UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE (LM-9)

RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEL PROCESSO DI INFIAMMAZIONE ASSOCIATO A STENOSI AORTICA VALVOLARE

Relatore

Marcello Pinti

Laureanda

Miriam Lauria

Correlatore

Alejandra Pera

Anno accademico

2025/2026

INDICE

1. Introduzione e obiettivi

1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

1.2 Stenosi Aortica

1.3 Struttura e organizzazione della valvola aortica

1.4 Patogenesi della malattia calcifica della valvola aortica e analogie con l'aterosclerosi

1.5 Biomarcatori e tecniche emergenti per la valutazione della stenosi aortica

1.6 Infiammazione e citochine infiammatorie

2. Il Sistema Immunitario Adattativo e il differenziamento dei linfociti T

2.1 Immunosenescenza

2.2 Rilevanza delle sottopopolazioni T nella stenosi aortica

3. Obiettivi dello studio e approccio sperimentale

3.1 Selezione dei soggetti e raccolta dei campioni

3.2 Processamento dei campioni

3.3 Acquisizione citometrica e pannello anticorpale

3.4 Analisi dei dati

4. Risultati e confronto tra pazienti AS e controlli HD

4.1 Discussione dei principali risultati immunofenotipici

4.2 Limitazioni studio

4.3 Conclusioni

ABSTRACT

La stenosi aortica (Aortic Stenosis, AS) è stata a lungo considerata una conseguenza prevalentemente degenerativa del fisiologico processo di invecchiamento. Attualmente è invece riconosciuta come una patologia valvolare multifattoriale, caratterizzata da processi attivi di infiammazione, rimodellamento tissutale e calcificazione, nei quali anche il sistema immunitario svolge un ruolo rilevante. In particolare, il coinvolgimento dell'immunità adattativa e dei linfociti T ha suscitato crescente interesse in relazione ai fenomeni di immunosenescenza, associati a modificazioni nella composizione e nello stato di differenziamento delle popolazioni T circolanti.

Il presente studio ha avuto l'obiettivo di caratterizzare il profilo immunofenotipico dei linfociti T circolanti in pazienti affetti da stenosi aortica e in soggetti sani. La coorte analizzata comprendeva 20 soggetti, suddivisi in 10 pazienti AS e 10 healthy donors (HD). I campioni di sangue periferico sono stati sottoposti a colorazione con anticorpi monoclonali fluorescenti e analizzati mediante citometria a flusso multiparametrica utilizzando un citometro BD LSRFortessa SORP a 20 parametri.

I dati citofluorimetrici sono stati successivamente analizzati mediante la piattaforma Floreada.io, facendo riferimento, per gli aspetti pertinenti alla caratterizzazione immunofenotipica, all'approccio descritto da Domínguez-del-Castillo et al. (2025).

L'analisi ha previsto l'identificazione delle popolazioni T CD4+ e CD8+ e la caratterizzazione del loro stato maturativo mediante l'espressione combinata di CD45RA e CCR7, distinguendo le sottopopolazioni naïve (TN), central memory (TCM), effector memory (TEM) ed effector memory re-expressing CD45RA (TEMRA). Parallelamente, l'espressione combinata di CD28 e CD57 è stata utilizzata per caratterizzare fenotipi associati a stadi avanzati di differenziamento, con particolare attenzione alla popolazione CD28−CD57+.

Il confronto descrittivo ha mostrato nei pazienti AS una maggiore presenza del compartimento CD8+ e un profilo più orientato verso fenotipi T altamente differenziati, con particolare evidenza per la popolazione CD8+ CD28−CD57+. Le cellule CD8+ TEMRA erano ampiamente presenti in entrambi i gruppi, ma mostravano frequenze più elevate nei pazienti AS.

Nel complesso, i risultati suggeriscono nei pazienti con stenosi aortica un rimodellamento del compartimento T periferico verso stadi avanzati di differenziamento, soprattutto a livello delle cellule CD8+, compatibile con caratteristiche immunofenotipiche associate all'immunosenescenza. Tali osservazioni supportano un possibile coinvolgimento dell'immunità adattativa nella stenosi aortica.

1. INTRODUZIONE E OBIETTIVI

Con il termine di malattia calcifica della valvola aortica (CAVD), si intende un ampio e progressivo spettro patologico. L'evoluzione clinica è legata alle prime alterazioni microscopiche riguardanti la biologia cellulare dei lembi valvolari fino ad arrivare alla calcificazione terminale, la quale termina per ostruire fisicamente l'efflusso del sangue dal ventricolo sinistro. [1]

I primi segni macroscopici si manifestano in genere con piccoli depositi di calcio o con un ispessimento circoscritto delle cuspidi. In questa fase, che prende il nome di sclerosi valvolare aortica, la valvola riesce ancora a funzionare normalmente, ma i meccanismi molecolari e biologici alla base del danno patologico si sono quasi certamente attivati in modo silente molto tempo prima. Con il progredire della malattia, l'ispessimento del tessuto diventa sempre più marcato andando incontro a un profondo rimodellamento, in cui si assiste alla formazione di noduli calcifici, che possono assumere le caratteristiche di una vera e propria ossificazione tissutale e in cui può verificarsi anche l'attivazione del processo di neoangiogenesi, con lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni localizzati specialmente sul versante aortico della valvola [1]. Raggiunto lo stadio terminale della patologia, ovvero il quadro clinico della stenosi aortica calcifica vera e propria, l'architettura delle cuspidi risulta ormai compromessa dalla presenza di voluminose masse nodulari. Queste formazioni irrigidiscono la struttura della valvola aortica impedendone la corretta apertura e ostacolando, in modo severo, il normale flusso ematico [1].

In passato, questa patologia è stata interpretata come un inevitabile processo fisiologico, legato all' invecchiamento e alle continue sollecitazioni emodinamiche subite dalle cuspidi. Attualmente, le evidenze dimostrano che l'insulto iniziale a carico dell'endotelio valvolare è di natura multifattoriale. In particolare il danno endoteliale rappresenta uno dei primi eventi coinvolti nelle fasi iniziali del processo patologico e può essere favorito da diversi fattori, tra cui l'infiltrazione lipidica e il rilascio di mediatori pro-infiammatori all'interno del tessuto. La ridotta biodisponibilità di ossido nitrico e l'aumento dello stress ossidativo contribuiscono ulteriormente alla disfunzione endoteliale, favorendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'ossidazione dei lipidi e il mantenimento di un microambiente pro-infiammatorio [2]. Parallelamente anche la matrice extracellulare subisce una profonda riorganizzazione, causata da un'alterazione del bilancio tra gli enzimi preposti alla sua degradazione (le metalloproteasi, MMP) e i loro inibitori specifici (TIMP) compromettendo l'architettura originaria della valvola e aprendo così la strada alla fibrosi tissutale. È proprio l'unione di tutti questi eventi come lo stress meccanico, infiammazione e alterazioni strutturali, a guidare l'evoluzione del danno fino alla comparsa delle lesioni fibro-calcifiche tipiche della stenosi aortica [2].

Pertanto, è evidente come tale processo patologico sia dinamico e guidato dalla complessa interazione tra accumulo lipidico, stress ossidativo, infiammazione sistemica e transizione delle cellule valvolari verso un fenotipo di tipo osteogenico. All'interno di questa intricata rete patogenetica, anche il sistema immunitario adattativo ha un ruolo rilevante, infatti la ricerca clinica sta rivolgendo un interesse sempre più marcato in merito alle alterazioni a carico delle popolazioni linfocitarie T, potenzialmente implicate nel mantenimento dell'infiammazione cronica e nella progressione del rimodellamento patologico della valvola aortica [2].

L'infiammazione cronica, sistemica di basso grado è definita 'inflammaging' e si verifica con l'avanzare dell'età. E' caratterizzata da un aumento dei marcatori infiammatori nel sangue e questo processo è strettamente legato all'immunosenescenza e contribuisce al rischio di sviluppare patologie associate all'età. Tra i meccanismi implicati rientra l'accumulo di macromolecole danneggiate e detriti cellulari, che possono mantenere attiva la risposta infiammatoria e favorire il danno tissutale. Anche le alterazioni delle popolazioni di linfociti T e la stimolazione antigenica persistente contribuiscono all'acquisizione di un fenotipo secretorio associato alla senescenza, rilasciando mediatori pro-infiammatori che alimentano ulteriormente l'inflammaging [3]. Inoltre con l'invecchiamento, i compartimenti dei linfociti T CD4+ e CD8+ si modificano in modo diverso. Alcune evidenze suggeriscono che i meccanismi omeostatici preservino maggiormente il compartimento CD4+, mentre le alterazioni legate all'età risultano più marcate nei linfociti T CD8+ [3].

In particolare, le cellule CD8+ altamente differenziate mostrano frequentemente una perdita delle molecole costimolatorie CD27 e CD28, accompagnata dall'espressione di CD57 e, in alcune sottopopolazioni, dalla riespressione di CD45RA [4]. Anche l'espansione dei linfociti CD4+ con attività citotossica e privi di CD28 (popolazioni T con fenotipo CD28nullCD57+) è stato collegato a una maggiore risposta infiammatoria ed anche a un incremento dello stress ossidativo, che determinano l'insorgenza e progressione delle lesioni aterosclerotiche ma è anche strettamente legato alle malattie cardiovascolari [5].

Alla luce di tali evidenze, il presente studio si propone alla caratterizzazione del profilo immunofenotipico delle popolazioni T circolanti nei pazienti affetti da stenosi aortica e nel controllo sano, con particolare attenzione allo stato maturativo e ai fenotipi associati a un differenziamento avanzato. Per cui verrà proposto il confronto descrittivo tra i due gruppi facendo riferimento all'approccio descritto nell'articolo di Domínguez-del-Castillo et al. (2025).

1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

La stenosi aortica (AS) è la valvulopatia più comune nei paesi sviluppati e la sua prevalenza aumenta significativamente con l'avanzare dell'età. Una meta-analisi di studi di popolazione ha stimato una prevalenza complessiva della stenosi aortica del 12,4% negli individui di età uguale o superiore a 75 anni, mentre la prevalenza della forma severa è risultata pari al 3,4% [7]. Conoscere l'entità della malattia nei pazienti aiuta a pianificare le risorse sanitarie necessarie per il trattamento, anche in relazione al numero di pazienti potenzialmente candidabili alla sostituzione valvolare aortica transcatetere (TAVR). Rispetto la sostituzione valvolare chirurgica (SAVR), la TAVR può offrire un trattamento sicuro ed efficace nei pazienti opportunamente selezionati [7].

Le fasi iniziali della malattia sono rappresentate dalla sclerosi valvolare aortica (ASc), la quale è asintomatica e viene identificata mediante ecocardiografia o tomografia computerizzata (TC). All'esame ecocardiografico si osserva un ispessimento focale o diffuso dei lembi valvolari e si valuta proprio l'apertura dei lembi, che può rimanere relativamente conservata, senza alterazioni emodinamiche significative, con una velocità massima transvalvolare inferiore a 2–2,5 m/s, secondo i criteri adottati [9]. In alcuni soggetti, la sclerosi valvolare aortica può progredire verso una stenosi aortica, nella quale le alterazioni dei lembi ne limitano l'apertura, ostacolando il passaggio del sangue dal ventricolo sinistro all'aorta [9].

Diversi studi epidemiologici hanno evidenziato vari fattori di rischio, associati alla CAVD, alcuni dei quali non modificabili e altri potenzialmente modificabili [8].

I principali fattori di rischio sono:

- Età avanzata
  L'età rimane un forte fattore di rischio CAVD, infatti nel Cardiovascular Health Study (CHS), ogni incremento di dieci anni di età è risultato associato a un raddoppio delle odds di malattia valvolare aortica calcifica [8].

- Sesso maschile
  Nel Framingham Offspring Study (FOS), il sesso maschile è risultato associato a maggiori odds di presenza di calcificazione valvolare aortica rispetto al sesso femminile, con un incremento del 56% (OR 1,56) [8].

- Fumo di sigaretta
  Nel Framingham Offspring Study (FOS), è emerso che un maggiore consumo giornaliero di sigarette è associato a una maggiore probabilità di sviluppare la calcificazione valvolare aortica (CAVD), anche tenendo conto degli altri fattori di rischio cardiovascolare. Nel MESA, invece, i fumatori attivi presentano un rischio di sviluppare CAVD circa 2,5 volte quello dei non fumatori [8].

- Ipertensione arteriosa
  Anche l'ipertensione sembra essere associata a una progressione più rapida della CAVD. In uno studio ecocardiografico retrospettivo, la velocità massima del sangue attraverso la valvola aortica aumentava più rapidamente nei pazienti ipertesi rispetto a quelli non ipertesi, suggerendo un peggioramento più rapido della stenosi. L'incremento annuale era rispettivamente di 0,26 ± 0,23 m/s e 0,17 ± 0,20 m/s ($p < 0,01$). Questo risultato suggerisce un'associazione non casuale, tra ipertensione e progressione della stenosi aortica [8].

- Dislipidemia
  Le alterazioni del metabolismo lipidico rappresentano uno dei fattori maggiormente studiati nella CAVD. In un'analisi immunoistologica è stata individuata la presenza di apolipoproteina B e apolipoproteina(a) in corrispondenza delle aree calcifiche nelle valvole stenotiche, mentre nessuna delle due è stata riscontrata nelle valvole normali. L'apolipoproteina B era distribuita in aree più ampie rispetto all'apolipoproteina(a), suggerendo che nel tessuto valvolare malato fossero presenti anche LDL, oltre alla lipoproteina(a) [8].

- Adiposità
  Una maggiore insorgenza di stenosi aortica emerge anche negli individui sovrappeso e obesi, rispetto gli individui normopeso, con valori di HR rispettivamente pari a 1,24 (IC 95%: 1,05–1,48) e 1,81 (IC 95%: 1,47–2,23). Quindi, tali dati suggeriscono un legame tra l'eccesso di tessuto adiposo e lo sviluppo della stenosi aortica calcifica. Restano tuttavia da chiarire i meccanismi alla base di questa associazione, tra cui il possibile ruolo legato alle alterazioni della glicemia e dei lipidi [8].

- Disfunzione renale e metabolismo minerale
  La CAVD è stata riscontrata nel 28% dei casi nei soggetti di età pari o superiore a 70 anni con malattia renale allo stadio terminale, suggerendo come la disfunzione renale sia associata a una maggiore gravità e progressione della malattia. Un possibile contributo deriva dalle alterazioni del metabolismo del calcio e del fosfato. Nei pazienti con malattia renale allo stadio terminale e calcificazione valvolare aortica sono stati osservati valori più elevati di calcio, fosfato e del prodotto delle loro concentrazioni (tutti $p < 0,05$) [8]

- Storia familiare
  Le persone con una storia familiare di stenosi aortica presentavano un rischio di sviluppare la malattia più che triplo (HR 3,41; IC 95%: 2,23–5,21). L'aumento era invece più contenuto quando la malattia riguardava il coniuge, con valori di HR pari a 1,16 per i mariti e 1,18 per le mogli. Questa differenza suggerisce che la predisposizione genetica possa avere un peso maggiore rispetto all'ambiente condiviso in età adulta, anche se non è possibile distinguere del tutto i due contributi. Tra i soggetti deceduti prima dei 65 anni, la presenza di legami di parentela era ancora più evidente. Questo dato sostiene l'ipotesi di una componente ereditaria, che potrebbe avere un ruolo più rilevante nei casi in cui la malattia porta al decesso in età più giovane [8].

- Lipoproteina(a)
  Oltre il 90% della variabilità dei livelli di lipoproteina(a) è attribuito alle varianti del gene LPA. Queste varianti sono associate alla calcificazione valvolare aortica e alla stenosi aortica, suggerendo un coinvolgimento dei livelli elevati di lipoproteina(a) nello sviluppo della CAVD. Gli studi di randomizzazione mendeliana rafforzano questa ipotesi, sostenendo un probabile ruolo causale della lipoproteina(a) nella malattia [8].

