



**Fundació**  
La Marató de TV3  
21º SIMPOSIUM  
Enfermedades del corazón



## **ANEURISMAS DE AORTA ASCENDENTE: FACTORES BIOMOLECULARES Y BIOMECÁNICOS**

**Arturo Evangelista Masip**

Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

**Juan Miguel Redondo Moya**

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III - Madrid

**Per Eriksson**

Karolinska Institutet Stockholm

## 1. Resumen

Los aneurismas de aorta ascendente pueden ocurrir como resultado de factores genéticos que predisponen al debilitamiento de la pared de la aorta, factores biomecánicos que aumentan el estrés de la pared o de corte (*shear stress*) y de la aterosclerosis. El objetivo principal del presente estudio era determinar los mecanismos biomecánicos, moleculares y epigenéticos que favorecen la dilatación de la aorta ascendente.

Desde el centro coordinador, **equipo 1**, se estudiaron pacientes con dilatación de la aorta ascendente con diferentes etiologías: síndrome de Marfan, válvula aórtica bicúspide y enfermedad degenerativa o hipertensiva. Se realizó un estudio 4D-MRI en todos los pacientes para analizar la distensibilidad aórtica, la velocidad de la onda del pulso, la tensión de la pared, la tensión de corte de la pared, así como otros parámetros de flujo. El **equipo 2** analizó modelos murinos con enfermedad aórtica sindrómica y no sindrómica para determinar los mecanismos moleculares involucrados en la dilatación aórtica ascendente, y se realizaron estudios de ecocardiografía para determinar la distensibilidad aórtica y la velocidad de la onda del pulso. También se analizaron marcadores séricos ADAMTS1, versicano, agrecano y TGF- $\beta$  en pacientes. El **equipo 3** definió los factores epigenéticos (metilación del ADN) relacionados con las variables biomecánicas obtenidas por resonancia magnética. El análisis *in vitro* se realizó a partir de muestras de biobancos para establecer la variación epigenética mediada por flujo. La integración de datos biomecánicos, biológicos y epigenéticos obtenidos de pacientes y datos de animales definió varios mecanismos relacionados con la dilatación de la aorta ascendente.

## 2. Resultados obtenidos

El estudio alcanzó los objetivos planteados, mostrando información significativa para mejorar el pronóstico y el manejo de las enfermedades aórticas. Uno de los principales objetivos del proyecto era definir los factores biomecánicos relacionados con la dilatación de la aorta ascendente. El *strain* longitudinal de la aorta proximal se relaciona de forma independiente con la tasa de dilatación de la raíz aórtica y los eventos aórticos, además del diámetro de la raíz aórtica, los factores de riesgo clínicos

y las características demográficas en pacientes con síndrome de Marfan. Además de la aorta ascendente, la disección de la aorta descendente se ha convertido en una de las complicaciones clínicas más significativas. (*Proximal aorta longitudinal strain predicts aortic root dilation rate and aortic events in Marfan syndrome*. Eur Heart J. 2019 Jul 1;40[25]:2047-2055). Nuestro estudio *Decreased rotational flow and circumferential wall shear stress as early markers of descending aorta dilation in Marfan syndrome: a 4D flow CMR study*. J Cardiovasc Magn Reson. 2019 Oct14;21(1):63 demostró que el flujo rotacional se redujo en pacientes con síndrome de Marfan, incluso en ausencia de dilatación de la aorta, y está relacionado con la rigidez aórtica, lo que provoca un estrés de corte anormal en la pared aórtica. El flujo rotacional de la tensión de corte circunferencial es un marcador precoz de dilatación de la aorta descendente en pacientes con síndrome de Marfan.

