



Universidad de Oviedo

**TESIS DOCTORAL**

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Fisiopatología de la estenosis en la  
válvula aórtica bicúspide: estudio sobre  
tejido y análisis genético y de  
biomarcadores en sangre periférica

**Presentada por**

**ALEJANDRO JUNCO VICENTE**





Universidad de Oviedo

**TESIS DOCTORAL**

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**Fisiopatología de la estenosis en la  
válvula aórtica bicúspide: estudio sobre  
tejido y análisis genético y de  
biomarcadores en sangre periférica**

**Presentada por**

**ALEJANDRO JUNCO VICENTE**

**Directoras**

**MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ GARCÍA**

**MARÍA MARTÍN FERNÁNDEZ**

**Oviedo, 2024**





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: Fisiopatología de la estenosis en la válvula aórtica bicúspide: estudio sobre tejido y análisis genético y de biomarcadores en sangre periférica.	Inglés: Pathophysiology of bicuspid aortic valve stenosis: study on tissue and genetic and biomarker analyses in peripheral blood
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: Alejandro Junco Vicente	
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

Con el aumento de la esperanza de vida poblacional la valvulopatía aórtica calcificada (CAVD) se ha convertido en un problema de salud de primer nivel. La investigación sobre posibles dianas terapéuticas que enlentezcan o detengan la progresiva calcificación tisular es un objetivo esencial para cambiar el paradigma de esta enfermedad. En concreto, en las personas portadoras de válvula aórtica bicúspide (VAB), cardiopatía congénita más frecuente, estos procesos de calcificación y degeneración tisular son acelerados. Este hecho sugiere que puedan existir diferencias, por ejemplo, a nivel genético, molecular o inflamatorio entre individuos con válvula aórtica trivalva (VAT) y VAB. Además, los pacientes con VAB presentan un riesgo aumentado de complicaciones aórticas derivadas de su dilatación progresiva. La historia natural de la enfermedad podría verse modificada con el hallazgo de factores genéticos y plasmáticos que nos permitan un diagnóstico precoz e incluso un tratamiento específico para evitar el desarrollo tanto de la valvulopatía como la aortopatía asociadas. De este modo, la presente tesis se centró en determinar diferencias que pudieran existir en los procesos de degeneración tisular asociados a VAB desde un punto de vista de susceptibilidad genética o del mecanismo fisiopatológico que la causa.

Para ello, primero se conformó una población de estudio de 734 pacientes a través del Área del Corazón del Hospital Universitario Central de Asturias, incluyendo pacientes con distinta valvulopatía y morfología de la válvula. En aquellos pacientes con VAB se realizó un análisis de aspectos clínicos y un seguimiento de eventos cardiovasculares y pronóstico a largo plazo.

Dado que uno de los procesos involucrados en el mayor riesgo de desarrollar dilatación de aorta ascendente en VAB es la inflamación y que citocinas como interleucina-6 (IL-6) se han relacionado con degeneración de la matriz extracelular aórtica en modelos animales, se analizó el polimorfismo rs1800795 de la región promotora del gen *IL6* y se encontró que, en pacientes con VAB, los portadores del genotipo CC presentaban menor probabilidad de padecer dilatación de aorta.

También se procedió al estudio de otros dos polimorfismos replicados consistentemente en la literatura con relación a CAVD: rs6702619 en *PALMD* y rs10455872 en *LPA*. Se encontró asociación de los polimorfismos de *PALMD* e *IL6* con estenosis aórtica solo en el grupo de VAT, pero no se encontró asociación con el polimorfismo de *LPA*. Este polimorfismo sí se encontró asociado con la enfermedad aterosclerótica de arterias coronarias.

Asimismo, se analizó el tejido del velo aórtico de pacientes con VAT para determinar el contenido en calcio mediante microtomografía computarizada y para determinar el grado de degeneración mediante la escala de Warren y Yong. Ninguna de las dos variables se asoció significativamente con los diferentes genotipos de los tres polimorfismos.

Se evaluó también si el genotipo del polimorfismo de *IL6* podría tener un efecto sobre los niveles circulantes de la proteína para poder utilizarlo como biomarcador. Para ello se analizaron muestras de suero de pacientes con los distintos genotipos de rs1800795 y se vio que el genotipo CC se asociaba con niveles séricos más altos de IL-6, demostrando que, además de ser un locus de mayor riesgo para CAVD, el polimorfismo influye en la expresión de *IL6*.

Por último, y dado que la calcificación de la válvula aórtica es un proceso inflamatorio activo, se recabó una nueva pequeña cohorte con el fin de evaluar poblaciones celulares inmunitarias circulantes mediante citometría de flujo. Existían diferencias entre pacientes con válvula sana y pacientes con válvula con estenosis aórtica, por ejemplo, en niveles de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes ( $CD4^+ CD28^{null}$ ), siendo mayores en estos últimos, pero sin diferencias entre VAT y VAB. Esto sugiere que la inmunosenescencia es un proceso relevante en pacientes con estenosis aórtica.

## RESUMEN (en Inglés)

With the increase in population life expectancy, calcific aortic valve disease (CAVD) has become a major health problem. Research into possible therapeutic targets that slow or stop progressive tissue calcification is an essential objective to change the paradigm of this disease. Specifically, in people with a bicuspid aortic valve (BAV), the most common congenital heart defect, these processes of calcification and tissue degeneration are accelerated. This fact suggests that there may be differences, for example, at the genetic, molecular or inflammatory level between individuals with trileaflet aortic valve (TAV) and BAV. Furthermore, patients with BAV have an increased risk of aortic complications derived from its progressive dilation. The natural history of the disease could be modified with the discovery of genetic and plasma factors that allow early diagnosis and even specific treatment to prevent the development of both associated valve disease and aortopathy. Thus, this thesis focused on determining differences that may exist in the tissue degeneration processes associated with BAV from a point of view of genetic susceptibility or the pathophysiological mechanism that causes it.