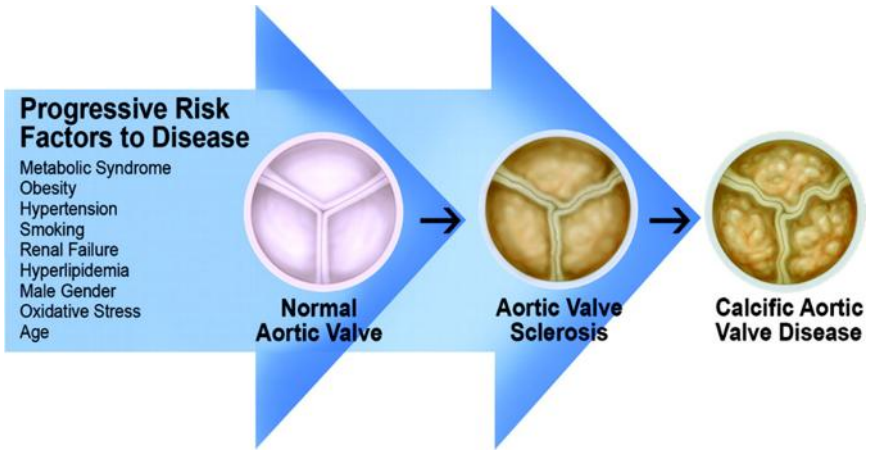


Figura 1. Principali fattori di rischio cardiovascolare coinvolti nella progressione della malattia valvolare aortica, dalla sclerosi alla malattia calcifica della valvola aortica. Tratta da Rajamannan et al. [1].

Oltre ai principali fattori di rischio, diversi studi epidemiologici hanno evidenziato una possibile correlazione tra infezione da citomegalovirus (CMV) e malattie cardiovascolari. In particolare, l'interesse per questo possibile legame, è emerso in seguito alla presenza del virus all'interno di lesioni aterosclerotiche. Stabilire con certezza il coinvolgimento diretto del CMV ai meccanismi patogenetici della lesione vascolare, è stato per lungo tempo difficile da definire [5]. Infatti ancora oggi l'interpretazione di questa relazione risulta particolarmente complessa, poiché alcuni fattori di rischio cardiovascolare tendono a risultare più marcati nelle popolazioni caratterizzate da condizioni socioeconomiche più svantaggiate, nelle quali risultano più frequenti anche altri fattori di rischio cardiovascolare, tra cui dislipidemia, ipercolesterolemia e abitudine al fumo [5].

Quindi nel complesso, l'infezione da CMV non può essere considerata un fattore di rischio cardiovascolare consolidato al pari di età, sesso, ipertensione, dislipidemia o obesità, ma le evidenze disponibili suggeriscono una possibile associazione con il rischio cardiovascolare e con alcune modificazioni della risposta immunitaria. In particolare, l'espansione delle cellule CD4+CD28- sono strettamente associate alla presenza di infezione da CMV e sembrano essere sostenute dalla persistenza dello stimolo virale. Questo fenomeno è stato proposto come possibile meccanismo capace di collegare l'infezione cronica da CMV all'aumento del rischio cardiovascolare osservato in alcune condizioni infiammatorie, fornendo quindi un'interpretazione che va oltre la sola associazione epidemiologica [5].

1.2 Stenosi Aortica

La stenosi aortica comporta il progressivo restringimento dell'area di apertura valvolare, con conseguente ostacolo al normale flusso sanguigno dal ventricolo sinistro verso l'aorta durante la sistole. Il ventricolo deve quindi sviluppare pressioni più elevate per superare l'ostruzione e garantire un flusso adeguato di sangue alla circolazione sistemica. Questo sovraccarico pressorio nel tempo, induce un adattamento strutturale del muscolo cardiaco, che si manifesta con un ispessimento delle pareti del ventricolo sinistro, noto come ipertrofia concentrica [10].

Le valvole cardiache assicurano che il sangue scorra in un'unica direzione, per svolgere questa funzione devono rispondere rapidamente alle variazioni di pressione durante il ciclo cardiaco e resistere alle continue sollecitazioni meccaniche nel corso della vita. Queste proprietà dipendono dall'organizzazione delle cellule e della matrice extracellulare, che conferisce al tessuto valvolare resistenza ed elasticità e gli permette di adattarsi alle condizioni biomeccaniche [1].

Quando la pressione all'interno del ventricolo sinistro aumenta e supera la pressione aortica, le cuspidi della valvola si aprono consentendo al sangue di passare nell'aorta, questa fase è meglio nota come sistole. Quando invece, la pressione ventricolare diminuisce e diventa inferiore a quella aortica, le cuspidi si chiudono, impedendo al sangue di tornare nel ventricolo. Per cui in tale fase definita diastole, la valvola rimane chiusa, mentre il ventricolo si rilassa e si riempie nuovamente. [1]

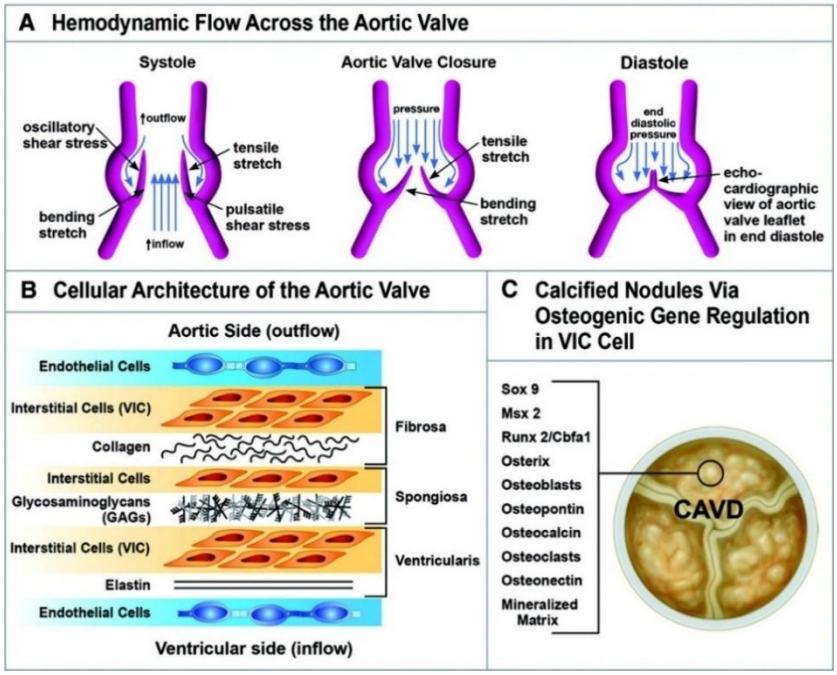


Figura 2. Organizzazione strutturale e biomeccanica della valvola aortica e meccanismi coinvolti nella CAVD. Rielaborata da Rajamannan et al. [1].

Quando queste funzioni vengono a mancare, l'organismo presenta delle condizioni patologiche, come un aumento persistente della pressione arteriosa o del carico di lavoro del miocardio, il flusso sanguigno può subire alterazioni, con la comparsa di vortici e turbolenze. Questi cambiamenti modificano le forze meccaniche esercitate sulle cellule endoteliali, che vengono così esposte a sollecitazioni irregolari. Se tali sollecitazioni sono persistenti nel tempo, possono compromettere la funzione dell'endotelio e favorirne il danneggiamento [2]. Per cui le sollecitazioni meccaniche possono compromettere l'integrità dell'endotelio e della membrana basale favorendo l'ingresso e il deposito di lipoproteine nel tessuto valvole. Infatti le fasi iniziali della malattia, presenta alcuni meccanismi simili a quelli dell'aterosclerosi, mentre nelle fasi avanzate può assumere caratteristiche che ricordano la formazione del tessuto osseo [2]. Quindi il danno endoteliale e i depositi lipidici favoriscono il richiamo di cellule immunitarie, come macrofagi e linfociti T attraverso l'espressione di molecole di adesione. Nel tessuto valvolare si accumulano anche lipoproteine a bassa densità ossidate (ox-LDL) e cellule infiammatorie attivate, favorendo i successivi processi di calcificazione. Le cellule infiammatorie rilasciano diversi mediatori, tra cui TNF-α, TGF-β1, VEGF e IL-1β, che insieme a enzimi come le metalloproteasi contribuiscono al rimodellamento del tessuto, attraverso la degradazione delle fibre collagene ed elastiche, alterando la normale struttura della valvola [2]. In questo contesto, le cellule interstiziali valvolari possono attivarsi e assumere un fenotipo miofibroblastico. Se questa attivazione persiste, l'eccessivo accumulo di collagene favorisce la fibrosi. In risposta a segnali che promuovono la formazione di tessuto osseo, ai quali può contribuire anche il TGF-β1, i miofibroblasti possono acquisire caratteristiche simili a quelle degli osteoblasti e favorire la deposizione di minerali.

La calcificazione valvolare è quindi un processo attivo, che in alcune lesioni si accompagna alla formazione e al rimodellamento di un vero e proprio tessuto osseo [2]. Inoltre in presenza di infiammazione e ossificazione, può alterarsi anche l'equilibrio tra i fattori angiogenici, che promuovono la formazione di nuovi vasi e quelli che la inibiscono, favorendo lo sviluppo di microvasi all'interno del tessuto valvolare, il quale in condizioni fisiologiche ne è privo [2].

Quindi nonostante la frequenza della malattia aumenti con l'avanzare dell'età, non rappresenta una conseguenza inevitabile dell'invecchiamento. Ma è appunto un processo attivo regolato da meccanismi cellulari e molecolari, che non può essere spiegato soltanto come una degenerazione dovuta all'età [1]. Inoltre per la valutazione e monitoraggio della stenosi aortica, attualmente, lo strumento di riferimento è l'ecocardiografia poiché consente di osservare l'anatomia della valvola e di quantificare l'ostacolo al flusso sanguigno. I parametri ecocardiografici utilizzati per definire la gravità della stenosi sono stati validati in numerosi studi e guidano la gestione clinica dei pazienti [1].

1.3 Struttura e organizzazione della valvola aortica

Le quattro valvole cardiache presentano un'organizzazione strutturale simile caratterizzata dalla presenza di diverse popolazioni cellulari e da una matrice extracellulare eterogenea organizzata secondo una precisa architettura tissutale. Le proprietà biomeccaniche delle cuspidi consentono loro di adattarsi alle sollecitazioni legate al ciclo cardiaco, contribuendo a mantenere un'efficace funzione valvolare. Riescono ad adempiere a questo compito proprio perché il tessuto valvolare non è una struttura statica, ma presenta caratteristiche dinamiche capaci di rispondere alle condizioni biomeccaniche dell'ambiente circostante [1]. Ogni cuspide della valvola aortica presenta una struttura organizzata in tre strati. Ritroviamo la fibrosa, rivolta verso l'aorta, contiene una fitta rete di collagene, che conferisce resistenza meccanica e si trova in continuità con le strutture di sostegno della valvola, al centro è presente la spongiosa, formata da tessuto connettivo lasso ricco di glicosaminoglicani, il cui compito è facilitare lo scorrimento reciproco e l'adattamento degli strati ricchi di collagene ed elastina durante l'apertura e la chiusura della valvola. Mentre sul versante ventricolare è presente la ventricularis ricca in elastina e garantisce flessibilità alla struttura [1].

Inoltre la valvola aortica presenta anche diverse tipologie cellulari. In particolare le superfici a contatto con il sangue sono rivestite da cellule endoteliali valvolari (VEC), mentre all'interno del tessuto si trovano le cellule interstiziali valvolari (VIC), immerse nella matrice extracellulare valvolare (VECM). Quest'ultima è composta da collagene, elastina e una componente amorfa ricca soprattutto di glicosaminoglicani [1]. Le VIC sono una popolazione cellulare eterogenea distribuita in tutti gli strati del tessuto valvolare, poiché contribuiscono a preservarne l'integrità e il corretto funzionamento.

Hanno un ruolo chiave nel produrre le componenti della matrice extracellulare e ne regolano il ricambio attraverso il rilascio di metalloproteinasi e dei loro inibitori. Infatti nella valvola adulta sana, presentano caratteristiche simili a quelle dei fibroblasti quiescenti ma possono attivarsi in risposta a sollecitazioni meccaniche o a un danno tissutale, partecipando alla riparazione della matrice [1].

Per questo motivo, in condizioni patologiche, possono acquisire caratteristiche simili a quelle degli osteoblasti e favorire la deposizione di materiale mineralizzato. La plasticità delle VIC, utile per il mantenimento e la riparazione della valvola, può quindi contribuire anche alla fibrosi e alla progressiva calcificazione del tessuto [1].

Invece le cellule endoteliali valvolari (VEC), pur essendo simili alle cellule endoteliali dei vasi sanguigni, possiedono caratteristiche fenotipiche proprie, che le distinguono anche dalle VEC presenti nell'aorta adiacente. Inoltre è emerso come l'interazione tra VEC e VIC, sembra essere utile a preservare l'integrità della valvola, ma potrebbe essere coinvolto anche nei processi patologici [1].

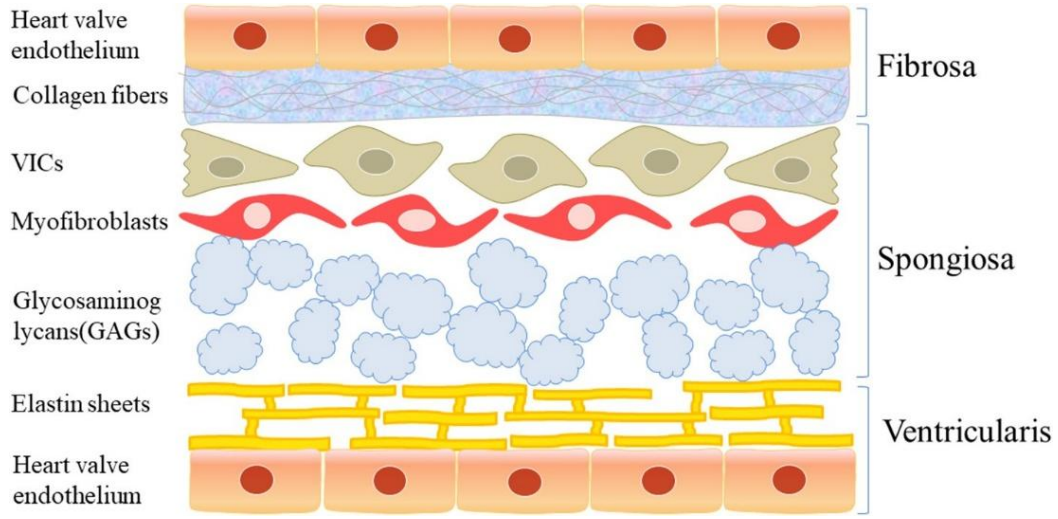


Figura 3. Struttura della valvola aortica e organizzazione dei suoi strati e componenti cellulari. Riprodotta da Bian et al. (2021), figura 1, con licenza CC BY [2].