Para diferenciar la biomecánica de la aorta entre los pacientes con bicúspide, síndrome de Marfan y enfermedad aórtica degenerativa, se realizaron estudios con 4D-MRI y fueron evaluadas la rigidez aórtica, la velocidad de la onda del pulso, la tensión de corte de la pared y los parámetros de flujo (*Influence of aortic dilation in the regional aortic stiffness of bicuspid aortic valve assessed by 4D-flow CMR: comparison with Marfan syndrome and degenerative aortic aneurysm*. JACC cardiovascular imaging. 12[6]1020-9, 2019. D1 doi: 10.1016/j.jcmg. 2018.03.017). Los pacientes con válvula aórtica bicúspide tienen varios patrones de flujo relacionados con el morfotipo valvular (*Aortic flow patterns and wall shear stress maps by 4D-flow MRI in the assessment of aortic dilatation in bicuspid aortic valve*. J Cardiovasc Magn Reson. 2018, 20:28 D1. <https://doi.org/10.1186/s12968-018-0451-1>). Los pacientes con fusión derecha e izquierda (DI-VAB) tenían una dirección del flujo anterior, y los pacientes con fusión derecha no coronaria (DN-VAB) presentan un flujo dirigido a la pared posterior, de modo predominante en la unión sinotubular, que se desplaza hacia la pared anterior o derecha anterior en la aorta ascendente distal. Esta distribución de flujo se relacionaba con el aumento en la tensión de corte de la pared. Por lo tanto, estos resultados pueden explicar diferentes fenotipos de dilatación de la aorta en la población con VAB. Además de los diámetros aórticos, la evaluación de los diferentes componentes de la tensión de corte de la pared (axial y circunferencial) y los parámetros de flujo derivados pueden ayudar a identificar a los pacientes con mayor riesgo de dilatación aórtica (*Increased rotational flow in the proximal aortic arch contributes to its dilation in bicuspid aortic valve disease*. 2019. Eur Heart J Card Img. doi:

10.1093/ehjci/jez046, 27 February 2019). Aunque la ecocardiografía es la técnica de elección en la monitorización de pacientes con VAB, las mediciones del diámetro de la raíz aórtica pueden ser inexactas en presencia de asimetría de la raíz y en la VAB con fusión de las cúspides derecha y no coronaria (*Implications of asymmetry and valvular morphotype on echocardiographic measurements of aortic root in bicuspid aortic valve*. Journal of the American Society of Echocardiography. D1. doi: 10.1016 / j.echo.2018.08.004).

El **equipo 2** identificó marcadores moleculares clave en el desarrollo de la dilatación aórtica en pacientes con síndrome de Marfan. Su investigación demostró que los sustratos de ADAMTS1, como el versicano y la vía de óxido nítrico (NO), son factores esenciales en el desarrollo de la enfermedad. La comprensión actual ha permitido correlacionar la aparición de ciertos péptidos nitrados y el aumento de los niveles de cGMP con el desarrollo de la enfermedad, pudiendo actuar como biomarcadores de la enfermedad.

El **equipo 3** combinó el análisis de metilación global con estudios *in vitro* de metilación sensible al flujo para identificar procesos biológicos asociados con VAB-aortopatía y la contribución potencial del flujo. Se recogieron biopsias de aortas ascendentes no dilatadas y dilatadas de VAB (n = 21) y pacientes con válvula aórtica tricúspide (VAT) (n = 23). Analizando el patrón de metilación del ADN en aortas ascendentes VAB y VAT no dilatadas (ND), hallamos n = 681 regiones diferencialmente metiladas (DMR), mapeadas en n = 894 genes (usando GREAT, Universidad de Stanford, EEUU). Para capturar procesos biológicos relevantes de genes DMR, se realizaron análisis en genes con un cambio de pliegue de metilación de  $\pm 10\%$  (n = 540). El análisis distintivo mostró que la respuesta al estrógeno se enriqueció entre los genes metilados diferencialmente (DM), seguido de la señalización de TNF/NFKB, hipoxia y transición mesenquimal epitelial (EMT). La vía KEGG mostró una firma similar. Curiosamente, la cinasa de cadena ligera de miosina (MYLK), una de las principales cinasas RHOA involucradas en la formación de fibras y reordenamientos del citoesqueleto, también fue DM. Se expusieron células endoteliales (CE) aisladas de VAB y VAT a flujo oscilatorio ( $\pm 12$  dinas/cm<sup>2</sup>) o laminar (12 dinas/cm<sup>2</sup>). Luego identificamos la superposición entre los genes DM entre VAB-ND y VAT-ND y los genes que cambian la metilación en respuesta al flujo. Esto mostró que la metilación VAB-ND estaba asociada con el flujo oscilatorio (P = 0,01), específicamente relacionado con la endocitosis

(FDRq = 1,5e-3) y la regulación del citoesqueleto de actina (FDRq = 2,8e-3). Luego se expusieron las CE primarias de VAB y VAT al flujo oscilatorio, identificándose genes DMR y sus niveles de expresión. En total, n = 400 genes en VAB y n = 1.251 en VAT cambiaron la expresión en respuesta al flujo oscilatorio (FDR 10%). En VAB, el 83% de los genes estaban sobreexpresados en comparación con solo el 10% en TAV (vía KEGG). Además, se establecieron otras modulaciones epigenéticas asociadas con VAB. La familia de los miR-200 era el miRNA mejor clasificado, por lo que potencialmente tenía el efecto más fuerte en la red de señalización asociada con VAB.

