ; 54.5] (22.3 to 90)	52.4 [46 ; 56] (37 to 77.9)	0,201
LVEDD (mm)	46.9+-6.1 (38 to 58)	46.9+-5.7 (38 to 56)	0,998
LVESD (mm)	28.4+-6.9 (18 to 46)	27.8+-7.4 (12 to 39)	0,78
LV massa (g)	200.2+-66.8 (101 to 365.4)	210+-52.7 (137 to 304)	0,582
Stroke volume index (ml/m²)	49.6 [37 ; 64] (23.2 to 78)	46.7 [40.1 ; 50.5] (38.7 to 62)	0,541

SA= stenosi aortica; AV=valvola aortica; BMI=indice di massa corporea; LV=ventricolo sinistro; LVEDD=diametro telediastolico del ventricolo sinistro; LVESD= diametro telesistolico del ventricolo sinistro.

A 48 mesi di follow-up, non è stata riscontrata alcuna differenza nel tasso di sopravvivenza tra i pazienti con SA con e senza deposizione di amiloide nella valvola (Figura 2). Inoltre, anche valutando separatamente i dati sulla mortalità precoce (entro 1 mese dalla cardiocirurgia), non sono state riscontrate differenze di sopravvivenza tra i pazienti con SA con e senza deposizione di amiloide valvolare.

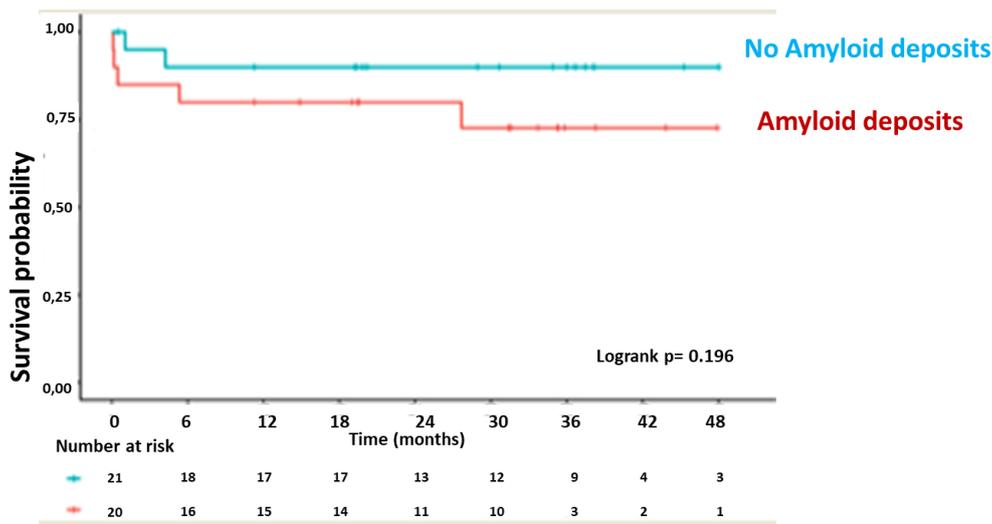


Figura 2. Probabilità di sopravvivenza dei pazienti con SA con e senza deposizione isolata di amiloide valvolare. *Non sono state osservate differenze di sopravvivenza tra pazienti con e senza deposizione di amiloide valvolare isolata.*

Analisi proteomica

L'analisi proteomica con un approccio comparativo è stata utilizzata per identificare le possibili proteine accumulate negli aggregati amiloidi. In particolare, sono stati analizzati i lembi di due valvole aortiche stenotiche positive per la deposizione di amiloide all'istologia (AV amiloide-1 e AV amiloide-2) e di 4 valvole aortiche stenotiche negative per la deposizione di amiloide (usate come controlli).

L'AV amiloide-1 ha mostrato 36 proteine up-regolate ($\log_2FC > 0,5$) e 34 down-regolate ($\log_2FC < -0,5$) rispetto ai controlli, mentre nell'AV amiloide-2, 87 proteine sono state trovate up-regolate e 31 down-regolate (Figura 3).

L'analisi della sovra-rappresentazione di tutte le proteine up- e down-regolate per ciascun campione valvolare è stata effettuata con il database del Reactome pathways e i pathways più significativi sono riportati in base ai valori FDR (Figura 4).