1.4 Patogenesi della malattia calcifica della valvola aortica e analogie con l'aterosclerosi

La patogenesi della stenosi aortica presenta alcuni elementi in comune con quella dell'aterosclerosi. Entrambi i processi coinvolgono infatti alterazioni dell'endotelio, accumulo e modificazione delle lipoproteine e reclutamento di cellule infiammatorie. In particolare, il materiale lipidico si accumula nello spazio subendoteliale delle arterie di grosso calibro, dando origine alle cosiddette strie grasse (fatty streaks). Un evento importante nella formazione di queste lesioni è l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), che può avvenire con intensità diversa [10]. Quando le modificazioni sono limitate, si formano le LDL minimamente ossidate (minimally oxidized LDL, mmLDL), che possono ancora essere riconosciute dal normale recettore per le LDL. Se invece l'ossidazione diventa più estesa, si formano le LDL ossidate (oxLDL), nelle quali sia la componente lipidica sia quella proteica risultano profondamente alterate. In queste condizioni, l'apolipoproteina B può frammentarsi e i suoi residui di lisina possono essere modificati covalentemente dai prodotti reattivi dell'ossidazione lipidica. Questi cambiamenti compromettono il riconoscimento della particella da parte del recettore classico delle LDL [10]. Le oxLDL vengono quindi captate soprattutto attraverso i recettori scavenger, espressi principalmente dai macrofagi e dalle cellule muscolari lisce della parete vascolare. Sia le mmLDL sia le oxLDL possono esercitare effetti pro-infiammatori e protrombotici, favorendo l'attivazione delle cellule, il richiamo di elementi infiammatori e l'estensione del danno vascolare. Questi meccanismi contribuiscono alla formazione e alla progressione della lesione aterosclerotica. Alcuni componenti delle oxLDL favoriscono inoltre l'attivazione dell'endotelio vascolare, aumentando l'espressione delle molecole di adesione coinvolte nel reclutamento dei monociti, tra cui ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) e VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1). Al contempo, le oxLDL possono stimolare la produzione di chemochine, come MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), che richiama i monociti attraverso la sua attività chemiotattica. L'aumento delle molecole di adesione e delle chemochine facilita l'adesione dei monociti all'endotelio e la loro successiva migrazione nelle aree di accumulo lipidico, contribuendo a mantenere l'infiammazione cronica della parete vascolare. Nei soggetti ipercolesterolemici è stata inoltre descritta, in diversi casi, una maggiore espressione di MCP-1 e del suo recettore, a sostegno del ruolo del reclutamento monocitario nella progressione della lesione [10].

L'ingresso dei monociti nella parete vascolare rappresenta inizialmente una risposta di difesa, finalizzata alla rimozione delle LDL ossidate e dei loro prodotti potenzialmente dannosi. Quando però il reclutamento e l'accumulo dei macrofagi persistono e non vengono adeguatamente controllati, questa risposta può favorire la progressione della lesione. Una volta entrati nel tessuto, i monociti si differenziano in macrofagi attivati, che inglobano le oxLDL. Il progressivo accumulo di lipidi al loro interno li trasforma in cellule schiumose, dette anche foam cells [10].

In questa fase, i macrofagi favoriscono anche la migrazione delle cellule muscolari lisce verso l'intima e le regioni subendoteliali. Queste cellule possono proliferare e captare le oxLDL attraverso i recettori scavenger, assumendo a loro volta caratteristiche simili a quelle delle cellule schiumose. Contestualmente, la formazione del tessuto fibroso derivato dalla produzione eccessiva di matrice extracellulare, porta alla formazione della placca aterosclerotica tipica delle fasi più avanzate del processo aterosclerotico [10]. Mentre la calcificazione rappresenta una caratteristica centrale della CAVD, infatti la sua entità è associata alla gravità della stenosi e ha un valore prognostico indipendente [12].

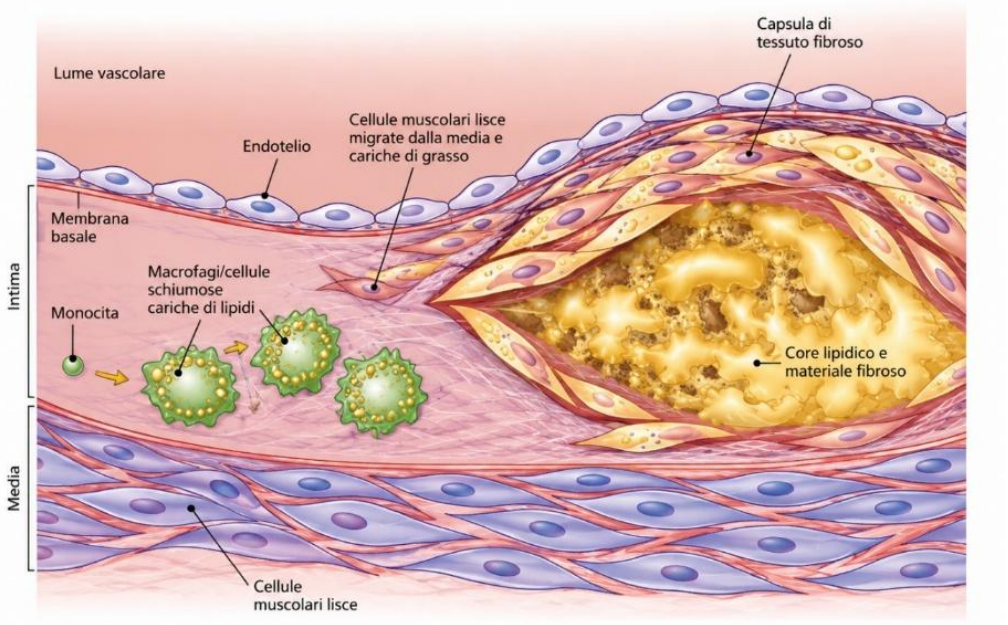


Figura 4. Placca aterosclerotica avanzata. Rielaborata da Mainiero et al. [10], Fig. 44.2.

Nelle valvole stenotiche si osservano inoltre numerosi linfociti T attivati, che esprimono il recettore per l'interleuchina-2 (IL-2) oltre a secernere interferone-gamma (IFN-γ) [12].

L'IFN-γ, è un fattore chiave che induce l'espressione dell'MHC di classe II, una molecola presente anche nelle cellule muscolari lisce vascolari e nelle cellule interstiziali della valvola. E' la principale citochina dei linfociti T helper 1 e sostiene l'attivazione dei macrofagi favorendo i processi aterosclerotici [12]. Infatti i macrofagi possono presentare ai linfociti T frammenti derivati dalle oxLDL e i linfociti T, a loro volta, possono poi contribuire all'attivazione dei linfociti B e alla produzione di anticorpi contro le oxLDL o altre proteine modificate durante la formazione della placca. Questi anticorpi sono rilevabili nel sangue e sono stati proposti come possibili marcatori della progressione della lesione [10]. Inoltre, la produzione di IFN-γ da parte dei linfociti T CD8+CD28− può favorire la calcificazione del tessuto valvolare, poiché tale citochina può ostacolare l'attività degli osteoclasti, riducendone la capacità di riassorbimento dei depositi minerali e contribuendo così al progressivo accumulo di calcio nella valvola [12].

La presenza dei linfociti T CD8+ attivati e in fase di espansione, non solo è marcata nel tessuto valvolare dei pazienti affetti da stenosi aortica, ma anche nel sangue, suggerendo come i linfociti possano attivamente migrare dal circolo sanguigno e accumularsi all'interno della valvola [12]. Oltre a ciò il sistema immunitario dei pazienti affetti da malattia valvolare aortica calcifica (CAVD) si comporta in modo diverso rispetto a quello delle persone sane. Nel loro sangue, infatti, si nota non solo una proporzione maggiore di linfociti T CD8+ rispetto ai CD4+, ma anche un aumento specifico dei linfociti T CD4+CD28-. Quest'ultimo fenomeno diventa ancora più evidente e marcato se il paziente soffre contemporaneamente anche di aterosclerosi [12].

In questo contesto, Winchester e colleghi [11] hanno osservato che, nei pazienti con una calcificazione valvolare più grave, era associato un aumento significativo dei linfociti T CD8+ con fenotipo effettore di memoria CD28−CD57+. Questa associazione era presente sia nei pazienti con valvola bicuspide sia in quelli con valvola tricuspide. Inoltre gli autori, hanno riscontrato la presenza degli stessi cloni T espansi sia nel tessuto valvolare sia nel sangue periferico, ma soprattutto della popolazione CD8+CD28−. Nel complesso, queste osservazioni suggeriscono un legame tra la risposta immunitaria adattativa nel tessuto valvolare e quella sistemica, indicando un possibile traffico cellulare tra il sangue e la valvola [11].

1.5 Biomarcatori e tecniche emergenti per la valutazione della stenosi aortica

Tra gli strumenti emergenti per la valutazione della stenosi aortica calcifica, i biomarcatori circolanti e le tecniche avanzate di imaging stanno suscitando crescente interesse. Il loro impiego potrebbe migliorare il monitoraggio dei pazienti asintomatici, aiutare a riconoscere quelli a maggiore rischio e fornire indicazioni sul momento più opportuno per la sostituzione valvolare [19].

Tra i biomarcatori più studiati emergono il peptide natriuretico di tipo B (BNP) e la troponina I ad alta sensibilità (hsTnI), entrambi disponibili nella pratica clinica e misurabili con esami relativamente semplici e poco costosi [19]. Il BNP è un ormone prodotto principalmente dai cardiomiociti in risposta all'aumento dello stress di parete e allo stiramento delle fibre miocardiche. Sebbene venga comunemente utilizzato nella valutazione dello scompenso cardiaco, può fornire informazioni prognostiche anche nei pazienti con stenosi aortica. L'aumento delle sue concentrazioni può infatti riflettere il sovraccarico del ventricolo sinistro e la comparsa di alterazioni della funzione ventricolare. Una revisione sistematica di 21 studi ha evidenziato un'associazione tra livelli elevati di BNP e una maggiore mortalità per tutte le cause. Tra i biomarcatori analizzati, il BNP mostrava il maggiore valore prognostico, con un rischio di morte più che raddoppiato nei pazienti con concentrazioni elevate [19]. In questo contesto, le linee guida della European Society of Cardiology richiamata nella revisione indicavano valori di BNP superiori a tre volte il limite normale tra gli elementi da considerare nella decisione di intervenire nei pazienti asintomatici [19].

L’interpretazione di questo parametro richiede comunque cautela, perché il BNP può aumentare anche in altre condizioni cardiovascolari e non è specifico della stenosi aortica. Il suo dosaggio assume quindi maggiore utilità quando viene valutato insieme al quadro clinico, ad altri biomarcatori e ai risultati degli esami di imaging [19].

Anche la troponina, comunemente utilizzata come indicatore di danno miocardico nelle sindromi coronariche acute, è stata studiata nella stenosi aortica. In questi pazienti, concentrazioni elevate sono state associate al rimodellamento del ventricolo sinistro e alla fibrosi miocardica. Il dosaggio dell’hsTnI potrebbe aiutare a riconoscere un danno miocardico subclinico, prima che si manifestino sintomi o una compromissione evidente della funzione ventricolare. L’integrazione di questo biomarcatore con la risonanza magnetica cardiovascolare è stata alla base dello studio multicentrico randomizzato EVOLVED, progettato per valutare una strategia di intervento guidata dall’identificazione del danno miocardico nei pazienti asintomatici [19]. La risonanza magnetica cardiovascolare (Cardiovascular Magnetic Resonance, CMR) permette di studiare la funzione ventricolare e di caratterizzare il tessuto miocardico in modo non invasivo. Nella stenosi aortica, può fornire informazioni sulle conseguenze dell’ostruzione valvolare a carico del ventricolo sinistro, contribuendo alla valutazione del rischio e alla scelta dei tempi del trattamento. Questo aspetto è particolarmente rilevante nei pazienti asintomatici, nei quali il danno miocardico può svilupparsi prima della comparsa di manifestazioni cliniche evidenti [19]. Uno dei principali vantaggi della CMR è la possibilità di valutare la fibrosi miocardica senza ricorrere a una biopsia cardiaca, procedura invasiva e non priva di rischi. A questo scopo vengono impiegati il late gadolinium enhancement (LGE) e il T1 mapping, che consentono di esaminare aspetti diversi delle alterazioni tissutali [19].

Il LGE sfrutta la diversa distribuzione e persistenza del mezzo di contrasto a base di gadolinio nelle aree in cui lo spazio extracellulare è aumentato e permette di individuare la fibrosi miocardica sostitutiva. Nei pazienti con stenosi aortica, la presenza di LGE è stata associata a una prognosi meno favorevole. Il T1 mapping, invece, misura il tempo di rilassamento T1 del tessuto e fornisce informazioni quantitative utili per valutare le alterazioni miocardiche diffuse [19].

Oltre alla caratterizzazione del miocardio, la CMR consente di studiare la compliance aortica, cioè la capacità dell’aorta di distendersi in risposta alle variazioni di pressione, e le caratteristiche del flusso sanguigno. Questi parametri possono aiutare a comprendere il carico complessivo a cui è sottoposto il ventricolo sinistro. Al sovraccarico dovuto all’ostruzione valvolare si aggiunge infatti quello imposto dal sistema arterioso, costituito da una componente resistiva e da una componente pulsatile. Quest’ultima dipende soprattutto dalla rigidità aortica e dalla riflessione delle onde pressorie. Un aumento del carico arterioso può quindi aggravare il lavoro del ventricolo sinistro, favorendone il rimodellamento e la progressiva perdita di funzione [19]. Un ulteriore parametro di interesse è l’energia cinetica del sangue all’interno del ventricolo sinistro. Le sue alterazioni sono state associate al rimodellamento ventricolare e a una minore capacità di esercizio, suggerendo un possibile contributo alla valutazione delle conseguenze funzionali della malattia [19].

Nel complesso, l'analisi integrata dei biomarcatori circolanti e dei parametri ottenuti mediante CMR potrebbe rendere più accurata la valutazione del paziente e aiutare a orientare le decisioni terapeutiche. Tuttavia, le evidenze descritte derivano soprattutto da studi con campioni limitati per cui sono necessarie ulteriori conferme per chiarirne il valore prognostico e stabilire in che misura possano guidare la gestione clinica, prima e dopo la sostituzione valvolare [19].

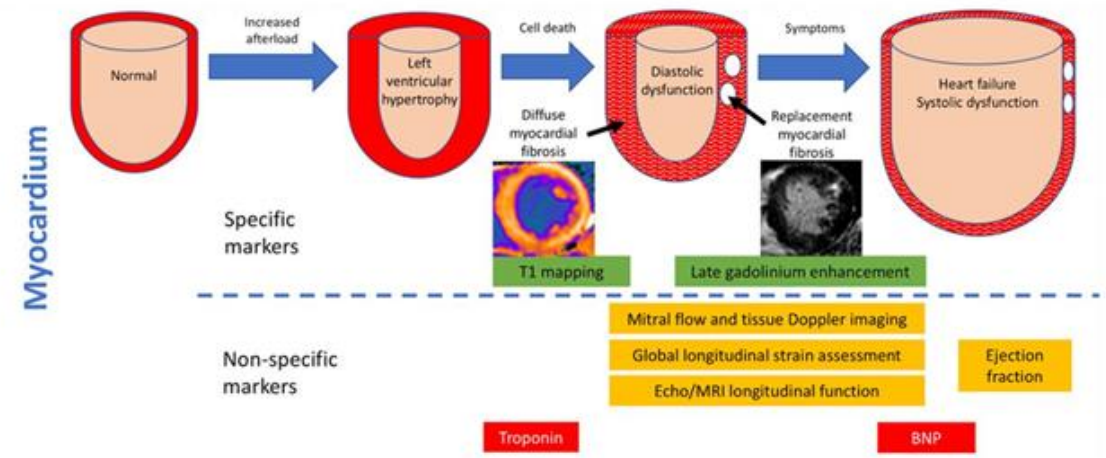


Figura 5. Rappresentazione schematica della progressione del rimodellamento miocardico e dei principali biomarcatori e metodi di imaging utilizzati nella valutazione della stenosi aortica calcifica. Rielaborata da Shah et al. [19], Figura 3; immagine originariamente adattata dagli autori da Everett et al.