To do this, first a study population of 734 patients was formed through the Heart Area of the Hospital Universitario Central de Asturias, including patients with different valve disease and valve morphology. In those patients with BAV, an analysis of clinical

aspects and monitoring of cardiovascular events and long-term prognosis were performed.

Since one of the processes involved in the greatest risk of developing ascending aortic dilation in BAV is inflammation and that cytokines such as interleukin-6 (IL-6) have been related to degeneration of the aortic extracellular matrix in animal models, the rs1800795 polymorphism of the promoter region of the *IL6* gene was analyzed. It was found that, in patients with BAV, carriers of the CC genotype were less likely to suffer from aortic dilation.

Two other polymorphisms consistently replicated in the literature in relation to CAVD were also studied: rs6702619 in *PALMD* and rs10455872 in *LPA*. An association of the *PALMD* and *IL6* polymorphisms with aortic stenosis was found in the TAV group only, but no association was found with the *LPA* polymorphism. This polymorphism was found associated with atherosclerotic coronary artery disease.

Likewise, aortic leaflet tissue from patients with TAV was analyzed to determine calcium content using micro-computed tomography and to determine the degree of degeneration using the Warren and Yong scale. Neither of the two variables was significantly associated with the different genotypes of the three polymorphisms.

Whether the genotype of the *IL6* polymorphism could influence the circulating levels of the protein was also evaluated, in order to be able to use it as a biomarker. To this end, serum samples from patients with the different rs1800795 genotypes were analyzed and it was seen that the CC genotype was associated with higher serum levels of IL-6, demonstrating that, in addition to being a higher risk locus for CAVD, the polymorphism influences the expression of *IL6*.

Finally, and given that aortic valve calcification is an active inflammatory process, a small new cohort was collected in order to evaluate circulating immune cell populations using flow cytometry. Differences between patients with a healthy valve and patients with valve with aortic stenosis were found, for example, in levels of immunosenescent T helper lymphocytes (CD4<sup>+</sup> CD28<sup>null</sup>), being higher in the last ones, but without differences between TAV and BAV. This suggests that immunosenescence is a relevant process in patients with aortic stenosis.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN OVIEDO, A 14 DE ENERO DE 2024**







## ABREVIATURAS

---

<b>ASC</b>	Área de superficie corporal
<b>BV/TV</b>	<i>Bone volume/Tissue volume</i> , volumen óseo/volumen tejido
<b>CAVD</b>	<i>Calcific aortic valve disease</i> , enfermedad de la válvula aórtica calcificada
<b>EAO</b>	Estenosis aórtica
<b>EI</b>	Endocarditis infecciosa
<b>EMT</b>	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i> , transición epitelio-mesénquima
<b>ESC</b>	<i>European Society of Cardiology</i> , Sociedad Europea de Cardiología
<b>ETE</b>	Ecocardiograma transesofágico
<b>ETT</b>	Ecocardiograma transtorácico
<b>FEVI</b>	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>HUCA</b>	Hospital Universitario Central de Asturias
<b>IAo</b>	Insuficiencia aórtica
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>L-N</b>	Fusión velo aórtico izquierdo ( <i>Left</i> ) – velo aórtico No coronario
<b>microCT</b>	Micro tomografía computarizada
<b>MMP</b>	Metaloproteasa de matriz
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>PRR</b>	<i>Pattern Recognition Receptor</i> , receptor de reconocimiento de patrones
<b>R-L</b>	Fusión velo aórtico derecho ( <i>Right</i> ) – velo aórtico izquierdo ( <i>Left</i> )
<b>R-N</b>	Fusión velo aórtico derecho ( <i>Right</i> ) – velo aórtico No coronario
<b>RMC</b>	Resonancia magnética cardiaca
<b>SD</b>	<i>Standard deviation</i> , desviación estándar
<b>TC</b>	Tomografía computarizada
<b>TSVI</b>	Tracto de salida de ventrículo izquierdo
<b>UA</b>	Unidades Agatston
<b>UST</b>	Unión sinotubular
<b>VAB</b>	Válvula aórtica bicúspide
<b>VAT</b>	Válvula aórtica tricúspide
<b>VEC</b>	<i>Valvular endothelial cell</i> , célula endotelial valvular
<b>VIC</b>	<i>Valvular interstitial cell</i> , célula intersticial valvular



## Índice

---





## INDICE

---

Resumen.....	vii
Índice de ilustraciones .....	xix
Introducción.....	1
1. Nociones generales de la válvula aórtica bicúspide .....	3
2. Embriología de la válvula aórtica.....	5
3. Anatomía y fisiología de la válvula aórtica.....	9
3.1. Anatomía.....	9
3.2. Histología.....	14
3.3. Una unidad fisiológica .....	16
3.4. Dimensiones de la raíz aórtica .....	18
4. Definición, nomenclatura y subtipos de válvula aórtica bicúspide.....	19
5. Epidemiología .....	26
6. Historia natural y complicaciones asociadas.....	28
6.1. Disfunción valvular.....	30
6.2. Dilatación de aorta y complicaciones derivadas.....	32
6.3. Endocarditis infecciosa .....	36
7. Fundamentos del diagnóstico y de la imagen multimodal en válvula aórtica bicúspide.....	38
7.1. Ecocardiografía.....	38
7.2. Tomografía computarizada .....	40
7.3. Resonancia magnética cardiaca .....	41
7.4. ¿Disponemos de algún biomarcador? .....	43
8. Consideraciones del tratamiento actual y pronóstico .....	45
8.1. Reparación o sustitución valvular.....	46
8.2. Reparación de dilatación aórtica.....	48
8.3. Opciones de tratamiento farmacológico .....	50
9. Etiopatogenia.....	51
9.1. Genética .....	51
9.2. Epigenética.....	55
9.3. microRNAs y otros RNAs reguladores.....	56
10. Patogénesis de la calcificación valvular aórtica .....	58
10.1. Fase inicial: inflamación.....	59
10.2. Fase 2: progresiva mineralización .....	62
Justificación del estudio.....	67