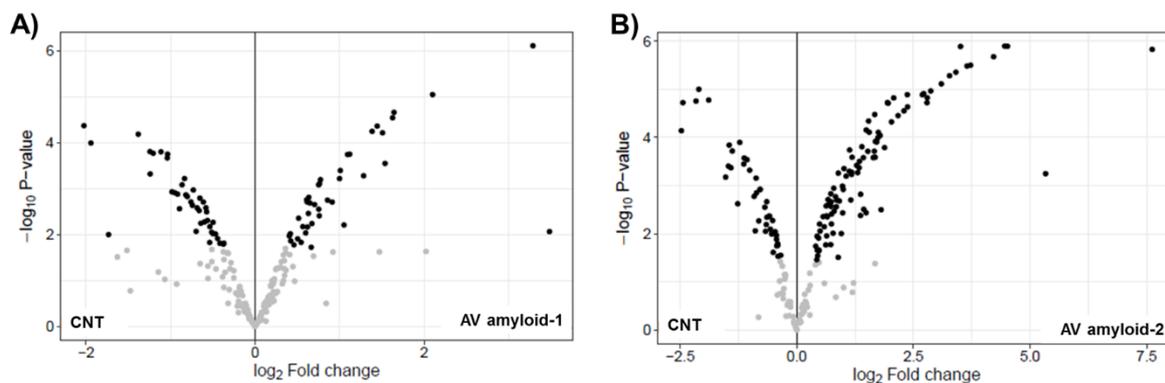


Figura 3. Rappresentazione del numero di proteine up- e down-regolate nei campioni di valvola aortica positive all'amiloide. Rappresentazione Volcano Plot dei dati LFQ-analyst delle proteine identificate dal software MaxQuant. Le proteine statisticamente significative (indicate in nero) avevano un cut-off FDR corretto di Benjamini-Hochberg di 0,05. A) AV-amiloide 1; B) AV-amiloide 2.

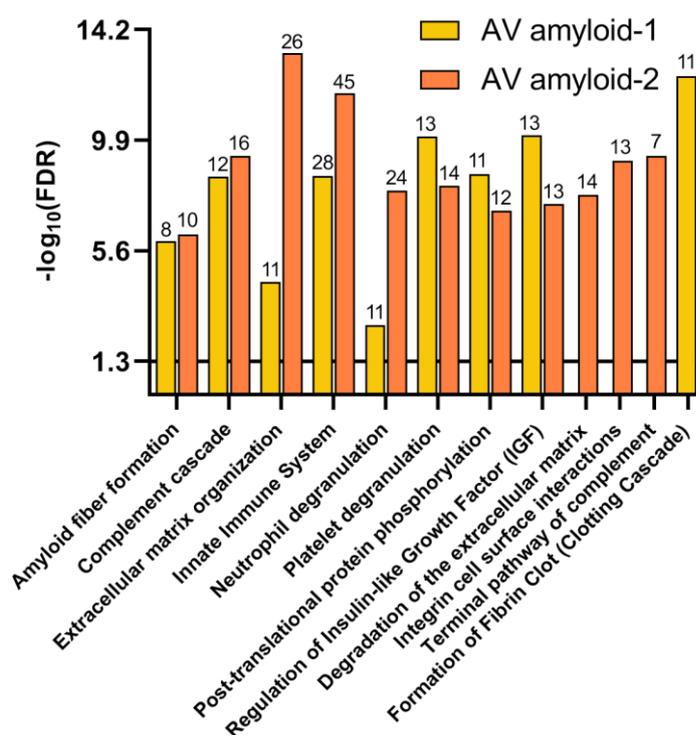


Figura 4. Reactome pathways: Analisi su proteine statisticamente up-e down-regolate. Ogni pathway funzionale è riportato secondo $-\log_{10}(FDR)$. Le barre gialle e arancioni si

riferiscono rispettivamente ai campioni di #AV-amiloide-1 e #AV-amiloide-2. Viene riportato anche il numero di geni associati a ciascun pathway e la soglia FDR.

Per identificare le possibili proteine coinvolte nel processo amiloidogenico, ci siamo concentrati su quelle già incluse nella categoria di formazione di fibrille amiloidi (Figura 5).

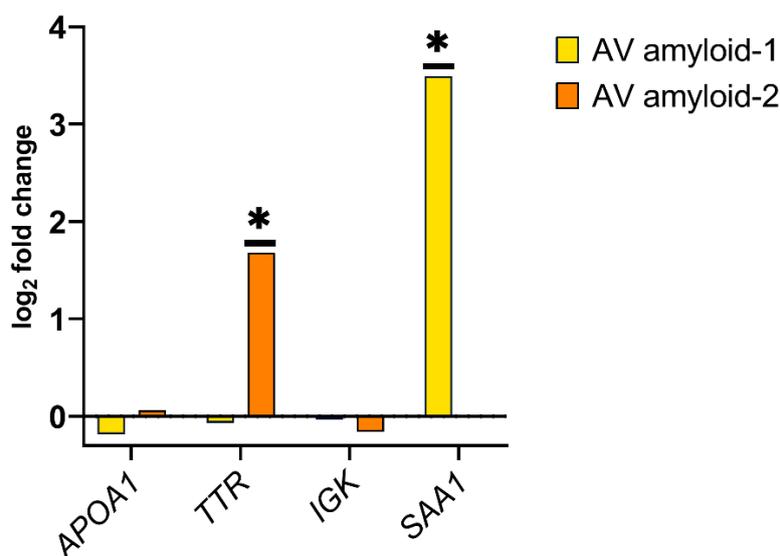


Figura 5. Set rappresentativo di proteine up-regolate e correlate alla formazione di fibre amiloidi. Nel grafico, le proteine sono riportate in base ai loro Log₂FC. Le barre gialle e arancioni si riferiscono rispettivamente ai campioni di AV-amiloide-1 e AV-amiloide-2.