1.6 Infiammazione e citochine infiammatorie

Le citochine sono molecole di natura polipeptidica che consentono alle cellule del sistema immunitario di comunicare tra loro e con le cellule di altri organi e tessuti. Anche i fattori di crescita e gli ormoni polipeptidici partecipano alla comunicazione extracellulare, ma presentano alcune differenze rispetto alle citochine. I fattori di crescita non emopoietici, ad esempio, sono prodotti in modo costitutivo e agiscono soprattutto su cellule non emopoietiche. Gli ormoni, invece, vengono sintetizzati prevalentemente da cellule o tessuti specializzati, mentre le citochine possono essere prodotte da diversi tipi cellulari. Ne sono un esempio l'interleuchina-2 (IL-2) e dell'interferone-γ (IFN-γ), prodotti principalmente da cellule della linea linfoide [10]. In genere, la sintesi delle citochine avviene in risposta a uno stimolo ed è limitata nel tempo. La loro azione si esercita soprattutto vicino al sito di produzione, per cui, in condizioni normali, le concentrazioni nel sangue rimangono basse. Le citochine possono essere classificate in base alla struttura, ai recettori con cui interagiscono o alle funzioni che svolgono, ma nonostante ciò una stessa citochina può svolgere più funzioni e i suoi effetti possono sovrapporsi a quelli di altri mediatori. Per descriverne il ruolo, è particolarmente utile la classificazione funzionale [10], che distingue:

-citochine emopoietiche, che regolano la proliferazione e il differenziamento delle cellule emopoietiche;

-citochine dell'immunità, che partecipano alla regolazione delle risposte immunitarie;

-citochine infiammatorie primarie, coinvolte nell'avvio e nel mantenimento dell'infiammazione;

-citochine infiammatorie secondarie, tra cui soprattutto le chemochine, che guidano il reclutamento e la migrazione delle cellule immunitarie verso i tessuti infiammati;

-citochine antinfiammatorie o immunosoppressive, che limitano e regolano la risposta immunitaria e infiammatoria.

Durante la risposta infiammatoria, le cellule attivate rilasciano mediatori che promuovono la produzione di altre molecole proinfiammatorie, contribuendo così all'amplificazione del processo. In questa successione di segnali si distinguono citochine infiammatorie primarie e secondarie. Tra le prime rientrano IL-1, TNF e IL-6, i quali possono essere considerati i mediatori fondamentali. Tutte e tre hanno un'azione pleiotropica, cioè possono agire su diversi tipi di cellule e tessuti. Pur legandosi a recettori strutturalmente differenti, esercitano effetti in parte sovrapponibili. IL-1 e TNF hanno un ruolo centrale nelle fasi iniziali dell'infiammazione e promuovono la produzione di altri mediatori che ne sostengono l'amplificazione. Mentre IL-6, nonostante sia compresa tra le citochine primarie, presenta anche caratteristiche di un mediatore secondario e contribuisce, alla risposta di fase acuta [10].

A livello locale, IL-1 e TNF favoriscono l'espressione di molecole di adesione e la produzione di chemochine, fattori di crescita, mediatori lipidici, come le prostaglandine, e monossido di azoto (NO). Nel loro insieme, questi segnali facilitano il reclutamento dei leucociti e ne sostengono la presenza nel tessuto interessato, rafforzando la risposta infiammatoria. L'attivazione dell'immunità innata contribuisce anche a orientare la successiva risposta adattativa. In questo collegamento intervengono citochine come l'IL-12, che favorisce risposte caratterizzate dalla produzione di IFN-γ [10].

L'interleuchina-1 (IL-1) è uno dei principali mediatori dell'infiammazione, viene prodotta principalmente dai monociti e macrofagi, ma può essere sintetizzata anche da altri tipi cellulari. Agisce su diverse cellule emopoietiche, inclusi i precursori e i linfociti T e B, contribuendo a regolarne la proliferazione e il differenziamento [10]. Parte di questi effetti dipende dalla capacità di stimolare la produzione di fattori di crescita e di altre citochine, tra cui l'IL-6. La sua azione interessa anche altri tessuti, infatti a livello cardiaco, insieme al TNF, può compromettere la contrattilità del miocardio, mentre nel muscolo scheletrico favorisce il catabolismo proteico [10].

Il fattore di necrosi tumorale (TNF) prende il nome dalla capacità, osservata nei primi modelli sperimentali, di provocare la necrosi di alcuni tumori. Questa denominazione descrive però solo uno dei suoi effetti, poiché il suo ruolo principale riguarda la regolazione e l'amplificazione dell'infiammazione. Come l'IL-1, viene prodotto soprattutto dai fagociti mononucleati, in particolare monociti e macrofagi, ma anche altre popolazioni cellulari possono sintetizzarlo in risposta a stimoli infiammatori [10].

L’interleuchina-6 (IL-6) è prodotta da numerosi tipi cellulari, tra cui monociti e macrofagi, e svolge diverse funzioni nella risposta infiammatoria e immunitaria. Partecipa a molti dei processi attivati da IL-1 e TNF e contribuisce alla regolazione dell’emopoiesi, favorendo in particolare il differenziamento dei megacariociti. Agisce inoltre sui linfociti T e B, influenzandone l’attività e il differenziamento. Quando la sua produzione persiste, può sostenere l’attivazione delle cellule immunitarie e induce modificazioni del microambiente tissutale, contribuendo a prolungare l’infiammazione e alla sua cronicizzazione [10].

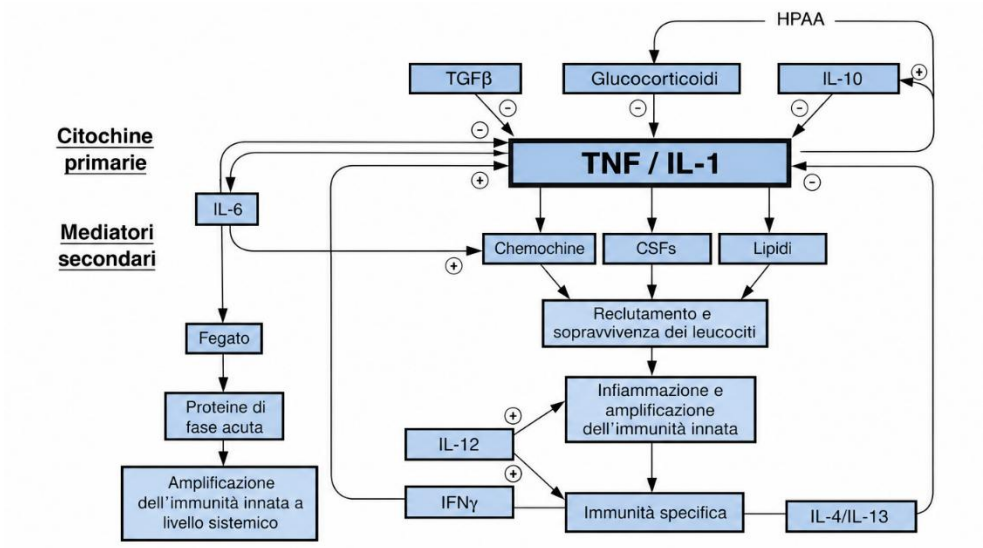


Figura 6. Cascata delle citochine infiammatorie. Modificata da Mainiero F, Misasi R, Sorice M, a cura di. *Patologia generale & Fisiopatologia generale*. VI ed. Tomo I. Padova: Piccin Nuova Libraria; 2019, p. 202 [10].

2. Il Sistema Immunitario Adattativo e il differenziamento dei linfociti T

I linfociti T sono una componente fondamentale dell'immunità adattativa e contribuiscono al riconoscimento e al controllo di cellule infette, alterate o potenzialmente dannose, oltre a partecipare alla regolazione della risposta immunitaria [16].

Essi originano da progenitori linfoidi comuni (common lymphoid progenitors, CLP) derivati dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo. I precursori destinati alla linea T migrano nel timo, dove attraversano diverse fasi di maturazione e selezione fino a dare origine a linfociti T maturi naïve a singola positività, principalmente CD4+ e CD8+ [16]. Nel timo la maturazione dei CD4+ è sostenuta da cellule stromali che producono IL-7, un importante fattore di sopravvivenza. Anche IL-7 e IL-15 contribuiscono alla sopravvivenza e al mantenimento dei linfociti T CD8+ [4].

La loro successiva attivazione avviene in seguito al riconoscimento dell'antigene presentato dalle cellule presentanti l'antigene (APC), le quali lo elaborano e presentano sulla propria superficie sotto forma di frammenti peptidici associati alle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). In seguito all'attivazione, i linfociti T proliferano e si differenziano in cellule effettrici, capaci di raggiungere i tessuti dove svolgono le proprie funzioni [16]. I linfociti T CD8+ svolgono principalmente un'azione citotossica, eliminando le cellule infette o alterate attraverso il rilascio di perforina e granzimi, mentre i linfociti T CD4+ coordinano la risposta immunitaria mediante la produzione di citochine, con azione pro-infiammatorie o antinfiammatorie. Una parte delle cellule attivate diventa invece costituita da linfociti T della memoria, capaci di persistere a lungo e di rispondere più rapidamente a un nuovo incontro con lo stesso antigene [16].

Per distinguere le principali sottopopolazioni di linfociti T della memoria si utilizza CCR7, un recettore per le chemochine che guida la migrazione dei linfociti verso gli organi linfoidi secondari. La sua espressione può essere analizzata insieme a quella di CD45RA, un'isoforma della molecola CD45 generalmente presente nelle cellule naïve. I linfociti T della memoria esprimono invece prevalentemente l'isoforma CD45RO [13]. Nel sangue periferico, l'analisi combinata di CD45RA e CCR7 ha consentito di distinguere tre sottopopolazioni di linfociti T CD4+ ovvero le cellule naïve (CD45RA+CCR7+), le cellule della memoria centrale, indicate come TCM (CD45RA−CCR7+), e le cellule della memoria effettrice, o TEM (CD45RA−CCR7−). Le cellule naïve e le TCM mostravano anche alti livelli di CD62L, un altro recettore che favorisce la migrazione dei linfociti e il loro ingresso nei linfonodi, mentre nelle TEM la sua espressione era più bassa e variabile [13].

Le differenze tra TCM e TEM riguardano sia la capacità di raggiungere determinati tessuti sia le funzioni svolte. Le TCM migrano preferenzialmente nei linfonodi e hanno una ridotta attività effettrice immediata ma quando incontrano nuovamente l'antigene, possono differenziarsi in cellule effettrici CCR7−. Le TEM, invece, hanno funzioni effettrici e possono raggiungere i tessuti periferici e le sedi di infiammazione, dove svolgono la loro azione. Queste caratteristiche permettono alle due popolazioni di contribuire in modo complementare alla risposta immunitaria di memoria [13].

Tra i linfociti T CD8+ sono state individuate le stesse tre sottopopolazioni, oltre a un gruppo di cellule CD45RA+CCR7−. Anche in questo caso, le cellule CCR7+ esprimevano livelli elevati di CD62L, mentre la maggior parte delle cellule CCR7− ne era priva. La presenza di questa ulteriore popolazione mostra quindi che l'espressione di CD45RA, da sola, non basta a identificare un linfocita T come naïve [13].

Tabella 1. Principali fenotipi delle sottopopolazioni T naïve e di memoria. Adattata da Slaets et al. [15]

	CD45RA	CD27	CD28	CCR7
Cellule T naive (N)	+	+	+	+
Cellule T della memoria centrale (TCM)	−	+	+	+
Cellule T della memoria effettrici (TEM)	−	−	+/-	−
Cellule T effettrici terminali (TEMRA)	+	−	−	−

2.1 Immunosenescenza

La senescenza cellulare fu descritta per la prima volta nel 1961 da Hayflick e Moorhead, studiando fibroblasti umani coltivati in vitro. I due ricercatori osservarono che queste cellule non potevano proliferare indefinitamente, infatti notarono che dopo un certo numero di divisioni, smettevano di replicarsi [15]. Questo limite alla capacità proliferativa, in seguito chiamato "limite di Hayflick", è stato riscontrato anche in molti altri tipi di cellule somatiche. Uno dei principali meccanismi alla base della senescenza replicativa è il progressivo accorciamento dei telomeri durante le divisioni cellulari. Quando diventano eccessivamente corti, i telomeri non riescono più a proteggere adeguatamente le estremità dei cromosomi, che vengono riconosciute come siti di danno al DNA. Si attiva così la risposta al danno al DNA (DNA damage response, DDR), che può indurre un arresto stabile del ciclo cellulare [15]. Dopo l'attivazione della DDR, il destino della cellula dipende dalla gravità del danno e dalla possibilità di ripararlo. Se la riparazione ha successo, la cellula può riprendere a proliferare altrimenti se il danno persiste, può andare incontro ad apoptosi o entrare in uno stato di arresto stabile del ciclo cellulare, caratteristico proprio della senescenza [15].

Quindi la senescenza cellulare ha un ruolo protettivo nei confronti dell'organismo, infatti contribuisce a prevenire lo sviluppo di tumori, limitando la proliferazione delle cellule danneggiate. Per cui questo processo, quando si manifesta in modo transitorio, svolge funzioni benefiche legate al rimodellamento dei tessuti durante lo sviluppo embrionale, nella guarigione delle ferite. Questi effetti protettivi possono però venir meno quando le cellule senescenti persistono e si accumulano nei tessuti, favorendo l'infiammazione cronica e compromettendo la funzionalità tissutale [15].

Le cellule senescenti tendono ad accumularsi con l'avanzare dell'età, nei tessuti interessati da processi patologici. Diversi tipi cellulari, tra cui fibroblasti, cellule epiteliali e adipociti, possono sviluppare un fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP), caratterizzato dal rilascio di numerose sostanze in grado di influenzare il microambiente circostante. Tra queste rientrano citochine proinfiammatorie come IL-1α, IL-6 e IL-8, chemochine, fattori di crescita, prostaglandine, metalloproteinasi. Per cui il rilascio persistente di mediatori proinfiammatori associato al loro fenotipo secretorio (SASP) può contribuire a mantenere uno stato di infiammazione cronica di basso grado, noto come inflammaging [15]. Inoltre il SASP può compromettere l'attività della risposta immunitaria, rendendo meno efficace la rimozione delle cellule senescenti. Si crea così un circolo vizioso che ne favorisce l'accumulo nei tessuti e può amplificare gli effetti dell'invecchiamento, infatti se mantenuto nel tempo, i mediatori rilasciati dalle cellule senescenti possono modificare il microambiente tissutale e indurre, attraverso un'azione paracrina, la senescenza delle cellule vicine [4]. Sono presenti anche alterazioni della funzione mitocondriale che prevede una ridotta capacità di produrre ATP e una compromissione della mitofagia, il processo che permette di rimuovere i mitocondri danneggiati. Queste alterazioni favoriscono l'accumulo di mitocondri disfunzionali e un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [15].

Nei tessuti infiammati, i linfociti T possono essere esposti alle ROS prodotte dalle cellule dell'immunità innata, in particolare neutrofili e macrofagi. Questo ambiente ossidativo può favorire il danno al DNA e contribuire allo sviluppo di caratteristiche associate alla senescenza. Anche la stimolazione antigenica ripetuta può compromettere la funzionalità dei linfociti T, favorendo l'acquisizione di un fenotipo senescente oppure uno stato di esaurimento funzionale, noto come exhaustion [15]. Infatti in diversi studi condotti sugli anziani, è emerso un aumento dei linfociti T privi di CD28 (CD28null). La perdita di questa molecola è stata associata allo stress proliferativo dovuto a ripetuti cicli di divisione cellulare. Coerentemente con questa osservazione, i linfociti T CD28null isolati dal sangue periferico presentano telomeri più corti rispetto ai linfociti T CD28+ dello stesso individuo. Così come la frequenza dei linfociti T naïve diminuisce in modo significativo. Questa riduzione è più marcata nel compartimento CD8+, ma interessa anche i linfociti T CD4+ [15].