Hipótesis y objetivos.....	71
Población y métodos.....	75
1. Población de estudio.....	77
2. Variables a estudio .....	80
2.1. Variables antropométricas .....	80
2.2. Factores de riesgo cardiovascular .....	81
2.3. Comorbilidades y otros antecedentes médicos .....	82
2.4. Variables ecocardiográficas .....	83
2.5. Variables examinadas en portadores de VAB .....	84
3. Obtención de las muestras.....	87
4. Genotipado .....	88
5. Medición del contenido de calcio en los velos de las válvulas por microtomografía computarizada .....	89
6. Tinción histológica y clasificación de Warren y Yong .....	90
7. Citometría de flujo.....	92
8. Medición de los niveles circulantes de interleucinas .....	95
9. Análisis estadístico .....	96
Resultados.....	99
1. Análisis descriptivo de la población a estudio. ....	101
2. Análisis de la subpoblación portadora de VAB .....	102
2.1. Evolución clínica y pronóstico a largo plazo .....	106
3. Análisis genético de la población.....	109
3.1. Asociación de un polimorfismo de <i>IL6</i> con dilatación de aorta ascendente en portadores de válvula aórtica bicúspide .....	109
3.2. Asociación de polimorfismos con estenosis aórtica. ....	112
3.3. Asociación de polimorfismos y calcio en válvula aórtica .....	117
3.4. Asociación de polimorfismos con la escala de Warren y Yong .....	119
3.5. Asociación de polimorfismos con otros rasgos cardiovasculares.....	120
4. Análisis de niveles circulantes de IL-6 y su relación con el genotipo .....	121
5. Caracterización del estado inflamatorio e inmunológico de pacientes con estenosis aórtica, mediante el estudio de biomarcadores en suero.....	122
6. Análisis y caracterización del estado inflamatorio e inmunológico de los pacientes mediante el estudio de células circulantes.....	125
6.1. Análisis de monocitos .....	126
6.2. Análisis de linfocitos.....	128
Discusión .....	131
Limitaciones y fortalezas del estudio. ....	155
Conclusiones.....	159



Bibliografía .....	163
Anexo.....	183
1. Aprobación del Comité de Ética .....	185





## **Índice de ilustraciones**

---





## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Afectación bimodal bicúspide, a nivel de válvula y de aorta.....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema de las fases iniciales de la formación del corazón primitivo en el desarrollo embrionario .....	6
<b>Figura 3.</b> Corte transversal durante la formación embrionaria de las válvulas semilunares. ....	7
<b>Figura 4.</b> Secciones sagitales de las válvulas semilunares en las semanas 6, 7 y 9 del desarrollo embrionario.. ....	8
<b>Figura 5.</b> Esquema de la estructura de la raíz aórtica, enfatizando su complejidad y la relación entre sus componentes.....	10
<b>Figura 6.</b> Corte transversal histológico de un velo aórtico teñido con tinción de orceína. ....	14
<b>Figura 7.</b> Esquema histológico en corte transversal de la pared del vaso arterial aórtico. ....	16
<b>Figura 8.</b> Imagen de ecocardiografía transtorácica en eje paraesternal largo centrado en aorta.....	17
<b>Figura 9.</b> Esquema de la clasificación de los tipos de válvula bicúspide según Sievers y Schmidtke.....	21
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática del fenotipo de válvula aórtica bicúspide fusionada con rafe R-L como se observaría en ecocardiografía transtorácica en un plano paraesternal eje corto.....	23
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática del fenotipo de válvula aórtica bicúspide de 2-senos subtipo latero-lateral como se observaría en ecocardiografía transtorácica en un plano paraesternal eje corto.....	24
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática del fenotipo de válvula aórtica bicúspide con fusión parcial como se observaría en ecocardiografía transtorácica en un plano paraesternal eje corto.....	25
<b>Figura 13.</b> Aortopatía bicúspide y coartación de aorta.....	28
<b>Figura 14.</b> Comparación de válvula aórtica calcificada y no calcificada. ....	31
<b>Figura 15.</b> Imágenes de aorta torácica ascendente dilatada tomadas mediante tomografía computarizada .....	33
<b>Figura 16.</b> Esquema con los diferentes fenotipos de dilatación aórtica. ....	34
<b>Figura 17.</b> Esquema de los pilares fundamentales en la evaluación por imagen de la válvula aórtica bicúspide.....	38
<b>Figura 18.</b> Esquema sobre el proceso de progresiva mineralización del tejido del velo valvular aórtico.....	65



<b>Figura 19.</b> Composición de la población objeto de estudio según la morfología de la válvula aórtica. ....	78
<b>Figura 20.</b> Línea temporal de reclutamiento de pacientes en las diferentes cohortes. ...	78
<b>Figura 21.</b> Imágenes de los depósitos minerales obtenidas tras el análisis mediante microtomografía computarizada (microCT) de los velos valvulares aórticos. ...	90
<b>Figura 22.</b> Imagen transversal mediante microscopía óptica de un velo aórtico calcificado teñido con orceína .....	91
<b>Figura 23.</b> Estrategia para la identificación y cuantificación de subpoblaciones de monocitos en células mononucleares de sangre periférica mediante citometría de flujo. ....	93
<b>Figura 24.</b> Estrategia para la identificación y cuantificación de la expresión de enzima convertidora de angiotensina (ECA) en las distintas subpoblaciones de monocitos mediante citometría de flujo.....	94
<b>Figura 25.</b> Estrategias para la identificación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos mediante citometría de flujo.....	95
<b>Figura 26.</b> Diagrama de flujo de los pacientes con válvula aórtica bicúspide (VAB) incluidos en el subanálisis .....	103
<b>Figura 27.</b> Técnicas quirúrgicas utilizadas en los pacientes con válvula aórtica bicúspide intervenidos por cirugía cardíaca. ....	104
<b>Figura 28.</b> Supervivencia global de los pacientes con válvula aórtica bicúspide desde su nacimiento, representada mediante una gráfica de Kaplan-Meier .....	107
<b>Figura 29.</b> Representación mediante gráficas de Kaplan-Meier de la probabilidad, tras la primera cirugía cardíaca, de padecer una complicación cardiológica o de sufrir la necesidad de una segunda intervención cardíaca .....	108
<b>Figura 30.</b> Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800795 del gen <i>IL6</i> en controles y pacientes con dilatación de aorta ascendente, en individuos con válvula aórtica bicúspide.....	111
<b>Figura 31.</b> Modelo de regresión logística multivariable para dilatación de aorta ascendente .....	112
<b>Figura 32.</b> Diagrama del flujo de selección de pacientes para el estudio genético. ....	114
<b>Figura 33.</b> Diagramas <i>forest plot</i> que muestran los modelos de regresión logística multivariable para la asociación entre los genotipos de <i>PALMD</i> , <i>LPA</i> e <i>IL6</i> y la estenosis aórtica en pacientes con válvula aórtica tricúspide.....	116
<b>Figura 34.</b> Niveles de calcio medidos mediante microtomografía computarizada, agrupados según criterios diagnósticos de valvulopatía aórtica.....	118
<b>Figura 35.</b> Niveles de la relación volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV) de los velos de válvula aórtica, medidos mediante microtomografía computarizada, según los genotipos de rs6702619 de <i>PALMD</i> y de rs1800795 de <i>IL6</i> .....	119