Tra le proteine note per essere coinvolte nell'amiloidosi cardiaca, la TTR è risultata particolarmente espressa nell' AVamiloide-2. Nell' AV amiloide-1 è invece risultata particolarmente espressa la SAA1. Questo risultato è stato confermato anche all'analisi western blot, sebbene poche evidenze supportino il potenziale coinvolgimento di SAA1 come potenziale proteina amiloidogenica nella SA, specialmente in assenza di manifestazioni sistemiche.

Immunoistochimica

Sulla base dei risultati della proteomica, si è proceduto a ricercare la presenza di SAA1 e/o TTR in tutti i campioni valvolari aortici positivi all'amiloide. All'immunoistochimica, la proteina SAA1 è stata identificata in 8 su 25 (32%) valvole con deposizione di amiloide, mentre la TTR è stata identificata in 5 su 25 (20%) valvole aortiche con deposizione di amiloide. In 10 valvole l'immunocolorazione è risultata positiva sia per SAA1 che per TTR. Nel complesso, la colorazione TTR è risultata positiva in quasi il 60% e la colorazione SAA1 in quasi il 72% delle valvole aortiche con deposizione di amiloide. Solo in 2 campioni valvolari positivi, sia la colorazione SAA1 che TTR sono risultate negative. Per validare questi risultati, l'immunoistochimica è stata eseguita anche in un sottogruppo di valvole aortiche senza deposizione di amiloide e le immunocolorazioni si sono confermate negative sia per TTR che per SAA1 in tutti i campioni esaminati.

Livelli circolanti di SAA1

Dato che l'amiloidosi da SAA1 è generalmente sistemica ed è il risultato di elevati livelli circolanti di SAA1, promossi dall'infiammazione, abbiamo misurato i livelli circolanti di SAA1 nei pazienti con SA, sclerosi valvolare e controlli.

I valori dei livelli circolanti di SAA1 sono risultati nel range di normalità (67) nei tre gruppi (controlli = 321,8 [191,1; 439,0] ng/ml; sclerosi = 270,3 [111,9; 453,6] ng/ml; SA = 207,1 [111,9; 346,3] ng/ml) e non sono state evidenziate differenze significative tra i gruppi (controlli vs sclerosi $p=0,99$; controlli vs SA $p=0,3309$; sclerosi vs SA $p=0,5041$). Anche tra i pazienti con SA con e senza deposizione di amiloide nella valvola, non sono state osservate differenze nei livelli circolanti di SAA1 (266,1 [164,8; 381,1] ng/ml e 141,1 [86,59; 331,5] ng/ml rispettivamente, $p=0,0835$).

Produzione di SAA1 dalle cellule valvolari interstiziali

Data la normalità dei valori circolanti di SAA1, abbiamo ipotizzato che SAA1 potesse essere prodotta localmente, all'interno dei lembi valvolari aortici. Per verificare questa ipotesi, abbiamo valutato la capacità delle VICs aortiche di produrre SAA1 se esposti a insulti infiammatori. In particolare, le VICs umane isolate da 6 valvole aortiche di controllo e 6 valvole aortiche stenotiche sono state trattate con IL-1 β (Figura 6).