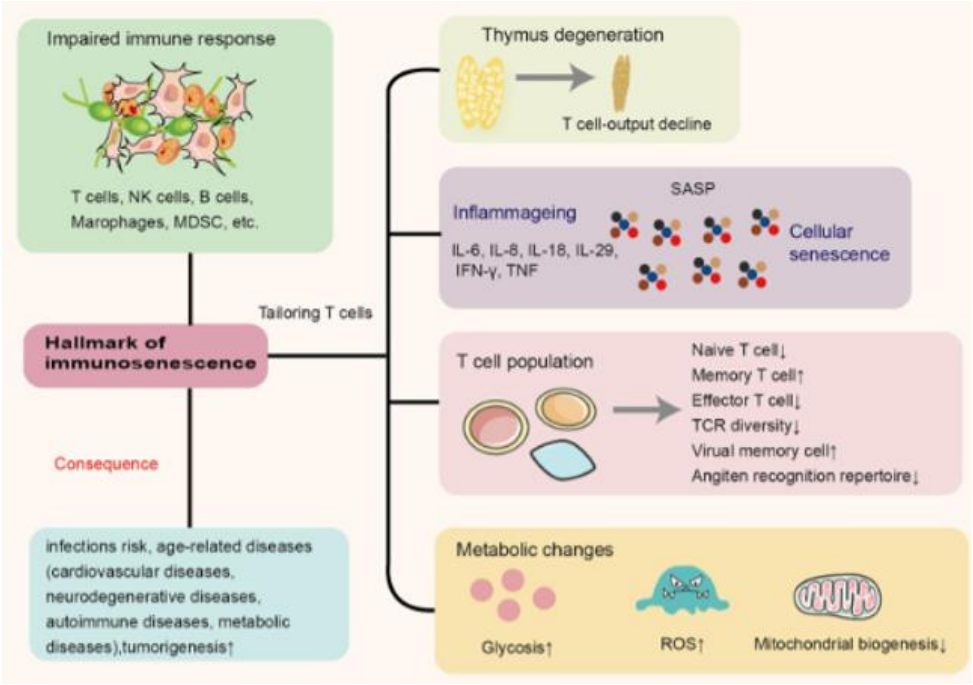


Figura 7. Principali caratteristiche dell'immunosenescenza. Rielaborata da Liu et al. [3].

2.2 Rilevanza delle sottopopolazioni T nella stenosi aortica

Diversi studi, suggeriscono, che la stenosi aortica sia il risultato di un processo infiammatorio attivo, infatti le cellule immunitarie presenti nel tessuto valvolare possono contribuire alla degenerazione della valvola e alla progressione della malattia. In particolare, i linfociti T infiltranti mostrano espansioni oligoclonali, che indicano una possibile risposta ad antigeni persistenti. Comprendere il ruolo di queste cellule e identificare gli antigeni che ne sostengono la loro attivazione, potrebbe facilitare a individuare nuovi bersagli terapeutici, con l'obiettivo di rallentare la calcificazione e la progressione verso la stenosi, riducendo la necessità di ricorrere alla sostituzione valvolare [17].

In particolare un profilo di rischio immunitario (immune risk profile, IRP), è caratterizzato da un insieme di parametri immunologici associati a un maggiore rischio di malattia e mortalità. Tra le principali caratteristiche di questo profilo è presente la riduzione dei linfociti T CD8+ naïve e l'accumulo di cellule CD8+ della memoria, accompagnati da un aumento dell'espressione di CD57 e dalla perdita dei marcatori CD28 e CD27 [18]. Tra i vari cambiamenti del profilo T, l'involuzione timica è principalmente coinvolta, dato che dopo la pubertà si riduce progressivamente la produzione di nuovi linfociti T naïve. Così come la stimolazione immunitaria prolungata dovuta a patogeni persistenti, come il citomegalovirus (CMV), può favorire l'espansione di un numero limitato di cloni T. Per cui, nel tempo, questi processi possono ridurre la diversità del repertorio linfocitario e la capacità del sistema immunitario di rispondere ad antigeni non ancora incontrati [18].

I linfociti T infatti, attraversano diverse fasi di differenziamento, che possono essere descritte attraverso l'espressione di specifici marcatori. Sia nel compartimento CD4+ che CD8+, la combinazione di CD45RA e CCR7 permette di distinguere quattro principali sottopopolazioni ovvero: le cellule naïve (CD45RA+CCR7+), le cellule della memoria centrale o TCM (CD45RA−CCR7+), le cellule della memoria effettrice o TEM (CD45RA−CCR7−), e le cellule della memoria effettrice che riesprimono CD45RA, definite TEMRA (CD45RA+CCR7−), generalmente associate a uno stadio avanzato di differenziamento [14]. All'interno di queste popolazioni, l'analisi dei recettori costimolatori CD27 e CD28 consente di caratterizzare ulteriormente il grado di differenziamento cellulare. La perdita di entrambi i marcatori identifica in genere cellule più differenziate, mentre il mantenimento di uno o di entrambi è associato a stadi meno avanzati. Anche l'espressione di CD57 può fornire informazioni aggiuntive, poiché si associa a un elevato differenziamento e a una ridotta capacità proliferativa. [14].

Infatti CD57, noto anche come HNK-1 (human natural killer-1), è un epitopo glucidico e si trova sulla superficie di numerose cellule NK e anche su una parte dei linfociti T CD8+, nei quali è associato a uno stadio avanzato di differenziamento, a una minore capacità di proliferare e a una spiccata attività citotossica. Principalmente HNK-1, è coinvolto nei meccanismi di riconoscimento e adesione tra cellule, ma nel sistema immunitario, l'accumulo di linfociti T CD57+ si osserva in associazione a infezioni virali croniche, condizioni infiammatorie e cambiamenti legati all'invecchiamento [18].

L’analisi di questo marcatore permette quindi di caratterizzare meglio i linfociti T altamente differenziati e contribuisce allo studio dell’immunosenescenza. La sua espressione considerata da sola, non è sufficiente a definire una cellula come senescente. Per questa motivazione si accompagna spesso ad un’analisi effettuata insieme alla perdita del recettore costimolatorio CD28 [18]. Questo fenomeno si osserva sia nel compartimento CD4+ sia in quello CD8+ e riflette una storia di ripetute stimolazioni antigeniche e di progressivo differenziamento verso funzioni effettrici. Le cellule con fenotipo CD28−CD57+ mostrano una maggiore capacità citotossica e specifici profili di espressione genica, anche se il significato biologico di questo fenotipo non è ancora del tutto chiarito [18].

Inoltre associato al fenotipo CD8+CD57+, è stata documentata la presenza di grandi quantità di citochine proinfiammarorie, tra cui IFN-γ e TNF-α, IL-5. Questi segnali infiammatori possono a loro volta favorire la sopravvivenza e l’espansione di queste popolazioni altamente differenziate. In particolare, l’IFN-γ stimola le cellule mieloidi e tissutali a esprimere e trans-presentare IL-15, una citochina che sostiene la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti T CD8+ con fenotipo CD28null e/o CD57+ [18]. Il TNF-α può invece ridurre l’espressione di CD28, favorendo un fenotipo CD28null, spesso associato alla presenza di CD57. Queste cellule possono quindi svolgere un duplice ruolo, infatti grazie alla loro attività citotossica contribuiscono all’eliminazione delle cellule anomale, ma attraverso il rilascio di mediatori proinfiammatori possono sostenere e amplificare l’infiammazione [18]. Queste espansioni cellulari, nel contesto delle malattie cardiovascolari, potrebbero fornire informazioni utili per valutare il rischio e l’entità del danno vascolare nei soggetti predisposti. Per chiarire maggiormente i meccanismi immunitari coinvolti nello sviluppo degli eventi cardiovascolari, sono necessari ulteriori studi. Una migliore comprensione di questo legame potrebbe favorire la messa a punto di strategie terapeutiche combinate, con l’obiettivo di prevenire o rallentare il danno cardiovascolare [18].

3. Obiettivi dello studio e approccio sperimentale

Nel contesto dell'immunopatologia della stenosi aortica, il presente studio è finalizzato alla caratterizzazione del profilo immunofenotipico delle cellule T presenti nel sangue periferico di pazienti affetti da stenosi aortica (AS) e di soggetti sani utilizzati come gruppo di controllo (HD).

L'analisi è stata condotta mediante citometria a flusso multiparametrica LSR Fortessa SORP a 20 parametri (BD) e successiva elaborazione dei dati attraverso la piattaforma Floreada.io, seguendo l'approccio metodologico descritto da Domínguez-del-Castillo et al. (2025) [6].

Gli obiettivi specifici dello studio sono:

- Caratterizzazione delle sottopopolazioni T: identificare e caratterizzare le principali popolazioni di linfociti T CD4+ e CD8+ presenti nel sangue periferico dei pazienti AS e dei controlli sani HD.
- Caratterizzazione dello stato maturativo: analizzare lo stato di differenziamento delle cellule T mediante la combinazione dei marcatori CD45RA e CCR7, distinguendo le popolazioni naïve (TN), central memory (TCM), effector memory (TEM) e terminally differentiated effector memory (TEMRA).
- Valutazione del fenotipo CD28/CD57: determinare la frequenza delle cellule T caratterizzate dal fenotipo CD28−CD57+, associato a un avanzato stato di differenziamento e a caratteristiche fenotipiche riconducibili all'immunosenescenza.
- Confronto tra pazienti AS e controlli sani: confrontare le frequenze delle popolazioni T analizzate nei pazienti con stenosi aortica e nei soggetti sani, con particolare attenzione alle popolazioni CD4+CD28−CD57+ e CD8+CD28−CD57+, al fine di individuare eventuali differenze nel profilo immunofenotipico T periferico associate alla patologia.

3.1 Selezione dei soggetti e raccolta dei campioni

Tutti i soggetti inclusi nello studio hanno fornito il consenso alla partecipazione. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale Universitario Reina Sofía di Córdoba, Spagna (numero di riferimento 4047, 19 dicembre 2019). L'analisi immunofenotipica è stata condotta su una coorte di 20 soggetti, suddivisi in 10 pazienti affetti da stenosi aortica (AS) e 10 donatori sani (HD), utilizzati come gruppo di controllo e appaiati ai pazienti per età e sesso. Per ciascun partecipante sono state registrate le principali caratteristiche cliniche e la presenza di eventuali comorbidità, tra cui obesità, ipertensione arteriosa e infezioni croniche da HIV, HCV e HBV. I campioni di sangue periferico sono stati raccolti presso l'Unità di Chirurgia Cardiovascolare e successivamente utilizzati per le analisi previste dal protocollo sperimentale [6]. Per quanto riguarda le attività di laboratorio e l'analisi citofluorimetrica, sono state svolte presso l'Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

3.2 Processazione dei campioni

I campioni di sangue periferico sono stati prelevati da ciascun partecipante mediante venipuntura e raccolti in provette contenenti EDTA. Per l'analisi immunofenotipica, 100 µL di sangue intero periferico sono stati aliquotati e incubati direttamente con gli anticorpi monoclonali fluorescenti selezionati per lo studio, previsti dal pannello citofluorimetrico. L'incubazione è stata condotta per 20 minuti a temperatura ambiente, al riparo dalla luce. Successivamente, è stata eseguita la lisi degli eritrociti con FACS Lysing Buffer (BD Becton Dickinson), seguendo le indicazioni del produttore [6]. I campioni sono stati acquisiti entro 1–4 ore mediante un citometro BD LSR Fortessa SORP a 20 parametri. I dati citofluorimetrici selezionati per il presente lavoro, sono stati rianalizzati mediante la piattaforma Floreada.io, applicando una strategia di gating basata sull'approccio immunofenotipico descritto da Domínguez-del-Castillo et al. (2025) [6].

3.3 Acquisizione citometrica e pannello anticorpale

Il pannello di anticorpi monoclonali utilizzato ha permesso di identificare le popolazioni di linfociti T, distinguere i loro stadi maturativi e valutare l'espressione di marcatori associati all'immunosenescenza. Il pannello dedicato ai linfociti T e la strategia di gating descritti da Domínguez-del-Castillo e colleghi (2025) sono stati utilizzati come riferimento metodologico, considerando gli aspetti pertinenti agli obiettivi del presente studio. In particolare, la Figura Supplementare S1, riportata alle pagine 1–2 del materiale supplementare [6], illustra le fasi iniziali della selezione delle cellule T. Il pannello degli autori comprende inoltre i marcatori impiegati nella presente analisi, che si è concentrata su queste popolazioni senza estendersi alle ulteriori valutazioni descritte nell'articolo.

Tabella 2. Marcatori utilizzati per la caratterizzazione immunofenotipica dei linfociti T

Marcatore	Fluorocromo	Significato biologico	Funzione nell'analisi
CD45	Alexa Fluor 700	Marcatore pan-leucocitario espresso sulla maggior parte delle cellule nucleate di origine ematopoietica.	Identificazione e selezione della popolazione leucocitaria.
CD3	PE-Cy5.5	Componente del complesso recettoriale TCR/CD3, caratteristica dei linfociti T.	Identificazione dei linfociti T CD3+ all'interno della popolazione linfocitaria.
CD56	BV421	Molecola frequentemente espressa ad alti livelli dalle cellule NK e da alcune sottopopolazioni linfocitarie.	Utilizzato come supporto alla discriminazione delle cellule T CD3+ dalle popolazioni caratterizzate da elevata espressione di CD56. Non considerato come variabile di risultato.
CD4	BB700	Co-recettore espresso prevalentemente dai linfociti T helper.	Identificazione e quantificazione dei linfociti T CD4+ e definizione del parent gate per le analisi successive.
CD8	APC-H7	Co-recettore espresso prevalentemente dai linfociti T citotossici.	Identificazione e quantificazione dei linfociti T CD8+ e definizione del parent gate per le analisi successive.
CCR7	BV786	Recettore chemochinico coinvolto nella migrazione dei linfociti verso gli organi linfoidi secondari; la sua espressione varia con lo stato di differenziamento.	Utilizzato insieme a CD45RA per distinguere le popolazioni TN, TCM, TEM e TEMRA.
CD45RA	BV605	Isoforma di CD45 espressa tipicamente dalle cellule T naïve e nuovamente presente nelle cellule TEMRA.	Utilizzato insieme a CCR7 per la definizione dello stato maturativo dei linfociti T.
CD28	PE-Cy7	Molecola costimolatoria fondamentale per l'attivazione delle cellule T; la sua perdita è associata a stadi avanzati di differenziamento.	Utilizzato con CD57 per caratterizzare il grado di differenziamento dei linfociti T e identificare il fenotipo CD28−CD57+.
CD57	FITC	Marcatore frequentemente espresso da popolazioni T altamente differenziate e associato a caratteristiche dell'immunosenescenza.	Utilizzato insieme a CD28 per la caratterizzazione dei fenotipi associati a differenziamento avanzato, con particolare attenzione alla popolazione CD28−CD57+.

3.4 Analisi dei dati

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita utilizzando la stessa strategia di gating per tutti i campioni, sia dei controlli sani (HD) sia dei pazienti con stenosi aortica (AS), così da identificare e caratterizzare le popolazioni cellulari secondo criteri uniformi. A partire dagli eventi totali acquisiti, i leucociti sono stati selezionati combinando l'espressione del marcatore pan-leucocitario CD45, coniugato ad Alexa Fluor 700, con il segnale di Side Scatter (SSC). Questo passaggio ha permesso di delimitare la popolazione leucocitaria, escludendo gli eventi CD45-negativi o scarsamente rappresentativi della popolazione cellulare di interesse.

All'interno della popolazione leucocitaria sono stati successivamente identificati i linfociti sulla base delle loro caratteristiche morfologiche, valutate attraverso i parametri di dispersione della luce. In particolare, la popolazione linfocitaria viene identificata in base alle caratteristiche morfologiche evidenziate dai parametri FSC-A e SSC-A. Il segnale FSC-A riflette le dimensioni cellulari, mentre il parametro SSC-A è correlato alla granularità e alla complessità interna della cellula. Successivamente, per selezionare i Singlets è stato usato il parametro FSC-A e FSC-H, selezionando gli eventi distribuiti lungo la popolazione corrispondente alle cellule singole. Questo passaggio è necessario per escludere gli aggregati cellulari e gli eventi costituiti da due o più cellule acquisite contemporaneamente e quindi per ridurre possibili interferenze nelle successive valutazioni dei segnali di fluorescenza. All'interno dei singlets è stata quindi identificata la popolazione dei linfociti T CD3+.