<b>Figura 36.</b> Niveles de calcio en el tejido valvular, medidos mediante microtomografía computarizada, según los grados de degeneración de la escala de Warren y Yong .....	120
<b>Figura 37.</b> Niveles circulantes de interleucina-6 (IL-6) según genotipos del polimorfismo rs1800795 del gen <i>IL6</i> .....	122
<b>Figura 38.</b> Niveles de proteína C reactiva en los pacientes según el diagnóstico de estenosis o insuficiencia aórtica. ....	124
<b>Figura 39.</b> Niveles de osteoprotegerina (OPG) en suero según la edad de los pacientes. ....	124
<b>Figura 40.</b> Niveles de monocitos intermedios en pacientes con estenosis aórtica, según la morfología de su válvula .....	127
<b>Figura 41.</b> Porcentaje de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> ) respecto al número total de linfocitos T en pacientes con válvula aórtica sana frente a estenosis aórtica.....	128
<b>Figura 42.</b> Linfocitos T angiogénicos (CD3 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD184 <sup>+</sup> ) según el grupo de pacientes .....	129
<b>Figura 43.</b> Correlación entre el diámetro de la raíz de aorta y la ratio CD4/CD8.....	130





## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Valores de referencia por ecocardiografía transtorácica de la raíz aórtica, según el consenso de 2022 de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (ASE). .....	19
<b>Tabla 2.</b> Valores de referencia por ecocardiografía transtorácica de la aorta ascendente tubular según diferentes estudios. ....	19
<b>Tabla 3.</b> Principales genes asociados a aortopatía bicúspide.....	52
<b>Tabla 4.</b> Principales microRNAs que muestran una expresión diferencial en pacientes con válvula aórtica bicúspide, con o sin aortopatía asociada. ....	57
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos utilizados para la identificación de distintos subtipos celulares dentro de las células mononucleares circulantes de pacientes, mediante citometría de flujo.....	92
<b>Tabla 6.</b> Características principales de la población global según la morfología de la válvula aórtica. ....	101
<b>Tabla 7.</b> Características de la población de acuerdo con la presencia o no de dilatación de aorta ascendente.....	110
<b>Tabla 8.</b> Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800795 del gen <i>IL6</i> . ....	111
<b>Tabla 9.</b> Características de los pacientes incluidos en el estudio genético según la presencia o ausencia de estenosis aórtica. ....	113
<b>Tabla 10.</b> Asociación entre los polimorfismos y la estenosis aórtica según la morfología de la válvula aórtica.....	115
<b>Tabla 11.</b> Asociación entre los polimorfismos <i>PALMD</i> e <i>IL6</i> y el contenido de calcio en la válvula aórtica medido por microtomografía computarizada.....	119
<b>Tabla 12.</b> Análisis de asociación entre polimorfismos y varios rasgos cardiovasculares. ....	121
<b>Tabla 13.</b> Principales características demográficas y clínicas de la cohorte de pacientes en los que se analizaron los niveles de marcadores inflamatorios. ....	123
<b>Tabla 14.</b> Características clínicas y ecocardiográficas de los pacientes seleccionados para el estudio inmunológico. ....	126
<b>Tabla 15.</b> Proporción y frecuencia de las distintas subpoblaciones de monocitos circulantes en los distintos grupos de pacientes. ....	127
<b>Tabla 16.</b> Porcentajes de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes ( $CD4^+CD28^{null}$ ) respecto al número total de linfocitos T según el grupo de pacientes.....	128
<b>Tabla 17.</b> Porcentajes de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes ( $CD3^+CD4^+CD28^{null}$ ) respecto al número total de linfocitos T según la morfología de la válvula. ....	129