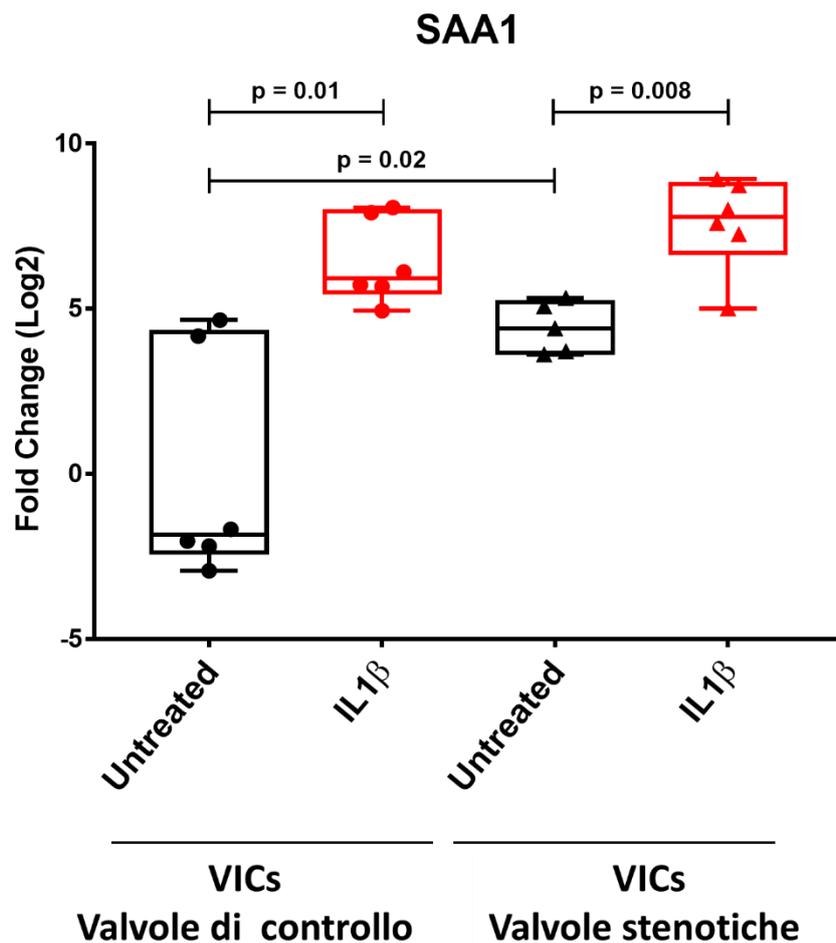


Figura 6. Espressione genica di SAA1 in cellule interstiziali valvolari umane isolate.

Grafici Box-Whisker che rappresentano l'espressione genica di SAA1 in cellule interstiziali valvolari (VICs) isolate da valvole aortiche umane di controllo (n=6) e da valvole aortiche umane stenotiche (n=6) in condizioni basali (untreated) e dopo stimolazione con IL-1 β .

Sia nelle valvole di controllo che in quelle stenotiche, le VICs hanno mostrato di esprimere l'mRNA di SAA1; tuttavia, le VICs delle valvole stenotiche esprimevano SAA1, in condizioni basali, in misura maggiore rispetto alle VICs di controllo ($+4,4\pm 0,3$ volte, $p=0,02$). Inoltre, dopo esposizione allo stimolo pro-infiammatorio, le VICs delle valvole di controllo e stenotiche hanno mostrato un aumento simile dell'espressione genica di SAA1 ($+6,4\pm 0,5$ volte $p=0,01$ e $+7,6\pm 0,6$ volte $p=0,008$, rispettivamente).

DISCUSSIONE

I risultati del presente studio indicano che, nei pazienti con SA, la deposizione isolata di amiloide nella valvola aortica è frequente, non ha un significato clinico rilevante ma può avere un ruolo importante nella fisiopatologia della SA.

Nella popolazione di studio, rappresentata da pazienti con SA sottoposti a screening per amiloidosi cardiaca o sistemica, l'analisi istologica ha confermato un alto tasso di deposizione di amiloide valvolare isolata nelle valvole aortiche asportate. I nostri dati suggeriscono anche che i depositi di amiloide possono essere presenti sin dallo stadio della sclerosi valvolare, mentre non sono presenti nelle valvole aortiche di controllo. Ad oggi, questo rappresenta il primo studio ad esaminare la deposizione di amiloide isolata in valvole aortiche stenotiche, sclerotiche e di controllo. La sclerosi valvolare potrebbe giustificare i pochi casi di rilevazione di amiloide all'interno di valvole aortiche insufficienti descritti in studi precedenti (56). Prove recenti (57) hanno riportato che quasi il 60% delle valvole aortiche con deposizione di amiloide risultano positive all'immunocolorazione per TTR. I dati del presente studio sono in linea con questa evidenza, ma suggeriscono anche un'alta percentuale (72%) di positività per SAA1. La SAA è una proteina di fase acuta, rilasciata in risposta all'infiammazione. La

produzione di SAA è stimolata da citochine proinfiammatorie, come IL-6, IL-1 e fattore di crescita trasformante β (68, 70). In letteratura è stata descritta l'amiloidosi sistemica da SAA associata alla SA nel contesto dell'infiammazione sistemica (70). Tuttavia, nella nostra popolazione i valori dei livelli circolanti di SAA1 erano nel range di normalità e non sono state osservate differenze nei pazienti con e senza deposizione di amiloide nella valvola aortica. Questo è il primo studio che suggerisce una deposizione locale, valvolare, di SAA1-amiloide in assenza di alti livelli circolanti di SAA1. Tra le proteine comunemente associate all'amiloidosi cardiaca, l'analisi proteomica comparativa di valvole con e senza deposizione di amiloide ha evidenziato l'iper-espressione di TTR e SAA1, suggerendole come principali potenziali proteine amiloidogeniche.

Una volta stabilita la presenza di amiloide nelle valvole aortiche stenotiche, abbiamo studiato il potenziale ruolo clinico e fisiopatologico della deposizione valvolare isolata di amiloide nella SA. Nella nostra popolazione, abbiamo osservato che tra i pazienti con e senza deposizione di amiloide valvolare non c'erano differenze nei parametri demografici, clinici ed ecocardiografici. Inoltre, la presenza di deposizione valvolare di amiloide non ha avuto alcun impatto sulla sopravvivenza dei pazienti dopo SVA. Questi risultati suggeriscono che la deposizione isolata valvolare di amiloide, in pazienti con SA calcifica severa, non avrebbe una rilevanza clinica. In questa prospettiva, la deposizione di amiloide valvolare isolata costituirebbe uno scenario clinico completamente diverso dall'amiloidosi cardiaca, che invece impatta fortemente sull'outcome del paziente con SA (50).