### **3. Relevancia y posibles implicaciones futuras**

Este proyecto ha proporcionado información y conocimiento importantes en aspectos fundamentales de la patología aórtica, como demostrar el valor pronóstico de parámetros de imagen respecto a la dilatación de la raíz de aorta y aorta ascendente, y definir que la velocidad de la onda del pulso (PWV) determinada por el flujo 4D es el parámetro más sólido en la evaluación de la biomecánica de la aorta. Los estudios de flujo 4D permiten determinar las características biomecánicas del segmento proximal y distal de la aorta ascendente, el arco y la aorta descendente. La importancia de nuestros hallazgos radica en diferenciar las propiedades mecánicas aórticas de los pacientes con VAB y síndrome de Marfan. La aortopatía de pacientes con VAB no tiene deficiencia mecánica intrínseca como el síndrome de Marfan. Por lo tanto, parece que los pacientes con VAB no se benefician de un tratamiento clínico diferente de los pacientes con válvula tricúspide y no son comparables con aquellos con síndrome de Marfan. La dilatación aórtica posee efectos similares sobre las propiedades mecánicas locales de VAB y pacientes con VAT, diferentes de aquellos con Marfan. La PWV mostró la mejor asociación con la dilatación aórtica ascendente en pacientes con VAB, más allá de los factores de riesgo clínicos. Las principales ventajas de PWV son que, a diferencia de la distensibilidad aórtica (AD), no depende de ninguna suposición geométrica o mecánica o presión local, que no puede medirse de forma no invasiva. Este estudio muestra algunos datos interesantes, como la tendencia bifásica de la velocidad de la onda del pulso en la aorta ascendente cuando el diámetro de la aorta alcanza los 50 mm, lo que sugiere que la remodelación aórtica ya no puede compensar las alteraciones en la pared de la aorta. Este valor está muy próximo a lo que se sugiere empíricamente para indicar cirugía profiláctica de la aorta ascendente. A pesar de

utilizar las recomendaciones de las guías para medir la aorta por ecocardiografía y CMR, el diámetro máximo de la raíz aórtica muestra una concordancia solo aceptable, ya que en el 39% de los casos las diferencias fueron de 3 mm y en el 15% de 5 mm. Tales diferencias se relacionaron principalmente con la presencia de asimetría de raíz y el morfotipo VAB-ND. Por otro lado, se ha demostrado que el mini rafe genera alteraciones del flujo aórtico y facilita la dilatación de la aorta ascendente. Finalmente, la presencia de asimetría de raíz o en el morfotipo valvular VAB-ND se asocia con una subestimación de las mediciones ecocardiográficas de la raíz de aorta, por lo que es aconsejable realizar una exploración de CMR o TC para validar el diámetro mayor en técnicas tridimensionales.

El equipo del CNIC (JM Redondo) demostró que el papel de la vía del NO en los pacientes de Marfan es un objetivo claro para la terapia. Este grupo tiene en la actualidad una patente a este respecto (PCT/EP2016/082925, *Método 'in vitro' para identificar aneurismas aórticos torácicos [TAA] en un sujeto*) que fue recientemente autorizada, con el fin de realizar ensayos clínicos para determinar si este enfoque puede constituir una herramienta beneficiosa para el tratamiento de TAAD. Del mismo modo, se espera que los esfuerzos continuos para caracterizar las moléculas como mediadores y biomarcadores de progresión de la aortopatía asociada a MFS puedan proporcionar a medio plazo herramientas para controlar esta enfermedad. El equipo del Dr. Eriksson del Karolinska Institutet de Estocolmo pudo demostrar que la respuesta al estrógeno fue la metilación de diferentes genes, seguida de la señalización de TNF/NFKB, hipoxia y transición mesenquimal epitelial. Se ha identificado una posición excesiva entre los genes DM entre VAB-ND y VAB-ND y los genes que cambian la metilación en respuesta al flujo. Se demostró que la metilación de VAB-ND está asociada al flujo oscilatorio ( $P = 0,01$ ), en especial relacionado con la endocitosis ( $FDRq = 1,5e-3$ ) y la regulación del citoesqueleto de actina ( $FDRq = 2,8e-3$ ). Cuando las CE de VAB y VAT se expusieron al flujo oscilatorio, se identificaron genes y niveles de DMR y expresión. Un total de 400 en VAB y 1.251 en VAT cambiaron la expresión en respuesta al flujo oscilatorio. (FDR 10%). En GAB, el 83% de los genes estaban sobreexpresados en comparación con solo el 10% en VAT (vía KEGG). Los genes objetivos de Notch y las vías relacionadas con Notch mostraron que las células endoteliales de pacientes con aneurisma tienen vías Notch/BMP/WNT desreguladas en comparación con las células donantes.