## **Introducción**

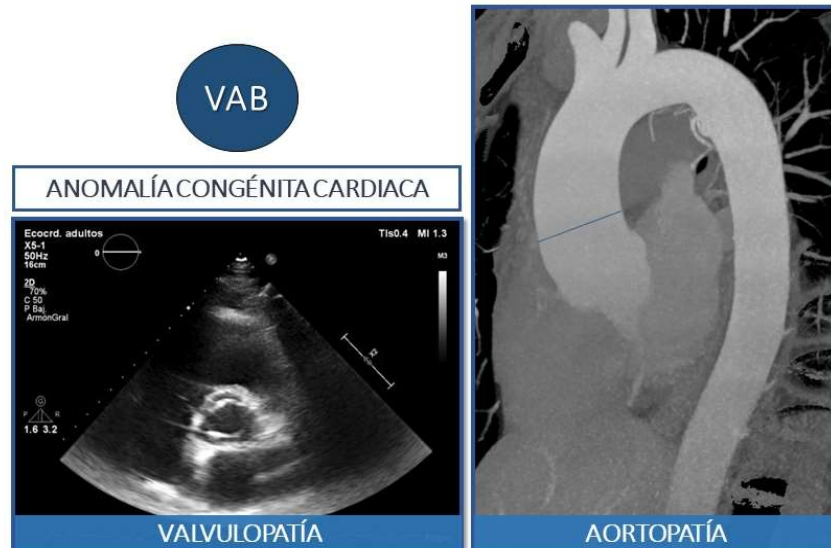
---





## 1. Nociones generales de la válvula aórtica bicúspide

Las cardiopatías congénitas son las anomalías más comunes entre los recién nacidos, con una incidencia de hasta 8,5 por cada 1000 nacidos vivos (1) (2). De entre ellas, la válvula aórtica bicúspide (VAB) es la más frecuente (3) (4), presentando un claro patrón de agregación familiar y heredabilidad (5). Se define, como veremos más adelante, por la existencia de dos comisuras que delimitan solo dos cúspides, en lugar de las tres definidas en la anatomía normal de la válvula aórtica (3). Dentro de la clasificación de las cardiopatías congénitas se incluye en el grupo de complejidad menor cuando no se asocia a otros síndromes o a coartación de aorta (6). Sin embargo, como comprobaremos a lo largo de las siguientes líneas, está lejos de ser una malformación congénita inocente.



**Figura 1.** Afectación bimodal bicúspide, a nivel de válvula y de aorta. Ilustración a la izquierda: ecocardiografía en paraesternal eje corto, válvula aórtica bicúspide en sístole. Ilustración a la derecha: imagen de resonancia magnética, mostrando un segmento dilatado de aorta ascendente tubular (línea continua).

Existe una usual asociación con una gradual dilatación de la aorta torácica ascendente (7) (8), lo que ha llevado en algunos ámbitos a denominar la entidad, en lugar



de válvula aórtica bicúspide, *aortopatía bicúspide*, con el fin de reflejar la afectación bimodal (Figura 1). Las complicaciones derivadas, tanto valvulares (estenosis, insuficiencia, endocarditis infecciosa (EI)) como aórticas (dilatación, disección), presentan un gran impacto, con un detrimento de la salud y calidad de vida de la población afectada. Sobre todo, debido a que la morbilidad acontece desde una edad temprana (9) (10). Debido a ello, aparece un no menospreciable coste sanitario, ya que estos pacientes precisan un seguimiento con consultas médicas, pruebas diagnósticas, etc. prácticamente a lo largo de toda su vida desde que se conoce el diagnóstico, sumado al cribado en cascada indicado para sus familiares de primer grado (9) (11) (12).

Los tratamientos actuales consisten en sustituir el segmento aórtico enfermo, o bien, reparar o sustituir la válvula cuando ésta presenta una disfunción grave. Hasta la fecha, no se conoce ningún tratamiento que enlentezca, detenga o cure la progresión de la enfermedad valvular y/o aórtica. En general, podemos decir que a los pacientes se les realiza un seguimiento médico hasta que llega el momento de la intervención. Indagar y descubrir posibles dianas terapéuticas es una misión fundamental para cambiar el paradigma de esta enfermedad y ofrecer otras terapias a estos individuos. No obstante, las bases moleculares de los procesos biológicos que llevan a la formación de una VAB en lugar de a una válvula aórtica trivalva (VAT) y los procesos que llevan a una degeneración valvular precoz o a la progresiva dilatación aórtica siguen en continuo estudio. A pesar de que en los últimos años se ha producido una intensa investigación internacional en este campo, la fisiopatogenia de la enfermedad no es del todo conocida y muchas preguntas siguen abiertas. La búsqueda de las causas moleculares y genéticas que llevan al desarrollo de las complicaciones valvulares y aórticas resulta trascendental para mejorar en el futuro próximo la salud y calidad de vida de los individuos y familias afectadas por VAB.



## 2. Embriología de la válvula aórtica

La razón que subyace a que algunas personas de la población nazcan con una válvula semilunar aórtica bicúspide en lugar de presentar tres valvas bien diferenciadas es aún desconocida. Se siguen realizando grandes esfuerzos en investigación con modelos animales y en humanos para responder a esta pregunta.

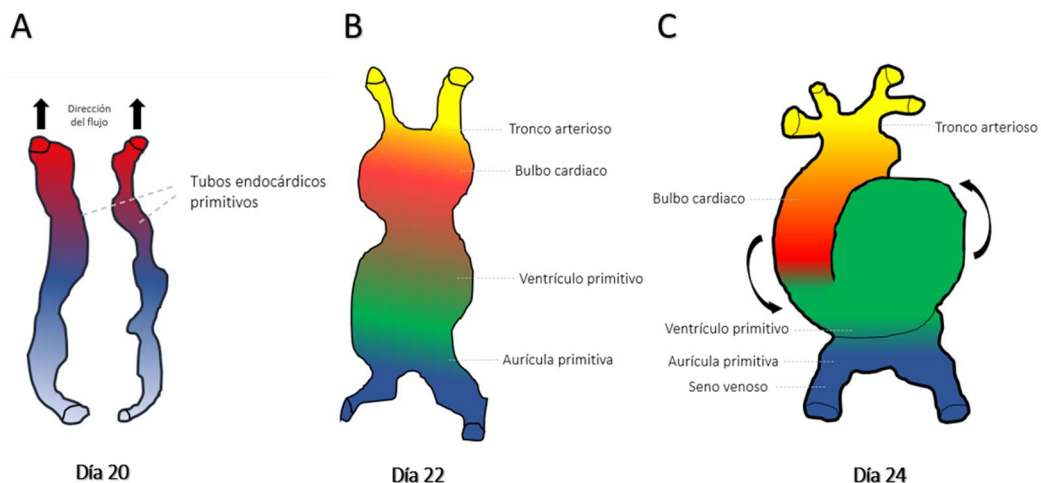
El sistema cardiovascular es el primero en alcanzar una madurez funcional durante el desarrollo embrionario. La morfogénesis de las grandes arterias (aorta y pulmonar) y de las válvulas semilunares ocurre en una etapa temprana del período embrionario (13) (14) (15). Una vez ha finalizado el período inicial de gastrulación, comienza a formarse el tubo cardíaco primitivo durante la tercera semana después de la fecundación. Las primeras líneas de células cardíacas se originan en el llamado mesodermo esplácnico ventral, que está formado por células madre mesenquimales multipotentes. Estas células madre, que van a originar el órgano cardíaco, han experimentado previamente una migración epiblastica y experimentado la transición epitelio-mesénquima (EMT) para formar el mesodermo. La EMT está mediada principalmente por la señalización del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), así como por los genes de la familia WNT (13). A su vez, muchos otros genes reguladores participan en la morfogénesis cardíaca: genes de las familias MEF2, NKX2, GATA, TBX, HAND, PITX, IRX, etc. que controlan el destino de las células cardíacas primitivas y su diferenciación celular (16) (17), si bien, hasta la fecha, no existe una correlación exacta entre una mutación de un gen y un defecto cardíaco aislado concreto.