D'altra parte, i nostri risultati sollevano nuove importanti domande sul possibile ruolo della deposizione di amiloide nella fisiopatologia della SA. All'analisi proteomica, la maggior parte delle proteine che sono risultate up e down regolate nelle valvole amiloide-positive, oltre che al pathway della formazione di fibrille amiloidi, appartengono ai pathways della cascata del complemento, della degranulazione piastrinica e dell'attivazione e organizzazione della

matrice extracellulare, tutte note per essere associate alla SA. Studi precedenti hanno suggerito che la deposizione di amiloide all'interno di valvole aortiche stenotiche promuove la mineralizzazione (71). In accordo con queste evidenze, all'analisi istologica abbiamo ritrovato che il riscontro di amiloide nei lembi valvolari aortici è associata a gradi più elevati di fibrosi e deposizione di calcio valvolare. Anche il riscontro di depositi amiloidi nelle valvole sclerotiche, ma non nelle valvole di controllo, rafforza ulteriormente l'ipotesi di un legame tra deposizione di amiloide e calcificazione dei lembi valvolari.

E' ormai ampiamente riconosciuto che la SA rappresenta un processo di tipo aterosclerotico promosso dall'infiammazione locale all'interno dei lembi valvolari fin dalla fase sclerotica della malattia (72). L'attivazione delle vie di segnalazione infiammatorie, inclusa quella dell'IL-1 β , è coinvolta nel differenziamento delle VICs, nel rimodellamento della matrice valvolare e nella calcificazione (59, 60, 73). Nel complesso, la valvola aortica calcifica costituisce un sito di elevato stress meccanico e di infiammazione prolungata, due fattori promotori dell'amiloidogenesi (74-76). Abbiamo testato l'ipotesi di un aumento della produzione locale di SAA1, valutando l'espressione dell'mRNA di SAA1 nelle VICs. Le VICs delle valvole stenotiche esprimevano SAA1, in condizioni basali, in misura maggiore rispetto alle VICs delle valvole di controllo. Inoltre, quando *in-vitro* abbiamo esposto le VICs all'IL-1 β , abbiamo osservato un marcato aumento della produzione di SAA1-mRNA. Tali osservazioni permettono di ipotizzare che l'infiammazione locale può innescare l'iper-espressione delle proteine amiloidogeniche.

Limitazioni dello studio

Attualmente, l'immunoistochimica è tra i metodi più pratici e veloci per l'identificazione delle proteine amiloidogeniche e non richiede attrezzature speciali, ma le proteine rilevabili sono limitate per la disponibilità di specifiche serie di anticorpi. Inoltre, gli anticorpi per

immunoistochimica disponibili in commercio sono dotati di una sensibilità e/o specificità non sempre sufficiente a garantire una tipizzazione accurata dell'amiloidosi. Nonostante i limiti metodologici dell'immunoistochimica, nel presente lavoro abbiamo ridotto al minimo le possibilità di errore considerando le immunocolorazioni positive solo quando abbiamo osservato la colorazione specifica all'interno delle aree istologiche di deposizione di amiloide. Inoltre, l'analisi immunoistochimica è stata guidata dai risultati della proteomica.

Nel presente studio, è stata osservata un'associazione tra deposizione valvolare di amiloide e calcificazione dei lembi valvolari aortici. Tuttavia, l'assenza di fibrille amiloidi in alcune valvole aortiche stenotiche suggerisce che le fibrille amiloidi non rappresentano un elemento necessario per il processo di calcificazione valvolare e sono dunque richiesti ulteriori studi per valutare se la deposizione valvolare di amiloide possa avere un ruolo nella progressione della SA.

CONCLUSIONI

In conclusione, la deposizione isolata valvolare di amiloide nella SA può essere considerata un processo distinto dall'amiloidosi cardiaca, senza alcun significato clinico rilevante ma con un potenziale e importante ruolo fisiopatologico. I risultati del presente studio supportano l'ipotesi che l'infiammazione locale possa innescare l'espressione di proteine amiloidogeniche all'interno dei lembi valvolari aortici. In generale, l'analisi istologica delle valvole aortiche espianate dovrebbe essere incoraggiata per poter indagare ulteriormente il ruolo della deposizione di valvolare isolata di amiloide nella SA.