In particolare, il CD3 è un marcatore tipico dei linfociti T ed è stato impiegato per identificarne la popolazione. Il CD56 è stato invece utilizzato per riconoscere le cellule NK, anch'esse appartenenti al compartimento linfocitario ma distinte dai linfociti T per il diverso profilo di espressione dei marcatori di superficie. La popolazione T CD3+ è stata successivamente distinta in base all'espressione dei co-recettori CD4 e CD8, così da identificare i due principali compartimenti linfocitari. I linfociti T CD4+ svolgono soprattutto funzioni di coordinamento e regolazione della risposta immunitaria, mentre i linfociti T CD8+ sono prevalentemente associati ad attività citotossica. Nel diagramma CD4/CD8 sono inoltre visibili due popolazioni minoritarie, costituite dalle cellule CD4−CD8− (double negative) e CD4+CD8+ (double positive). In linea con gli obiettivi dello studio, le analisi successive sono state quindi effettuate separatamente sui compartimenti T CD4+ e T CD8+.

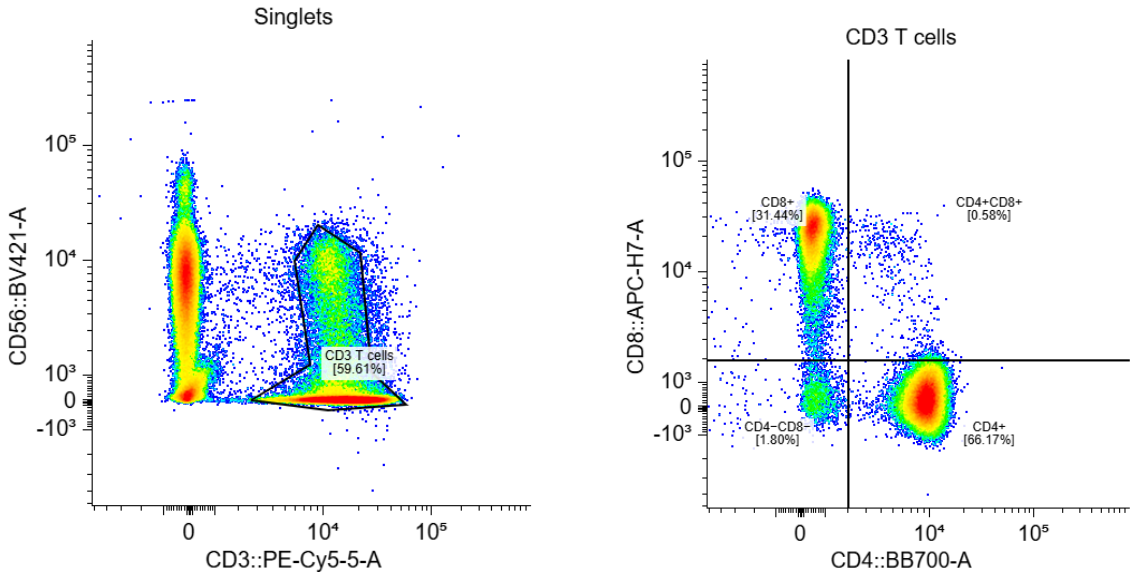


Figura 8. Strategia di identificazione dei linfociti T CD3+ e successiva suddivisione nei compartimenti CD4+ e CD8+. Nel gate dei singlets, la popolazione T viene identificata sulla base dell'espressione di CD3 e distinta dalla componente CD3−CD56+, compatibile con le cellule NK. Le cellule T CD3+ vengono quindi analizzate in funzione dell'espressione di CD4 e CD8, distinguendo le popolazioni CD4+, CD8+, CD4−CD8− e CD4+CD8+. Le immagini riportano il profilo immunofenotipico del soggetto HD049.

La caratterizzazione dello stato maturativo dei linfociti T CD4+ e CD8+ è stata effettuata attraverso l'analisi combinata dell'espressione di CCR7 (BV786) e CD45RA (BV605). Sulla base della diversa espressione dei due marcatori sono state individuate quattro principali sottopopolazioni:

1. T naïve (TN): CCR7+ CD45RA+, cellule che non hanno ancora acquisito caratteristiche proprie delle popolazioni di memoria;
2. T central memory (TCM): CCR7+ CD45RA−, cellule di memoria che mantengono l'espressione di CCR7;
3. T effector memory (TEM): CCR7− CD45RA−, cellule in uno stadio più avanzato di differenziamento, associate a caratteristiche effettrici;
4. T effector memory re-expressing CD45RA (TEMRA): CCR7− CD45RA+, popolazione altamente differenziata caratterizzata dalla perdita di CCR7 e dalla ri-espressione di CD45RA.

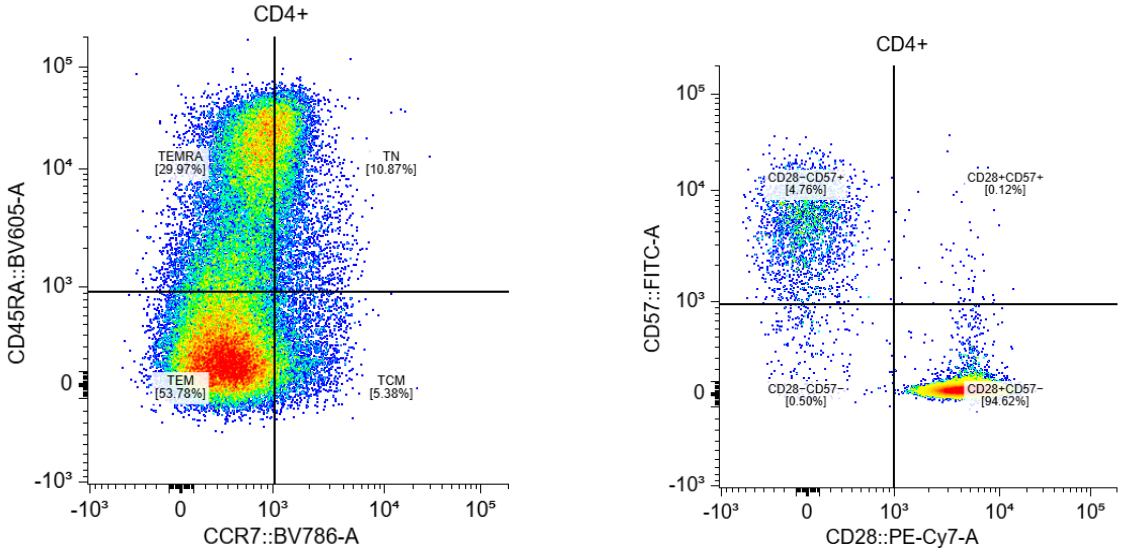


Figura 9. Caratterizzazione immunofenotipica del compartimento T CD4+ nel controllo sano HD050. A sinistra, analisi combinata dell'espressione di CCR7 e CD45RA per l'identificazione delle sottopopolazioni maturative TN (CCR7+CD45RA+), TCM (CCR7+CD45RA−), TEM (CCR7−CD45RA−) e TEMRA (CCR7−CD45RA+). A destra, analisi dell'espressione combinata di CD28 e CD57, utilizzata per distinguere i fenotipi CD28−CD57+, CD28+CD57+, CD28−CD57− e CD28+CD57− all'interno del compartimento CD4+.

4. Risultati e confronto tra pazienti AS e controlli HD

Dopo l'identificazione delle popolazioni T CD4+ e CD8+, ciascun compartimento è stato analizzato separatamente. All'interno delle popolazioni CD4+ e CD8+ è stata valutata l'espressione combinata di CD28 (PE-Cy7) e CD57 (FITC), al fine di caratterizzare il grado di differenziamento cellulare e di identificare fenotipi associati a caratteristiche di immunosenescenza.

Come descritto nei paragrafi precedenti, CD28 è una molecola co-stimolatoria espressa sulla superficie dei linfociti T e svolge un ruolo importante nei processi di attivazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare. Con il progressivo differenziamento e in seguito a stimolazioni antigeniche ripetute, la sua espressione può ridursi progressivamente fino a essere persa. La perdita di CD28 è associata a uno stadio avanzato di differenziamento dei linfociti T e a una ridotta capacità proliferativa. Un ulteriore marcatore utile per la caratterizzazione di queste popolazioni è CD57, la cui espressione è spesso associata a ripetute stimolazioni antigeniche. I linfociti T CD57+ possono mantenere una marcata attività effettrice e citotossica, pur presentando una minore capacità proliferativa in risposta a nuove stimolazioni. L'analisi combinata di CD28 e CD57 consente di identificare popolazioni T altamente differenziate e di descrivere fenotipi associati all'immunosenescenza, senza tuttavia permettere, da sola, di dimostrare uno stato di senescenza cellulare.

L'analisi immunofenotipica dei 10 controlli sani (HD) ha evidenziato una marcata eterogeneità interindividuale nella distribuzione delle diverse sottopopolazioni T. Nel complesso, il compartimento CD4+ risulta più marcato rispetto al compartimento CD8+, con frequenze medie pari al 70,71% e al 24,67%.

Tabella 3. Profilo immunofenotipico dei controlli sani (HD, n=10).

Soggetto	CD4+	CD8+	CD4 TN	CD4 TCM	CD4 TEM	CD4 TEMRA	CD4 CD28−CD57+	CD8 TN	CD8 TCM	CD8 TEM	CD8 TEMRA	CD8 CD28−CD57+
HD049	66,17	31,44	2,89	31,63	59,96	5,51	0,94	0,94	3,40	89,60	6,05	28,00
HD050	69,01	27,69	10,87	5,38	53,78	29,97	4,76	14,33	0,51	23,50	61,67	27,70
HD050_113	69,67	27,57	11,69	5,93	54,05	28,34	5,22	13,08	0,48	23,75	62,69	27,66
HD051	82,18	14,74	24,22	7,60	42,28	25,90	0,09	10,90	1,27	34,14	53,69	3,66
HD052	77,38	20,02	29,06	7,60	32,38	30,96	0,07	6,38	1,46	43,00	49,16	0,89
HD053	72,10	23,14	29,87	8,20	34,93	27,01	0,01	8,09	1,85	35,26	54,81	0,96
HD054	61,63	30,18	31,23	7,39	32,71	28,66	0,13	26,19	0,71	17,92	55,18	7,92
HD055	62,84	27,61	15,39	7,64	46,73	30,24	2,73	11,26	0,64	25,34	62,76	12,77
HD059	73,19	22,76	12,28	18,97	54,05	14,70	0,02	4,26	1,70	30,78	63,26	2,89
HD060	72,96	21,53	15,38	5,86	45,33	33,42	5,18	7,33	0,96	35,94	55,77	13,91
MEDIA HD	70,71	24,67	18,29	10,62	45,62	25,47	1,91	10,28	1,30	35,92	52,50	12,64
SD HD	5,98	4,88	9,17	7,92	9,40	8,20	2,20	6,56	0,84	19,24	16,13	10,78

In merito alle analisi condotte sui controlli sani HD, il compartimento CD4+ è caratterizzato principalmente dalla presenza di cellule TEM, che rappresentano in media il 45,62% della popolazione analizzata. Le TEMRA costituiscono il 25,47%, mentre le cellule TN e TCM raggiungono frequenze medie del 18,29% e del 10,62%. La distribuzione osservata indica quindi una prevalenza delle cellule di memoria effettrici, affiancata però da una quota rilevante di popolazioni meno differenziate, in particolare di cellule naïve. Questa organizzazione non è identica in tutti i soggetti, infatti le cellule TN raggiungono percentuali più elevate in HD052, HD053 e HD054, mentre HD049 presenta una quota di TCM particolarmente consistente. Nonostante queste differenze individuali, le TEM rappresentano la popolazione più abbondante nel compartimento CD4+ in tutti i dieci controlli analizzati.

Nel compartimento CD8+ la distribuzione assume invece caratteristiche differenti. Le cellule TEMRA costituiscono mediamente il 52,50%, superando le TEM, che rappresentano il 35,92%. Le cellule TN raggiungono una frequenza media del 10,28%, mentre le TCM rimangono più limitate, con un valore medio dell'1,30%. In nove dei dieci controlli, la quota di TEMRA è superiore a quella delle TEM, solo il paziente HD049 rappresenta l'unica eccezione, con prevalenza delle cellule TEM. Si delinea quindi una diversa organizzazione maturativa tra i due compartimenti infatti nei CD4+ prevalgono le TEM, mentre nei CD8+ assumono maggiore rilievo le TEMRA.

L'analisi combinata dell'espressione di CD28 e CD57 consente di approfondire ulteriormente la caratterizzazione fenotipica dei linfociti T. Nel compartimento CD4+, la popolazione CD28−CD57+ presenta una frequenza media dell'1,91% e si mantiene su valori contenuti, anche se la distribuzione del fenotipo CD28−CD57+ varia tra i diversi soggetti. Nel compartimento CD4+, HD052, HD053 e HD059 presentano percentuali prossime allo zero, mentre HD050, HD050_113 e HD060 raggiungono valori intorno al 5%.

Nei CD8+, questa popolazione è più rappresentata, con una frequenza media del 12,64%, anche se mostra differenze ancora più marcate tra i singoli controlli. I valori più bassi si osservano in HD052, HD053 e HD059, rispettivamente pari allo 0,89%, 0,96% e 2,89%, mentre HD049, HD050 e HD050_113 raggiungono percentuali prossime al 28%. Questi dati mostrano che il fenotipo CD8+ CD28−CD57+, pur essendo associato a uno stadio avanzato di differenziamento può essere presente anche nei soggetti sani con frequenze molto diverse da individuo a individuo. Infatti è poco rappresentato nei CD4+, mentre nei CD8+ assume maggiore rilevanza e mostra una notevole variabilità tra i diversi controlli, anche se la sua sola presenza, non è sufficiente a distinguere una condizione patologica. Quindi è possibile osservare come nei soggetti HD si delinea un assetto differente tra i compartimenti CD4+ e CD8+. Questa eterogeneità nei controlli sani rappresenta un elemento importante da considerare nel successivo confronto con i pazienti affetti da stenosi aortica.

Tabella 4. Profilo immunofenotipico dei pazienti con stenosi aortica (AS, n=10)

Soggetto	CD4+	CD8+	CD4 TN	CD4 TCM	CD4 TEM	CD4 TEMRA	CD4 CD28−CD57+	CD8 TN	CD8 TCM	CD8 TEM	CD8 TEMRA	CD8 CD28−CD57+
AS123	76,85	20,18	13,73	2,87	28,78	54,62	14,81	20,68	1,60	16,86	60,87	38,47
AS124	57,97	35,18	1,05	7,08	83,27	8,61	2,70	0,30	0,51	46,24	52,95	33,94
AS126	49,44	42,51	1,17	1,45	57,07	40,30	8,32	2,57	0,07	35,35	62,01	53,31
AS128	62,04	30,46	20,86	15,55	51,24	12,34	2,18	6,23	1,47	32,22	60,09	16,99
AS129	48,06	40,48	14,34	6,54	40,40	38,72	29,83	10,14	0,40	23,21	66,25	62,06
AS130	39,41	41,91	5,45	6,95	64,93	22,68	13,22	3,57	0,21	13,50	82,71	36,45
AS131	41,08	40,90	7,23	6,35	62,87	23,55	5,29	1,83	0,14	15,51	82,53	55,85
AS133	63,64	34,06	2,23	4,88	69,84	23,05	0,35	3,64	2,68	31,42	62,26	0,05
AS134	44,16	51,37	26,25	18,33	41,28	14,14	1,04	4,90	1,34	26,38	67,38	45,16
AS135	62,10	33,77	25,97	10,99	33,78	29,25	0,59	5,44	0,81	17,89	75,86	40,37
MEDIA AS	54,48	37,08	11,83	8,10	53,35	26,73	7,83	5,93	0,92	25,86	67,29	38,27
SD AS	11,36	7,97	9,39	5,08	16,46	13,59	8,58	5,54	0,79	9,94	9,46	17,58

L’analisi immunofenotipica condotta nei pazienti affetti da stenosi aortica, mostra una prevalenza delle cellule T CD4+ rispetto alle CD8+, con frequenze medie pari al 54,48% e al 37,08%. La distribuzione delle diverse sottopopolazioni evidenzia però caratteristiche differenti nei due compartimenti.