Con la migración celular, el mesodermo da lugar al primer y segundo campo cardíaco. Son las células ubicadas en la porción más caudal del segundo campo cardíaco las que contribuirán a la formación de los tractos de salida ventriculares, las válvulas semilunares y la pared proximal de las grandes arterias (14). Se ha demostrado que los



progenitores de las células del segundo campo cardíaco están marcados por el factor de transcripción ISL1 (18) (19). La migración y proliferación de estas células multipotentes mesodérmicas está en parte regulada también por la vía de señalización NOTCH (14) (20) (21). Asimismo, se ha demostrado que el endocardio primitivo, que deriva de células progenitoras vasculares, originadas del primer campo cardíaco, también juega un papel crucial en la proliferación de almohadillas endocárdicas y en la regulación de las migraciones de subpoblaciones celulares multipotentes (22) (23). Así, tres grupos celulares principales participan en la formación del tracto de salida ventricular: las células mesodérmicas del segundo campo cardíaco, las células endocárdicas primitivas y las células de la cresta neural (ectodérmicas) (23) (24).

Los tractos de salida de los ventrículos derecho e izquierdo se desarrollan, fundamentalmente, a partir del cono (porción distal del bulbo cardíaco), contribuyendo también, pero en menor proporción, el tronco arterioso y el canal atrioventricular (Figura 2).

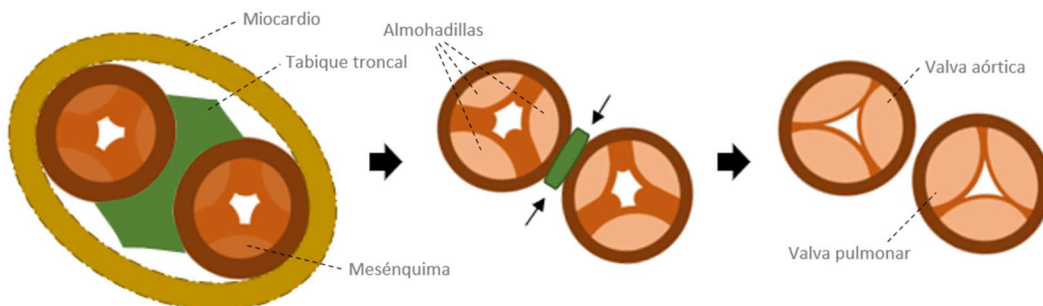


**Figura 2.** Esquema de las fases iniciales de la formación del corazón primitivo en el desarrollo embrionario. A) Tubos endocárdicos previos a su fusión ventral (20 ± 1 días). En esa fase las células miocárdicas poseen miofibrillas en su citoplasma, con cierta capacidad contráctil, aunque aún no se ha establecido plenamente la circulación. B) Comienzan a diferenciarse las primitivas cavidades cardíacas en la "fase de asa" (22 ± 1 días). C) El tubo cardíaco progresivamente va a sufrir un proceso de torsión y rotación, continuando la compleja formación de cada cavidad.



El tronco arterioso (último segmento del tubo cardiaco) es la estructura que une al corazón primitivo con el saco aortopulmonar. Estudios experimentales han demostrado que la mayor parte de las grandes arterias (aorta ascendente y tronco pulmonar) se originan de las paredes del saco aortopulmonar y solo la porción más inmediatamente superior al plano valvular procede del tronco arterioso.

Durante la compleja etapa embrionaria de tabicación cono-troncal, que dará lugar a los dos circuitos arteriales separados, tiene lugar el desarrollo de las válvulas aórtica y pulmonar en humanos, que comienza aproximadamente entre los días 31 y 35 (quinta semana de gestación) a partir de las llamadas almohadillas o cojinetes endocárdicos localizadas en el tronco arterioso (14). Los progenitores celulares que ocupan estas protuberancias primitivas proceden de la EMT, condicionando un primordio de mesénquima sólido. Se forman seis almohadillas, tres a cada lado del tabique troncal (Figura 3). Poseen una forma piramidal de base superior (más anchas hacia la cara de la arteria y más estrechas hacia el ventrículo).

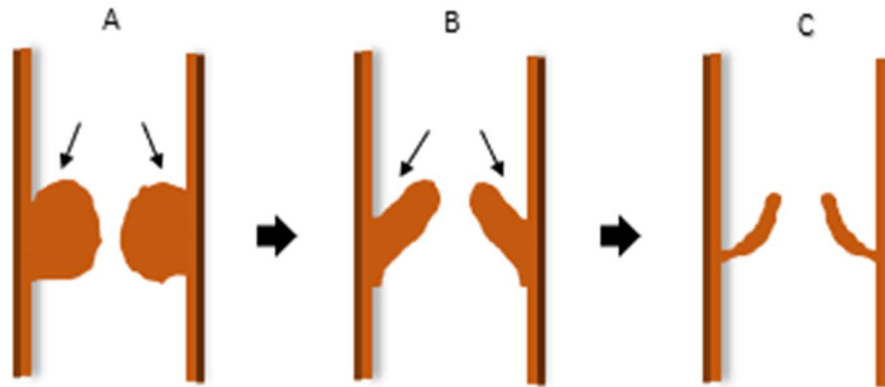


**Figura 3.** Corte transversal durante la formación embrionaria de las válvulas semilunares. Los primordios se desarrollan durante el proceso de tabicación troncal, apareciendo seis engrosamientos de mesénquima, tres a cada lado del tabique. Posteriormente, el miocardio que rodea al tabique troncal se va estrechando, configurándose la separación entre la aorta y el tronco pulmonar, dando lugar a sus correspondientes válvulas, constituidas cada una de ellas por tres valvas.