BIBLIOGRAFIA

1. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, et al. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet*. 2006 Sep 16;368(9540):1005-11. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69208-8.
2. Osnabrugge RL, Mylotte D, Head SJ, et al. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:1002-12. Doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.015.
3. Iung B, Baron G, Butchart EG, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003 Jul;24(13):1231-43. doi: 10.1016/s0195-668x(03)00201-x.
4. Thaden JJ, Nkomo VT, Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis. *Circulation* 2014;56:565-71. Doi: 10.1016/j.pcad.2014.02.006.
5. Otto CM. Timing of aortic valve surgery. *Heart* 2000;84:211-8. Doi:10.1136/heart.84.2.211.
6. Cho KI, Sakuma I, Sohn IS, et al. Inflammatory and metabolic mechanisms underlying the calcific aortic valve disease. *Atherosclerosis* 2018;277:60-5. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.029.
7. Della-Morte D, Palmirotta R, Rehni AK, et al. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of thiazolidinediones: role in diabetes and cardiovascular risk factors. *Pharmacogenomics* 2014;15:2063-82. Doi: 10.2217/pgs.14.162.
8. Akahori H, Tsujino T, Masuyama T, et al. Mechanisms of aortic stenosis. *J Cardiol*. 2018 Mar;71(3):215-220. doi: 10.1016/j.jjcc.2017.11.007.
9. Kronenberg F, Mora S, Stroes ESG, et al. Lipoprotein(a) in atherosclerotic cardiovascular disease and aortic stenosis: a European Atherosclerosis Society consensus statement. *Eur Heart J*. 2022 Oct 14;43(39):3925-3946. doi: 10.1093/eurheartj/ehac361.
10. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: a review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: calcific

- aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011;124:1783-91. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767.
11. Helske S, Lindstedt KA, Laine M, et al. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Nov 2;44(9):1859-66. doi: 10.1016/j.jacc.2004.07.054.
 12. Alfieri CM, Cheek J, Chakraborty S, et al. Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. *Dev Biol* 2010;338:127-35. Doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.030.
 13. Izquierdo-Gómez MM, Hernández-Betancor I, García-Niebla J, et al. Valve calcification in aortic stenosis: etiology and diagnostic imaging techniques. *Biomed Res Int* 2017;2017:5178631. Doi: 10.1155/2017/5178631.
 14. Parisi V, Leosco D, Ferro G, et al. The lipid theory in the pathogenesis of calcific aortic stenosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015;25:519-25. Doi: 10.1016/j.numecd.2015.02.001.
 15. Wirrig EE, Hinton RB, Yutzey KE. Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:561-9. Doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.12.005.
 16. Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:828-34. Doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.008.
 17. Pfister R, Michels G, Sharp SJ, et al. Inverse association between bone mineral density and risk of Aortic Stenosis in men and women in EPIC-Norfolk prospective study. *Int J Cardiol* 2015;178:29-30. Doi: 10.1016/j.ijcard.2014.10.065.
 18. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Jan;36(1):57-66. doi: 10.1016/j.yjmcc.2003.09.015.
 19. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998 May 1;12(9):1260-8. doi: 10.1101/gad.12.9.1260.
 20. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*. 1999 Dec;84(3):413-28. doi: 10.1016/s0163-7258(99)00045-5.

21. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2005 Jun 9;352(23):2389-97. doi: 10.1056/NEJMoa043876.
22. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, et al. Effect of lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation* 2010;121:306-14. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.900027.
23. Rosseb AB, Pedersen TR, Boman K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *Engl J Med* 2008;359:1343-56. Doi: 10.1056/NEJMoa0804602.
24. Rosenhek R, Rader F, Loho N, et al. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1291-5. doi: 10.1161/01.CIR.0000140723.15274.53.
25. Lachmann HJ, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Apr;6(2):214-20. doi: 10.1016/j.coph.2005.10.005.
26. Falk RH, Dubrey SW. Amyloid heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Jan-Feb;52(4):347-61. doi: 10.1016/j.pcad.2009.11.007.
27. Fontana M, Banyersad SM, Treibel TA, et al. Differential Myocyte Responses in Patients with Cardiac Transthyretin Amyloidosis and Light-Chain Amyloidosis: A Cardiac MR Imaging Study. *Radiology*. 2015 Nov;277(2):388-97. doi: 10.1148/radiol.2015141744.
28. Fontana M, Banyersad SM, Treibel TA, et al. Native T1 mapping in transthyretin amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014 Feb;7(2):157-65. doi: 10.1016/j.jcmg.2013.10.008.
29. Gillmore JD, Maurer MS, Falk RH, et al. Nonbiopsy Diagnosis of Cardiac Transthyretin Amyloidosis. *Circulation*. 2016 Jun 14;133(24):2404-12. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021612.
30. Brunger AF, Nienhuis HLA, Bijzet J, Hazenberg BPC. Causes of AA amyloidosis: a systematic review. *Amyloid*. 2020 Mar;27(1):1-12. doi: 10.1080/13506129.2019.1693359.