Por lo tanto, los resultados de este proyecto han proporcionado información de importancia clínica que ha llevado a una mejora significativa en el uso de predictores de imágenes de biomarcadores de complicaciones aórticas más allá del diámetro aórtico máximo y en la mejora del conocimiento de la biomecánica, mecanismos moleculares y epigenéticos que promueven la dilatación de la aorta ascendente. Estos datos impulsarán nuevos estudios sobre la estratificación del riesgo de la enfermedad con implicaciones de manejo y un nuevo objetivo terapéutico que requerirá un nuevo ensayo farmacológico para reducir la progresiva dilatación de la aorta en estas enfermedades.

#### **4. Bibliografía científica generada**

Guala A, Teixido-Tura G (co-first author), Rodríguez-Palomares J, Ruiz-Muñoz A, Dux-Santoy L, Villalva N, Granato C, Galian L, Gutierrez L, Gonzalez-Alujas T, Sanchez V, Forteza A, García-Dorado D, Evangelista A.

*Proximal aorta longitudinal strain predicts aortic root dilation rate and aortic events in Marfan syndrome.*

European Heart Journal 2019; 40(25): 2047-2055.

Guala A, Rodriguez-Palomares J (co-first author), Galian L, Teixido Tura G, Johnson K.M., Sao Avilés A., Evangelista A.

*Partial aortic valve leaflet fusion is related to deleterious alteration of proximal aorta hemodynamics: a 4D-flow MRI study.*

Circulation 2019;139:2707–2709.

Guala A, Teixido-Tura G (co-first author), Dux-Santoy L., Rodriguez-Palomares J., Maldonado G, Galian L., Valente F., Villalva N., Gutiérrez L., González-Alujas T., Johnson K.M., Wieben O, Sao Avilés A, Garcia-Dorado D, Evangelista A.

*Decreased rotational flow and circumferential wall shear stress as early markers of descending aorta dilation in Marfan syndrome: a 4D flow CMR study.*

2019. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance.

Dux-Santoy L, Guala A (co-first author), Teixidó-Turà G, Maldonado G, Villalva N, Galian L, Valente F, Gutiérrez L, González-Alujas T, Sao-Avilés A, Johnson KM, Wieben O, García-Dorado D, Evangelista A, Rodríguez-Palomares JF.

*Increased rotational flow in the proximal aortic arch contributes to its dilation in bicuspid aortic valve disease.*

2019. Eur Heart J Card Img. doi: 10.1093/ehjci/jez046, 27 February 2019, D1.

Lydia Dux-Santoy, Andrea Guala (co-first author), Julio Sotelo, Sergio Uribe, Gisela Teixidó-Turà, Aroa Ruiz-Muñoz, Daniel Hurtado, Filipa Valente, Laura Galian-Gay, Laura Gutiérrez, Teresa González-Alujas, Kevin M. Johnson, Oliver Wieben, Ignacio Ferreira, Arturo Evangelista, José Rodríguez-Palomares.

*Low and oscillatory wall shear stress is not related to aortic dilation in bicuspid aortic valve patients: a 4D flow MRI study.*

2019. In press Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.

Guala A, Dux-Santoy L, Teixido Tura G, Johnson Kevin M., Wieben O, Evangelista A, Rodriguez-Palomares J.

*Raphe in bicuspid aortic valve is unrelated to altered aortic hemodynamics and stiffness (en prensa).*

2019. Revista Española de Cardiología.

Guala A., Rodriguez-Palomares JF (co-first author), Dux-Santoy L, Teixido Tura G, Maldonado G, Galian L, Huguet M, Valente F, Gutiérrez L, González-Alujas T, Johnson KM., Wieben O, Sao Avilés A, Garcia-Dorado D, Evangelista A (2018).

*Influence of aortic dilation in the regional aortic stiffness of bicuspid aortic valve assessed by 4D-flow CMR: comparison with Marfan syndrome and degenerative aortic aneurysm.*

JACC cardiovascular imaging. 12(6) 1020-9, 2019. D1 doi: 10.1016/j.jcmg.2018.03.017.