Posteriormente, estas almohadillas endocárdicas se ahuecan en su parte superior (cara arterial), mediante procesos de apoptosis y reorganización de la matriz extracelular, hasta dar lugar a una formación fina rica en colágeno, proteoglicanos y elastina con forma



de bolsa (Figura 4). Esta cavitación da lugar a tres valvas en cada válvula semilunar. Su porción más periférica se sumirá en la pared arterial para formar la pared del seno, que participará como zona de apoyo (13) (14).



**Figura 4.** Secciones sagitales de las válvulas semilunares en las semanas 6 (A), 7 (B) y 9 (C) del desarrollo embrionario. Se muestra el proceso de adelgazamiento o cavitación. La superficie superior de cada almohadilla endocárdica se vacía (flechas) en forma de nido de golondrina, para formar cada cúspide valvular.

Aunque parece haber un laberinto de mecanismos y procesos, la lista de factores de transcripción y moléculas conocidos con un papel importante en la formación de la válvula aórtica y el tracto de salida ventricular es cada vez mayor. Estos factores de transcripción se superponen, hasta cierto punto, con genes que se han implicado en la formación de la VAB como son los de las familias NOTCH, GATA, BMP, SMAD, etc. La inhibición de la señalización a través de NOTCH 1-4 o de sus ligandos como JAG1 se ha relacionado con defectos de formación de los grandes vasos y de los tractos de salida ventriculares; estas alteraciones genéticas se encuentran también en el síndrome de Alagille, que asocia frecuentemente estenosis congénita de la válvula pulmonar (25) (26).

La alta complejidad tanto de los procesos embrionarios implicados en el desarrollo normal del tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI), como las múltiples variantes fenotípicas de la VAB, dan como resultado una enorme red de posibles mecanismos





involucrados en su origen, muchos de ellos aún por descubrir. Por esta razón, es fundamental continuar con una profunda investigación sobre los mismos.

### 3. Anatomía y fisiología de la válvula aórtica

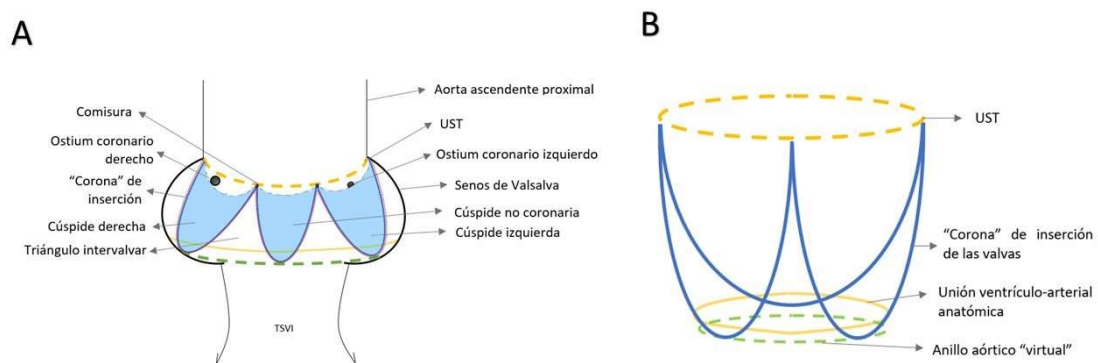
El objetivo esencial de las válvulas cardiacas, entre ellas, la aórtica, es mantener el flujo unidireccional de sangre durante el ciclo cardiaco. Su funcionamiento correcto depende de la flexibilidad e integridad de sus *hojas*, llamadas valvas, velos o cúspides en el caso de las válvulas pulmonar y aórtica, y de la arquitectura adyacente donde se insertan. Estas estructuras sufren una deformación tisular no despreciable con cada contracción durante toda la vida del individuo, que pueden sumar un mínimo de 30 millones de contracciones anuales. Son sometidas, por tanto, a esfuerzos mecánicos repetidos de gran intensidad (por ejemplo, la válvula aórtica sostiene, en diástole, gradientes de presión transvalvular de hasta 80 mmHg). Soportar esta actividad de manera precisa requiere de una estructura anatómica exquisita, seleccionada a través de millones de años de evolución animal.

#### 3.1. Anatomía.

La válvula aórtica se dispone entre el ventrículo izquierdo y la aorta, siendo el lugar de paso de todo el flujo sanguíneo del circuito sistémico. Forma parte de la unidad anatomo-fisiológica de la *raíz aórtica*, lugar de unión entre el ventrículo izquierdo y la aorta ascendente, originada, como vimos previamente, del tronco arterioso. En la raíz aórtica, las únicas ramas arteriales que nacen son las arterias coronarias. Ocupa una posición central en la anatomía cardiaca, en estrecha relación espacial con múltiples estructuras: aurícula derecha, aurícula izquierda, tracto de salida del ventrículo derecho, válvula mitral (*unión mitroaórtica*), válvula pulmonar, válvula tricúspide y sistema de



conducción (*haz de His*). Esta estructura, aunque aparenta simplicidad, posee en verdad una elevada complejidad. Podemos decir que la válvula aórtica es mucho más que tres simples cúspides, cobrando especial relevancia las estructuras adyacentes que conforman la raíz aórtica. Esta *unidad anatomo-fisiológica* consta de varias estructuras para lograr un funcionamiento adecuado en cada ciclo cardíaco (Figura 5) (27) (28) (29) (30).