31. Lachmann HJ, Goodman HJ, Gilbertson JA, Gallimore JR, Sabin CA, Gillmore JD, Hawkins PN. Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *N Engl J Med*. 2007 Jun 7;356(23):2361-71. doi: 10.1056/NEJMoa070265.
32. Muchtar E, Dispenzieri A, Magen H, et al. Systemic amyloidosis from A (AA) to T (ATTR): a review. *J Intern Med*. 2021 Mar;289(3):268-292. doi: 10.1111/joim.13169.
33. Guy CD, Jones CK. Abdominal fat pad aspiration biopsy for tissue confirmation of systemic amyloidosis: specificity, positive predictive value, and diagnostic pitfalls. *Diagn Cytopathol*. 2001 Mar;24(3):181-5. doi: 10.1002/1097-0339(200103)24:3<181::aid-dc1037>3.0.co;2-d.
34. Fontana M, Chung R, Hawkins PN, et al. Cardiovascular magnetic resonance for amyloidosis. *Heart Fail Rev*. 2015 Mar;20(2):133-44. doi: 10.1007/s10741-014-9470-7.
35. Banypersad SM, Sado DM, Flett AS, et al. Quantification of myocardial extracellular volume fraction in systemic AL amyloidosis: an equilibrium contrast cardiovascular magnetic resonance study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013 Jan 1;6(1):34-9. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.112.978627.
36. Vrana JA, Gamez JD, Madden BJ, et al. Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood*. 2009 Dec 3;114(24):4957-9. doi: 10.1182/blood-2009-07-230722.
37. Kholová I, Niessen HW. Amyloid in the cardiovascular system: a review. *J Clin Pathol*. 2005 Feb;58(2):125-33. doi: 10.1136/jcp.2004.017293.
38. Collins AB, Smith RN, Stone JR. Classification of amyloid deposits in diagnostic cardiac specimens by immunofluorescence. *Cardiovasc Pathol*. 2009 Jul-Aug;18(4):205-16. doi: 10.1016/j.carpath.2008.05.004.
39. Venner CP, Lane T, Foard D, et al. Cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone therapy in AL amyloidosis is associated with high clonal response rates and prolonged progression-free survival. *Blood*. 2012 May 10;119(19):4387-90. doi: 10.1182/blood-2011-10-388462.
40. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Refinement in patient selection to reduce treatment-related mortality from autologous stem cell transplantation in amyloidosis. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Apr;48(4):557-61. doi: 10.1038/bmt.2012.170.

41. Berk JL, Suhr OB, Obici L, et al: Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 310: 2658–2667, 2013. doi: 10.1001/jama.2013.283815.
42. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, et al. ATTR-ACT Study Investigators. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2018 Sep 13;379(11):1007-1016. doi: 10.1056/NEJMoa1805689.
43. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018 Jul 5;379(1):11-21. doi: 10.1056/NEJMoa1716153.
44. Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, et al. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018 Jul 5;379(1):22-31. doi: 10.1056/NEJMoa1716793.
45. Sin-Ying Ho J, Kor Q, Kong WK, et al. Prevalence and outcomes of concomitant cardiac amyloidosis and aortic stenosis: a systematic review and meta-analysis. *Hellenic J Cardiol*. (2021) 29:S1109-9666(21)00181-0. doi: 10.1016/j.hjc.2021.11.001.
46. Garcia-Pavia P, Rapezzi C, Adler Y, et al. Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. (2021) 42:1554–68. doi: 10.1093/eurheartj/ehab072.
47. Castaño A, Narotsky DL, Hamid N, et al. Unveiling transthyretin cardiac amyloidosis and its predictors among elderly patients with severe aortic stenosis undergoing transcatheter aortic valve replacement. *Eur Heart J*. (2017) 38:2879–87. doi: 10.1093/eurheartj/ehx350.
48. Ricci F, Ceriello L, Khanji MY, et al. Prognostic significance of cardiac amyloidosis in patients with aortic stenosis: a systematic review and meta-analysis. *JACC Cardiovasc Imag*. (2021) 14:293–5. doi: 10.1016/j.jcmg.2020.07.011.
49. Nitsche C, Scully PR, Patel KP, et al. Prevalence and outcomes of concomitant aortic stenosis and cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*. (2021) 77:128–39. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.006.
50. Myasoedova VA, Conte M, Valerio V, et al. Red Flags, Prognostic Impact, and Management of Patients With Cardiac Amyloidosis and Aortic Valve Stenosis: A

Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Mar 9;9:858281. doi: 10.3389/fmed.2022.858281.

51. Cavalcante JL, Rijal S, Abdelkarim I, et al. Cardiac amyloidosis is prevalent in older patients with aortic stenosis and carries worse prognosis. *J Cardiovasc Magn Reson*. (2017) 19:98. doi: 10.1186/s12968-017-0415-x.
52. Treibel TA, Fontana M, Gilbertson JA, et al. Occult transthyretin cardiac amyloid in severe calcific aortic stenosis: prevalence and prognosis in patients undergoing surgical aortic valve replacement. *Circ Cardiovasc Imag*. (2016) 9:e005066. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.116.005066.
53. Nitsche C, Aschauer S, Kammerlander AA, et al. Light-chain and transthyretin cardiac amyloidosis in severe aortic stenosis: prevalence, screening possibilities, and outcome. *Eur J Heart Fail*. (2020) 22:1852–62. doi: 10.1002/ejhf.1756.
54. Rosenblum H, Masri A, Narotsky DL, et al. Unveiling outcomes in coexisting severe aortic stenosis and transthyretin cardiac amyloidosis. *Eur J Heart Fail*. (2021) 23:250–8. doi: 10.1002/ejhf.1974.
55. Scully PR, Patel KP, Treibel TA, et al. Prevalence and outcome of dual aortic stenosis and cardiac amyloid pathology in patients referred for transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J*. (2020) 41:2759–67. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa170.
56. Kristen AV, Schnabel PA, Winter B, et al. High prevalence of amyloid in 150 surgically removed heart valves--a comparison of histological and clinical data reveals a correlation to atheroinflammatory conditions. *Cardiovasc Pathol*. 2010 Jul-Aug;19(4):228-35. doi: 10.1016/j.carpath.2009.04.005.
57. Singal AK, Bansal R, Singh A, et al. Concomitant Transthyretin Amyloidosis and Severe Aortic Stenosis in Elderly Indian Population: A Pilot Study. *JACC CardioOncol*. 2021 Oct 19;3(4):565-576. doi: 10.1016/j.jaccao.2021.08.008.
58. Chandra HR, Goldstein JA, Choudhary N, et al. Adverse outcome in aortic sclerosis is associated with coronary artery disease and inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jan 21;43(2):169-75. doi: 10.1016/j.jacc.2003.08.036.
59. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve

- stenosis. *Atherosclerosis*. 2003 Oct;170(2):205-11. doi: 10.1016/s0021-9150(03)00284-3.
60. Nadlonek N, Lee JH, Reece TB, et al. Interleukin-1 Beta induces an inflammatory phenotype in human aortic valve interstitial cells through nuclear factor kappa Beta. *Ann Thorac Surg*. 2013 Jul;96(1):155-62. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.04.013.
61. Dorbala S, Ando Y, Bokhari S, et al. ASNC/AHA/ASE/EANM/HFSA/ISA/SCMR/SNMMI Expert Consensus Recommendations for Multimodality Imaging in Cardiac Amyloidosis: Part 1 of 2-Evidence Base and Standardized Methods of Imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2021 Jul;14(7):e000029. doi: 10.1161/HCI.0000000000000029.
62. Palinski W, Monti M, Camerlingo R, et al. Lysosome purinergic receptor P2X4 regulates neoangiogenesis induced by microvesicles from sarcoma patients. *Cell Death Dis*. 2021 Aug 17;12(9):797. doi: 10.1038/s41419-021-04069-w.
63. Cozzolino F, Landolfi A, Iacobucci I, et al. New label-free methods for protein relative quantification applied to the investigation of an animal model of Huntington Disease. *PLoS One*. 2020 Sep 4;15(9):e0238037. doi: 10.1371/journal.pone.0238037.
64. Shah AD, Goode RJA, Huang C, et al. LFQ-Analyst: An Easy-To-Use Interactive Web Platform To Analyze and Visualize Label-Free Proteomics Data Preprocessed with MaxQuant. *J Proteome Res*. 2020 Jan 3;19(1):204-211. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00496.
65. Trautwein-Schult A, Maaß S, Plate K, et al. A Metabolic Labeling Strategy for Relative Protein Quantification in *Clostridioides difficile*. *Front Microbiol*. 2018 Oct 16;9:2371. doi: 10.3389/fmicb.2018.02371.
66. Perrot N, Valerio V, Moschetta D, et al. Genetic and In Vitro Inhibition of PCSK9 and Calcific Aortic Valve Stenosis. *JACC Basic Transl Sci*. 2020 Jul 1;5(7):649-661. doi: 10.1016/j.jacbts.2020.05.004.
67. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, et al. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*. 2001 Jul 7;358(9275):24-9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05252-1.
68. Sack GH Jr. Serum amyloid A - a review. *Mol Med*. 2018 Aug 30;24(1):46. doi: 10.1186/s10020-018-0047-0.

69. Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol*. 2000 Jan;7(1):64-9. doi: 10.1097/00062752-200001000-00012.
70. Millucci L, Ghezzi L, Paccagnini E, et al. Amyloidosis, inflammation, and oxidative stress in the heart of an alkaptonuric patient. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:258471. doi: 10.1155/2014/258471.
71. Audet A, Côté N, Couture C, et al. Amyloid substance within stenotic aortic valves promotes mineralization. *Histopathology*. 2012 Oct;61(4):610-9. doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04265.x.
72. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 3;2:16006. doi: 10.1038/nrdp.2016.6.
73. Greenberg HZE, Zhao G, Shah AM, et al. Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications. *Cardiovasc Res*. 2022 May 6;118(6):1433-1451. doi: 10.1093/cvr/cvab142.
74. Gonçalves NP, Teixeira-Coelho M, Saraiva MJ. Protective role of anakinra against transthyretin-mediated axonal loss and cell death in a mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015 Mar;74(3):203-17. doi: 10.1097/NEN.000000000000164.
75. Zhao L, Buxbaum JN, Reixach N. Age-related oxidative modifications of transthyretin modulate its amyloidogenicity. *Biochemistry*. 2013 Mar 19;52(11):1913-26. doi: 10.1021/bi301313b.
76. Levy Nogueira M, Epelbaum S, Steyaert JM, et al. Mechanical stress models of Alzheimer's disease pathology. *Alzheimers Dement*. 2016 Mar;12(3):324-33. doi: 10.1016/j.jalz.2015.10.005.