Rodríguez-Palomares, J †, L. Dux-Santoy †, A Guala, R. Kale, G. Maldonado, M Huguet, G Teixidó-Turà, L Galian, F Valente, L Gutiérrez, T González-Alujas, KM. Johnson, O Wieben, D García-Dorado, A Evangelista (2018).

*Aortic flow patterns and wall shear stress maps by 4D-flow MRI in the assessment of aortic dilatation in bicuspid aortic valve.*



J Cardiovasc Magn Reson. 2018, 20:28 D1. <https://doi.org/10.1186/s12968-018-0451-1>.

JC Vis, JF. Rodríguez-Palomares, G Teixidó-Tura, L. Galian-Gay, C. Granato, A Guala, L Gutiérrez, T González-Alujas, D García-Dorado, A Evangelista (2018).

*Implications of asymmetry and valvular morphotype on echocardiographic measurements of aortic root in bicuspid aortic valve.*

Journal of the American Society of Echocardiography. D1. doi: 10.1016/j.echo.2018.08.004.

Björck HM, Du L, Pulignani S, Paloschi V, Lundströmer K, Kostina AS, Österholm C, Malashicheva A, Kostareva A, Evangelista A, Teixidó-Tura G, Maleki S, Franco-Cereceda A, Eriksson P.

*Altered DNA methylation indicates an oscillatory flow mediated epithelial-to-mesenchymal transition signature in ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve.*

Sci Rep. 2018 Feb 9;8(1):2777. doi: 10.1038/s41598-018-20642-4.

Sotelo J, Dux-Santoy L, Guala A, Rodríguez-Palomares J, Evangelista A, Urbina J, Mura J, Hurtado D, Uribe S (2017).

*Tridimensional Axial and Circumferential WSS from 4D flow data using a finite element method and a Laplacian approach.*

Magnetic Resonance in Medicine. 79(5) doi: 10.1002/mrm.26927 Q2.

Oller J, Méndez-Barbero N, Ruiz EJ, Villahoz S, Renard M, Canelas LI, Briones AM, Alberca R, Lozano-Vidal N, Hurlé MA, Milewicz D, Evangelista A, Salaices M, Nistal JF, Jiménez-Borreguero LJ, De Backer J, Campanero MR, **Redondo JM**.

*Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome.*

Nat Med. 2017 Feb;23(2):200-212. doi: 10.1038/nm.4266. Epub 2017 Jan 9. PMID: 28067899.

Kurusamy S, López-Maderuelo D, Little R, Cadagan D, Savage AM, Ihugba JC, Baggott RR, Rowther FB, Martínez-Martínez S, Arco PG, Murcott C, Wang W, Francisco Nistal J, Oceandy D, Neyses L, Wilkinson RN, Cartwright EJ, **Redondo JM**, Armesilla AL.

*Selective inhibition of plasma membrane calcium ATPase 4 improves angiogenesis and vascular reperfusion.*

J Mol Cell Cardiol. 2017 Aug;109:38-47. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.07.001. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28684310.

de Cárcer G\*, Wachowicz P, Martínez-Martínez S, Oller J, Méndez-Barbero N, Escobar B, González-Loyola A, Takaki T, El Bakkali A, Cámara JA, Jiménez-Borreguero LJ, Bustelo XR, Cañamero M, Mulero F, de Los Ángeles Sevilla M, Montero MJ, **Redondo JM\***, Malumbres M\*.

*Plk1 regulates contraction of postmitotic smooth muscle cells and is required for vascular homeostasis.*

Nat Med. 2017 Jul 10. doi: 10.1038/nm.4364. PMID: 28692064.

Villahoz S, Yunes-Leites PS, Méndez-Barbero N, Urso K, Bonzon-Kulichenko E, Ortega S, Nistal JF, Vazquez J, Offermanns S, **Redondo JM\***, Campanero MR\*.

*Conditional deletion of Rcan1 in vascular cells predisposes to hypertension-mediated aortic rupture, intramural hematoma, and aneurysm.*

Nat Commun. 2018 Nov 15;9(1):4795. doi: 10.1038/s41467-018-07071-7.

Buxade M, Encabo HH, Riera-Borrull M, Quintana-Gallardo L, Lopez-Cotarelo P, Tellechea M, Martinez-Martinez S, **Redondo JM**, Martin-Caballero J, Flores JM, Bosch E, Rodriguez-Fernandez JL, Aramburu J, Lopez-Rodriguez C.

*Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5.*

J Exp Med 2018 Nov 5;215(11):2901-2918. doi: 10.1084/jem.20180314.