Nel compartimento CD4+ emerge una prevalenza delle cellule TEM, che costituiscono la popolazione più abbondante, con una frequenza media del 53,35%, seguite dalle TEMRA, pari al 26,73%. Le cellule TN e TCM mostrano una percentuale dell’11,83% e dell’8,10%, indicando che anche le popolazioni meno differenziate mantengono una quota significativa. Nella maggior parte dei pazienti le TEM superano le TEMRA, mentre il paziente AS123 presenta un andamento differente, con una quota di TEMRA pari al 54,62% e di TEM pari al 28,78%. Il compartimento CD4+ dei pazienti AS appare quindi caratterizzato soprattutto da cellule di memoria, pur mantenendo una presenza apprezzabile di cellule a uno stadio maturativo meno avanzato.

Osservando il compartimento CD8+ si denota un profilo più orientato verso fasi avanzate di differenziamento. Le cellule TEMRA raggiungono una frequenza media del 67,29%, mentre le TEM si attestano al 25,86%. Le cellule TN sono presenti con una media del 5,93%, mentre le TCM rimangono su valori più bassi, pari allo 0,92%. In tutti i pazienti analizzati, la quota di TEMRA supera quella delle TEM. Le percentuali più alte si rilevano in AS130 82,71%, AS131 82,53% e AS135 75,86%. Questi dati indicano quindi che, nel gruppo AS, il compartimento CD8+ è caratterizzato da una netta prevalenza di cellule con un grado di maturazione più avanzato.

L’analisi congiunta di CD28 e CD57 consente di definire meglio il grado di differenziamento delle cellule T. Nel compartimento CD8+, la popolazione CD28−CD57+ raggiunge una frequenza media del 38,27%, con una notevole variabilità tra i diversi pazienti. Le percentuali più alte si rilevano in AS129 62,06%, AS131 55,85% e AS126 53,31% mentre in AS133 questa popolazione è quasi assente infatti corrisponde allo 0,05%.

Nel compartimento CD4+, lo stesso fenotipo si mantiene su livelli più contenuti, con una media del 7,83%. Anche in questo caso la distribuzione non è uniforme tra i soggetti e il valore più alto si osserva in AS129, con una frequenza del 29,83%.

Considerando insieme il profilo maturativo e l’espressione di CD28 e CD57, nel compartimento CD8+ emergono le caratteristiche più marcate, con una prevalenza delle cellule TEMRA e una maggiore frequenza di cellule CD28−CD57+ rispetto ai CD4+. Nei singoli pazienti questi due aspetti non sono strettamente legati, infatti una quota elevata di TEMRA non corrisponde sempre a una frequenza altrettanto elevata di cellule CD28−CD57+.

Per esempio nel paziente AS133, le cellule TEMRA costituiscono il 62,26% del compartimento CD8+, mentre il fenotipo CD28−CD57+ raggiunge soltanto lo 0,05%.

Questo confronto indica che i fenotipi definiti da CCR7/CD45RA e da CD28/CD57 descrivono aspetti differenti del differenziamento delle cellule T. Per questo motivo, i due profili devono essere considerati in modo complementare e nessuno dei due, isolatamente, può essere interpretato come indicatore sufficiente di immunosenescenza.

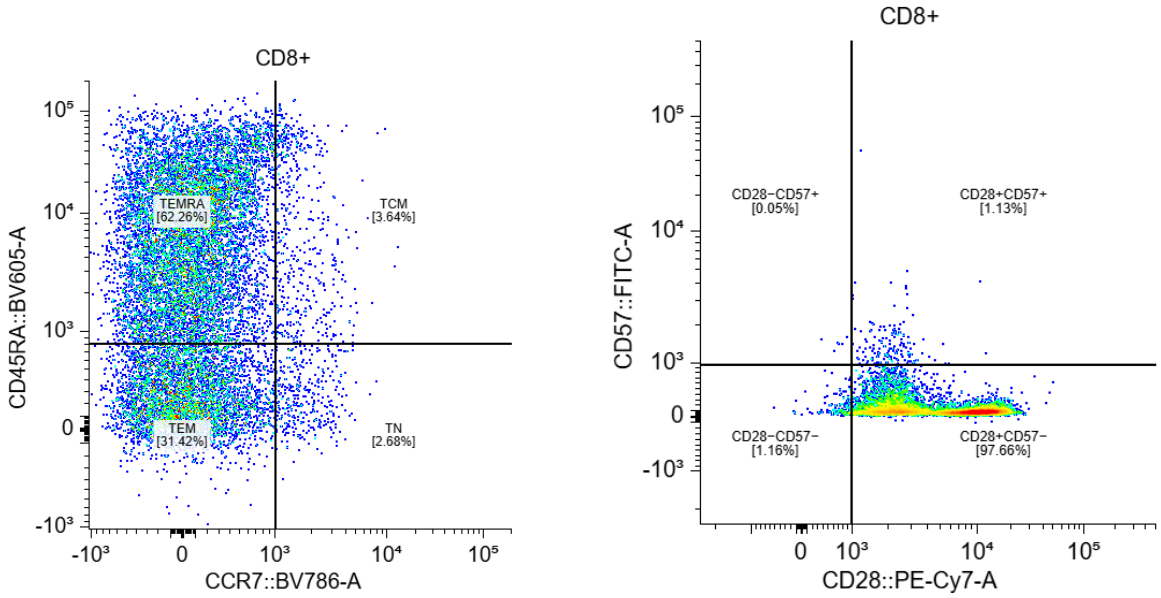


Figura 10. Esempio di analisi immunofenotipica del compartimento T CD8+ nel paziente AS133. A sinistra è riportata la distribuzione delle sottopopolazioni maturative sulla base dell'espressione di CCR7 e CD45RA; a destra è mostrata la caratterizzazione fenotipica mediante l'espressione combinata di CD28 e CD57.

4.1 Discussione dei principali risultati immunofenotipici

Il confronto descrittivo tra i pazienti con stenosi aortica e i controlli sani evidenzia una diversa distribuzione delle principali popolazioni T periferiche. Nei controlli HD, le cellule CD4+ raggiungono una frequenza media del 70,71%, mentre le CD8+ si attestano al 24,67%. Nei pazienti AS, invece, la quota media dei CD4+ scende al 54,48%, mentre quella dei CD8+ aumenta al 37,08%. Il dato che emerge con maggiore chiarezza è uno spostamento relativo del compartimento T nei pazienti AS, caratterizzato da una minore presenza di cellule CD4+ e da una maggiore quota di cellule CD8+ rispetto ai controlli sani.

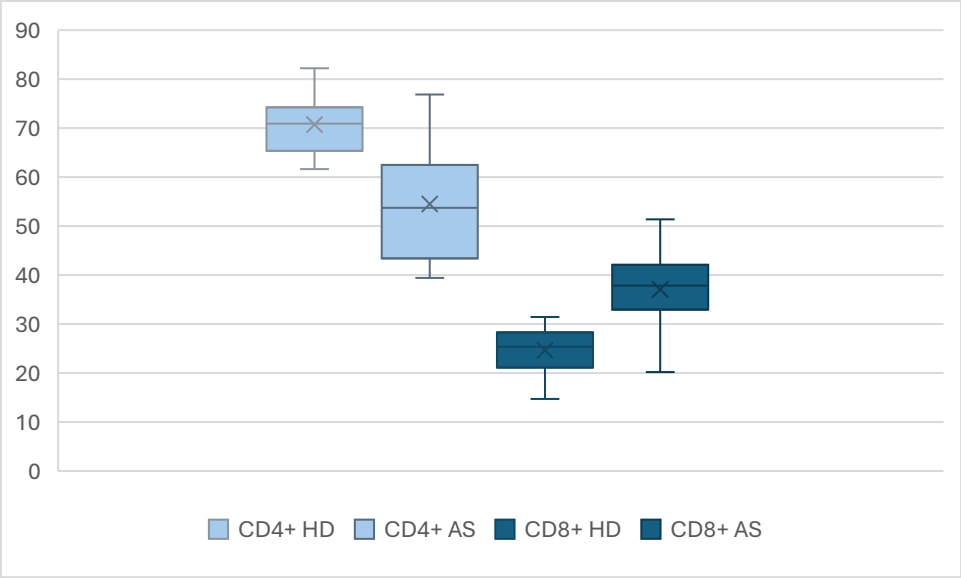


Figura 11. Distribuzione delle frequenze percentuali dei linfociti T CD4+ e CD8+ nei controlli sani (HD) e nei pazienti con stenosi aortica (AS), rappresentata mediante box-and-whisker plot (n = 10 per gruppo).

Come illustrato in Figura 11, la distribuzione delle frequenze dei linfociti T CD4+ e CD8+ evidenzia un diverso assetto del compartimento T periferico nei due gruppi. In particolare nei controlli sani, il compartimento CD4+ raggiunge una frequenza media del 70,71%, mentre nei pazienti AS la media è pari al 54,48%. Per i CD8+ si osserva invece un andamento opposto, la media è pari al 24,67% negli HD, mentre nei pazienti AS la frequenza media raggiunge il 37,08%. Si osserva quindi una diversa composizione del compartimento T periferico nei due gruppi, con una maggiore prevalenza relativa dei CD4+ nei controlli HD e una maggiore quota dei CD8+ nei pazienti AS. I dati emersi, descrivono una diversa distribuzione delle principali popolazioni T tra i due gruppi, ma non permettono di attribuire a tale assetto un significato specifico in termini di immunosenescenza. Per interpretare meglio il significato biologico è necessario integrare queste osservazioni con l'analisi dello stato maturativo e dei marcatori di differenziamento.

Per approfondire le differenze osservate tra i due gruppi, è stato analizzato lo stato maturativo dei linfociti T mediante l'espressione combinata di CCR7 e CD45RA. Nel compartimento CD8+ (Figura 12), le cellule TEMRA costituiscono la popolazione prevalente sia nei controlli sani sia nei pazienti con stenosi aortica, con frequenze medie pari al 52,50% negli HD e al 67,29% negli AS. Le cellule TEM raggiungono invece il 35,92% nei controlli e il 25,86% nei pazienti AS. Le popolazioni TN sono più presenti negli HD (10,28%) rispetto agli AS (5,93%), mentre le TCM rimangono contenute in entrambi i gruppi, con valori medi dell'1,30% e dello 0,92%.

Nel gruppo AS si osserva quindi un profilo CD8+ più spostato verso la componente TEMRA, accompagnato da una riduzione relativa delle TEM e delle popolazioni meno differenziate. Questo andamento suggerisce una maggiore presenza, nei pazienti con stenosi aortica, di cellule CD8+ collocate in uno stadio maturativo avanzato.

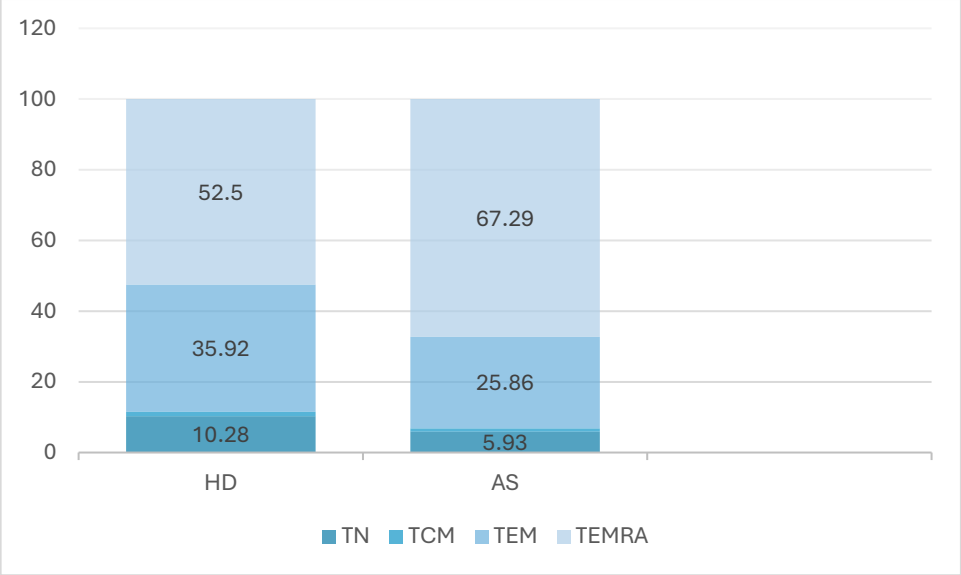


Figura 12. Distribuzione delle sottopopolazioni TN, TCM, TEM e TEMRA nel compartimento T CD8+ dei controlli sani (HD) e dei pazienti con stenosi aortica (AS). I valori indicano la frequenza percentuale media di ciascuna sottopopolazione sul totale delle cellule CD8+ analizzate (n = 10 per gruppo).

I pazienti con stenosi aortica mostrano quindi una distribuzione più orientata verso la componente TEMRA, accompagnata da una riduzione delle TEM e, in parte, delle TN. Non si tratta di popolazioni differenti tra sani e pazienti, quanto di un diverso equilibrio tra le stesse sottopopolazioni maturative.

Dal punto di vista biologico, questo assetto è compatibile con una maggiore presenza, nel gruppo AS, di cellule CD8+ che hanno raggiunto fasi più avanzate del processo di differenziamento. Le TEMRA sono infatti identificate dalla perdita di CCR7 e dalla riespressione di CD45RA, ma questa classificazione descrive principalmente lo stato maturativo della cellula e non permette, da sola, di definirne la senescenza. Per questo motivo, l'analisi di CCR7 e CD45RA viene affiancata alla valutazione di CD28 e CD57, così da ottenere informazioni ulteriori sui fenotipi associati al differenziamento avanzato e all'immunosenescenza.

Il confronto del fenotipo CD8+ CD28−CD57+ rende ancora più evidente la differenza tra i due gruppi. Nei controlli sani questa popolazione presenta una frequenza media del 12,64%, con una mediana del 10,35%, mentre nei pazienti AS la media sale al 38,27% e la mediana al 39,42%. Rimane comunque una notevole variabilità tra i singoli soggetti, per cui il fenotipo non può essere considerato esclusivo della stenosi aortica. Sul piano descrittivo, però, la distanza tra HD e AS è più marcata per le cellule CD8+ CD28−CD57+ rispetto a quella osservata considerando soltanto la distribuzione TEM/TEMRA.

La lettura congiunta dei due profili suggerisce quindi che, nei pazienti AS, il compartimento CD8+ presenti più frequentemente caratteristiche riconducibili a uno stato di differenziamento avanzato, senza che uno dei due parametri possa essere interpretato isolatamente come prova diretta di immunosenescenza.

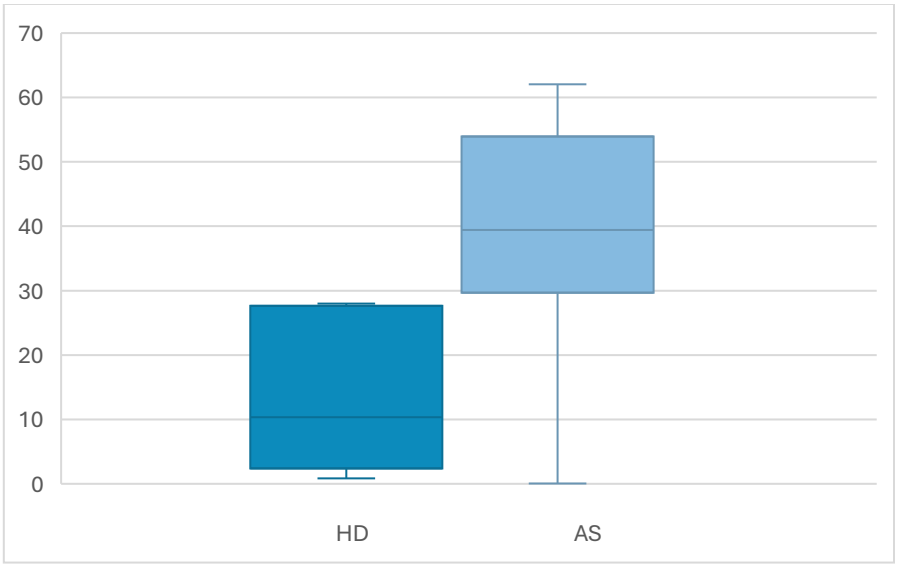


Figura 13. Distribuzione del fenotipo CD8+ CD28−CD57+ nei controlli sani (HD) e nei pazienti con stenosi aortica (AS). Il boxplot mostra le frequenze individuali nei due gruppi analizzati (n = 10 per gruppo).

Il boxplot evidenzia una distribuzione tendenzialmente spostata verso valori più elevati nel gruppo AS, pur mettendo in luce una notevole variabilità tra i singoli soggetti. Nei controlli sani, la frequenza delle cellule CD8+ CD28−CD57+ varia dallo 0,89% al 28,00%, mentre nei pazienti con stenosi aortica l'intervallo è più ampio, compreso tra lo 0,05% e il 62,06%. La differenza tra i due gruppi si osserva anche nei valori centrali della distribuzione infatti negli HD la media è pari al 12,64% e la mediana al 10,35%, mentre negli AS raggiungono rispettivamente il 38,27% e il 39,42%. I dati indicano quindi una maggiore presenza del fenotipo CD8+ CD28−CD57+ nei pazienti con stenosi aortica, senza tuttavia delineare un andamento uniforme all'interno dei due gruppi.

Le osservazioni ottenute trovano riscontro, almeno in parte, nel lavoro di Domínguez-del-Castillo et al. (2025). Nel suo lavoro infatti, i pazienti con stenosi aortica associata a malattia coronarica presentano un profilo immunitario caratterizzato da una maggiore presenza di popolazioni T CD57+ e CD28null con caratteristiche citotossiche. Gli autori distinguono tale quadro da quello osservato nei pazienti con sola malattia coronarica, maggiormente associato all'attivazione immunitaria. Sebbene la coorte analizzata nel presente lavoro non sia direttamente sovrapponibile a quella descritta da Domínguez-del-Castillo et al., i risultati ottenuti vanno nella stessa direzione, indicando nei pazienti con stenosi aortica una maggiore presenza di popolazioni T CD8+ con caratteristiche associate a stadi avanzati di differenziamento. Questo andamento emerge sia dalla diversa composizione del compartimento T periferico, con una quota più elevata di cellule CD8+ nei pazienti AS, sia dal profilo maturativo, caratterizzato da una maggiore presenza di cellule TEMRA.

Tale popolazione rimane ben rappresentata anche nei controlli sani, confermando che il solo stato maturativo non è sufficiente a distinguere in modo netto i due gruppi. Un elemento più marcato emerge dall'analisi combinata di CD28 e CD57. Il fenotipo CD8+ CD28−CD57+ risulta infatti più frequente nei pazienti con stenosi aortica, pur mostrando una notevole variabilità individuale ed essendo presente, in alcuni casi, anche nei soggetti sani. Questo dato suggerisce quindi una diversa distribuzione di cellule altamente differenziate tra i due gruppi, senza attribuire a tale fenotipo un significato esclusivo per la patologia. Le osservazioni ottenute risultano inoltre coerenti con quanto riportato in letteratura sul possibile coinvolgimento delle cellule T CD8+ nella stenosi aortica.

Da ciò che è emerso, nel tessuto valvolare calcificato si riscontra la presenza di linfociti T attivati ed espansioni clonali. Se consideriamo anche il legame tra le cellule altamente differenziate e l'aggravarsi della calcificazione, emerge un quadro interessante cioè le alterazioni che misuriamo nel sangue periferico non sono fenomeni isolati, ma riflettono probabilmente una riorganizzazione molto più ampia del sistema immunitario adattativo in risposta alla malattia.

Il confronto con lo studio di Domínguez-del-Castillo et al. richiede comunque cautela, poiché le coorti considerate non sono direttamente sovrapponibili. I due campioni analizzati non si possono infatti sovrapporre perfettamente. Nel presente lavoro, invece, vengono confrontati pazienti con stenosi aortica e controlli sani, mentre nello studio di riferimento erano inclusi anche soggetti con malattia coronarica isolata e pazienti con stenosi aortica associata a CAD.

Nonostante questa differenza, il modello immunofenotipico proposto dagli autori rimane utile per interpretare le modificazioni osservate nel compartimento T periferico. Pur tenendo conto di queste diversità, il loro modello immunofenotipico resta un ottimo punto di riferimento per aiutarci a leggere i cambiamenti che abbiamo notato nel compartimento T periferico.

Nel nostro campione, le differenze tra HD e AS emergono soprattutto a livello del compartimento CD8+. Non è un singolo parametro a distinguere i due gruppi, quanto piuttosto l'insieme di più caratteristiche cioè di una maggiore presenza relativa di cellule CD8+, uno spostamento del profilo maturativo verso le TEMRA e un aumento del fenotipo CD28−CD57+. Considerati insieme, questi aspetti delineano nei pazienti con stenosi aortica un profilo più orientato verso stadi avanzati di differenziamento. Bisogna ugualmente interpretare questi dati con una certa prudenza. Queste stesse popolazioni cellulari si trovano infatti anche nei pazienti sani con grandi variazioni da un individuo all'altro, motivo per cui non possiamo definirle un tratto esclusivo della patologia valvolare. Un altro aspetto da considerare è che la nostra indagine si ferma all'osservazione dei marcatori immunofenotipici e non include test funzionali per misurare la capacità di proliferazione, la produzione di citochine o la lunghezza dei telomeri. I risultati descrivono quindi caratteristiche compatibili con l'immunosenescenza, ma non consentono di dimostrare direttamente uno stato di senescenza cellulare.

4.2 Limitazioni studio

I risultati ottenuti devono essere interpretati tenendo conto di alcuni limiti del presente lavoro. Un primo aspetto da considerare è il numero ristretto dei partecipanti. Avendo coinvolto in totale venti soggetti equamente divisi, di cui 10 pazienti con stenosi aortica (AS) e 10 controlli sani (HD), l'analisi è stata condotta esclusivamente in termini descrittivi, senza applicare test statistici. Le differenze osservate tra i due gruppi descrivono quindi l'andamento del campione analizzato, ma non consentono di dimostrare in modo conclusivo un'associazione tra i fenotipi immunitari considerati e la stenosi aortica. Un ulteriore limite è legato al disegno monocentrico e trasversale dello studio.

Tutti i campioni provengono dall'Ospedale Universitario Reina Sofía di Córdoba e sono stati analizzati in un unico momento temporale. Di conseguenza, non è possibile stabilire una relazione causale tra le alterazioni immunofenotipiche osservate e la malattia, né determinare se tali caratteristiche compaiano prima, durante o in seguito alla progressione della stenosi valvolare.

Infine, la caratterizzazione si è basata sull'espressione di marcatori di superficie dei linfociti T e non ha incluso valutazioni funzionali, come la capacità proliferativa, la produzione di citochine, la lunghezza dei telomeri o altri indicatori direttamente collegati alla senescenza cellulare. La presenza di cellule TEMRA o del fenotipo CD28−CD57+ non può quindi essere considerata, da sola, per certificare in maniera inequivocabile una vera e propria senescenza cellulare. Queste popolazioni vengono piuttosto interpretate come espressione di uno stato di differenziamento avanzato, compatibile con caratteristiche immunofenotipiche associate all'immunosenescenza.

4.3 Conclusioni

Le evidenze raccolte offrono un'interessante chiave di lettura sul legame tra stenosi aortica e sistema immunitario. Questo studio ha infatti analizzato, mediante citometria a flusso multiparametrica, il profilo dei linfociti T circolanti nei pazienti con stenosi aortica (AS) e nei controlli sani (HD), prendendo in considerazione la distribuzione delle popolazioni CD4+ e CD8+, lo stato maturativo definito dall'espressione di CCR7 e CD45RA e la caratterizzazione fenotipica mediante CD28 e CD57. Dal confronto tra i due gruppi emerge soprattutto un diverso assetto del compartimento CD8+. Nei pazienti con stenosi aortica si osserva infatti una maggiore presenza di cellule collocate in stadi avanzati di differenziamento, evidenziata sia dalla componente TEMRA sia dal fenotipo CD28−CD57+. Queste caratteristiche indicano un profilo immunitario che richiama fortemente i tipici cambiamenti legati all'immunosenescenza pur senza dimostrare in modo inequivocabile un reale stato di senescenza cellulare. Questa precisazione è doverosa se teniamo conto della grande variabilità personale emersa dalle analisi e del fatto che le stesse cellule si trovano normalmente anche nei soggetti sani. Di conseguenza non possiamo considerare i nostri risultati come l'individuazione di un fenotipo immunitario esclusivo e specifico della stenosi aortica. In ogni caso resta evidente come la patologia valvolare si accompagni a un generale rimodellamento della risposta immunitaria adattativa che si manifesta con particolare forza proprio a carico delle cellule CD8+ giunte a un livello avanzato di differenziamento.

Le osservazioni ottenute trovano un riscontro parziale nella letteratura recente e, in particolare, nel lavoro di Domínguez-del-Castillo et al., nel quale sono state descritte alterazioni delle popolazioni T altamente differenziate in pazienti con stenosi aortica associata a malattia coronarica. Le differenze tra le coorti non permettono un confronto diretto, ma i risultati dei due studi convergono nell'indicare un possibile coinvolgimento del compartimento T periferico nella malattia valvolare. La natura descrittiva e preliminare del presente lavoro lascia aperti diversi aspetti che meritano di essere approfonditi. Un primo sviluppo potrebbe riguardare l'ampliamento della coorte e il monitoraggio longitudinale dei pazienti, associando l'analisi immunofenotipica a valutazioni ecocardiografiche periodiche. Questo permetterebbe di osservare se le modificazioni delle popolazioni TEMRA e CD28−CD57+ si mantengano nel tempo e se possano essere messe in relazione con l'evoluzione della stenosi aortica e con il quadro clinico dei pazienti. Un ulteriore elemento di interesse sarebbe valutare il sierostato per il citomegalovirus (CMV), poiché un'infezione persistente da CMV potrebbe influenzare la distribuzione delle popolazioni di linfociti T altamente differenziati.T. Integrare questa informazione consentirebbe di interpretare con maggiore precisione le differenze osservate e di distinguere meglio il possibile contributo della patologia valvolare da quello di altri fattori in grado di influenzare il sistema immunitario.

Per completare il quadro delineato finora diventerà indispensabile affiancare all'analisi fenotipica un'indagine prettamente funzionale. Serviranno quindi studi mirati per valutare la capacità proliferativa e la produzione di citochine integrando le analisi con altri indicatori biologici tipici della senescenza. Questo permetterebbe di comprendere se ai fenotipi osservati corrispondano effettive alterazioni funzionali e di definirne con maggiore precisione il significato biologico. Nel complesso, questi approfondimenti potrebbero contribuire a chiarire meglio il ruolo delle popolazioni T altamente differenziate nella stenosi aortica e a stabilire se le modificazioni rilevate nel sangue periferico riflettano principalmente il contesto infiammatorio associato alla malattia oppure possano essere coinvolte, almeno in parte, nella sua progressione.

BIBLIOGRAFIA

1. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, 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(16):1783-1791. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767.

2. Bian W, Wang Z, Sun C, Zhang DM. Pathogenesis and molecular immune mechanism of calcified aortic valve disease. Front Cardiovasc Med. 2021;8:765419. doi:10.3389/fcvm.2021.765419.

3. Liu Z, Liang Q, Ren Y, Guo C, Ge X, Wang L, et al. Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. Signal Transduct Target Ther. 2023;8(1):200. doi:10.1038/s41392-023-01451-2.

4. Rodrigues LP, Teixeira VR, Alencar-Silva T, Simonassi-Paiva B, Pereira RW, Pogue R, et al. Hallmarks of aging and immunosenescence: connecting the dots. Cytokine Growth Factor Rev. 2021;59:9-21. doi:10.1016/j.cytogfr.2021.01.006.

5. Broadley I, Pera A, Morrow G, Davies KA, Kern F. Expansions of cytotoxic CD4+CD28- T cells drive excess cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory conditions and are triggered by CMV infection. Front Immunol. 2017;8:195. doi:10.3389/fimmu.2017.00195.

6. Domínguez-del-Castillo JJ, Álvarez-Heredia P, Reina-Alfonso I, Vallejo-Bermúdez MI, López-Romero R, Moreno-Moreno JA, et al. Divergent immune pathways in coronary artery disease and aortic stenosis: the role of chronic inflammation and senescence. Int J Mol Sci. 2025;26(11):5248. doi:10.3390/ijms26115248.

7. Osnabrugge RLJ, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, 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(11):1002-1012. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.015.

8. Chen HY, Engert JC, Thanassoulis G. Risk factors for valvular calcification. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2019;26(2):96-102. doi:10.1097/MED.0000000000000471.

9. Coffey S, Cox B, Williams MJA. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol. 2014;63(25 Pt A):2852-2861. doi:10.1016/j.jacc.2014.04.018.

10. Mainiero F, Misasi R, Sorice M, editors. Patologia generale & fisiopatologia generale. Tomi I-II. 6ª ed. Padova: Piccin Nuova Libraria; 2018-2019.

11. Winchester R, Wiesendanger M, O'Brien W, Zhang HZ, Maurer MS, Gillam LD, et al. Circulating activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis. J Immunol. 2011;187(2):1006-1014. doi:10.4049/jimmunol.1003521.

12. Nagy E, Lei Y, Martínez-Martínez E, Body SC, Schlotter F, Creager M, et al. Interferon-γ released by activated CD8+ T lymphocytes impairs the calcium resorption potential of osteoclasts in calcified human aortic valves. Am J Pathol. 2017;187(6):1413-1425. doi:10.1016/j.ajpath.2017.02.012.

13. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature. 1999;401(6754):708-712. doi:10.1038/44385.

14. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Özcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. Immun Ageing. 2008;5:6. doi:10.1186/1742-4933-5-6.

15. Slaets H, Veeningen N, de Keizer PLJ, Hellings N, Hendrix S. Are immunosenescent T cells really senescent? Aging Cell. 2024 Oct;23(10):e14300. doi: 10.1111/acel.14300.

16. Adu-Berchie K, Obuseh FO, Mooney DJ. T Cell Development and Function. Rejuvenation Res. 2023;26(4):126-138. doi:10.1089/rej.2023.0015.

17. Álvarez-Heredia P, Domínguez-del-Castillo JJ, Reina-Alfonso I, Gutiérrez-González C, Hassouneh F, Batista-Duharte A, Trujillo-Aguilera A, López-Romero R, Muñoz I, Solana R, Pera A. A Straightforward Cytometry-Based Protocol for the Comprehensive Analysis of the Inflammatory Valve Infiltrate in Aortic Stenosis. Int J Mol Sci. 2023;24(3):2194. doi:10.3390/ijms24032194.

18. Vallejo-Bermúdez IM, Miranda-Echagüe MR, Fernández-Álvarez S, Reina-Alfonso I, Blanca-Pariente L, Batista-Duharte A, Pera A. CD57-Expressing Lymphocytes: From Chronic Viral Response to Age-Related Inflammation. Cells. 2026;15(5):403. doi:10.3390/cells15050403.

19. Shah SM, Shah J, Lakey SM, Garg P, Ripley DP. Pathophysiology, emerging techniques for the assessment and novel treatment of aortic stenosis. Open Heart. 2023;10:e002244. doi:10.1136/openhrt-2022-002244.