**Figura 5.** Esquema de la estructura de la raíz aórtica, enfatizando su complejidad y la relación entre sus componentes. A) Representación sobre plano. B) Representación tridimensional. La línea verde punteada indica el anillo aórtico *virtual*; la línea continua amarilla representa la unión ventrículo-arterial anatómica (cuya naturaleza no plana se enfatiza en la imagen B); las líneas azules muestran la forma de corona de la inserción de las valvas; y la línea naranja discontinua representa la unión sinotubular (UST). TSVI: tracto de salida del ventrículo izquierdo.

#### a) Unión ventrículo-arterial anatómica

La unión ventrículo-arterial anatómica es el lugar en el que el miocardio termina y da paso a la pared aórtica fibroelástica. Sin embargo, debido a la configuración de la raíz aórtica, la unión ventrículo-arterial anatómica no coincide con la unión funcional. En esta región no se produce un cambio abrupto de tipo de tejido, sino que es una zona de transición. Existen dos componentes: 45 % muscular y 55 % fibroelástico. Esta parte muscular se extiende milimétricamente y de forma irregular, mezclándose con tejido adiposo y conectivo hacia la zona de inserción de la cúspide derecha y de la parte anterior de la cúspide izquierda. La zona relacionada con la parte posterior de la cúspide izquierda



y de la no coronaria es parte fibrótica, dispuesta en relación con el velo anterior mitral (zona de unión mitroaórtica) y el septo membranoso ventricular.

b) Cúspides aórticas

La válvula consta de tres cúspides con la famosa forma *en nido de golondrina*. La cara superior es cóncava y la cara inferior es convexa. Posee un margen libre y un margen que se une a la raíz aórtica con forma semilunar, formando, entre cúspides adyacentes a nivel de la pared y a la altura de la *unión sinotubular* (UST), las comisuras. Esta línea de inserción es aproximadamente 1,5 veces más larga que la longitud del margen libre. Dichas cúspides no tienen cuerdas tendinosas que las sostengan, como sí sucede en las válvulas aurículo-ventriculares. La altura efectiva, distancia en vertical, se define desde el plano más basal de inserción del velo hasta el borde libre, y en población adulta oscila entre 8 y 10 mm, siendo la altura de la valva menor que la del seno de Valsalva adyacente (31). El borde libre de cada cúspide que va a constituir el área de aposición se denomina *lúnula*; en su punto medio, es más grueso, formando el llamado *nódulo de Arancio*, que colabora en mejorar el cierre valvular con la cúspide adyacente. Este cierre valvular es un mecanismo de alta precisión, pues la superficie de coaptación de las cúspides en diástole es tan solo de 3 mm. Aunque a menudo se transmite una imagen de simetría para la válvula aórtica y los senos de Valsalva, éstos, en la realidad no son geoméricamente simétricos, siendo la valva no coronaria usualmente más grande.

c) Inserción de las valvas

La inserción de las valvas, o cúspides, en la pared de la aorta conforma una estructura en forma de corona, configurando de esta manera tres comisuras en el sitio de unión más alto entre las mismas y los tres *senos de Valsalva*. No existe un verdadero *anillo aórtico* (con forma de circunferencia) en la raíz aórtica, sino que el anillo aórtico



va a ser esta línea tridimensional con apariencia de corona, que constituye una región de tejido conectivo más denso, y que es la zona de inserción de las cúspides. Esta disposición aporta flexibilidad, ya que un anillo fibrótico circular sería más rígido y robusto, generando mayores gradientes y velocidades transvalvulares de forma basal (sin enfermedad), similar a lo que sucede con las prótesis aórticas.

Por otro lado, debemos hacer referencia a un concepto ampliamente usado en la imagen multimodal en cardiología. La circunferencia imaginaria que une los tres puntos nadir de cada valva constituye el llamado *anillo aórtico virtual*, que no es ni anatómica ni histológicamente reconocible, pero sí mensurable mediante técnicas diagnósticas de imagen. El diámetro y el perímetro de esta circunferencia van a ser utilizados en la programación de las intervenciones percutáneas de recambio valvular aórtico, de ahí su relevancia.

#### d) Triángulos intervalvares

Constituyen tres triángulos que se proyectan por encima del ventrículo, localizados entre las valvas. El vértice del triángulo llega a la UST y su base está entre los puntos nadir de cada velo, limitando con la unión ventrículo-aórtica anatómica. Si bien anatómica e histológicamente son pared aórtica, hemodinámicamente van a formar parte del TSVI, ya que van a estar sometidos a las presiones ventriculares durante el ciclo cardiaco (se disponen por debajo del cierre de las valvas), poseyendo una enorme importancia en la dinámica de eyección ventricular. Estos triángulos no poseen la estructura del miocardio (fibras musculares), sino que se componen de tejido conectivo, pero son más delgados y con menos colágeno que las paredes sinusales. Hay que destacar que el triángulo entre las cúspides derecha y no coronaria se une al tabique interventricular membranoso y está en estrecha relación con el haz de His del tejido de conducción cardiaco.



e) Senos de Valsalva

Inmediatamente superior a cada valva, la pared de la aorta está ligeramente dilatada, formando unos espacios esenciales para el funcionamiento correcto de la válvula que son los senos de Valsalva. Las arterias coronarias nacen de estos espacios a través de un *ostium*, dando nombre al seno y, por ende, a la valva correspondiente. Los ostium suelen estar cerca del nivel de la UST, pero por debajo de ésta. De este modo, la arteria coronaria derecha emerge del seno aórtico derecho, justo superior a la valva derecha; el tronco coronario nace del seno aórtico izquierdo; y, el seno restante, del cual no nace ninguna coronaria, es el llamado seno no coronario. Suelen ser asimétricos, siendo habitualmente el seno no coronario más grande. Estos senos funcionan como reservorio sanguíneo en diástole, cuando la válvula se cierra, hecho que ayuda a cerrar las valvas y perfundir las arterias coronarias. En sístole, cuando la presión ventricular supera a la aórtica, las cúspides se abren y se adhieren a su seno respectivo, permitiendo un flujo con mínima resistencia.

f) Unión sinotubular

La unión sinotubular (UST) constituye la zona más distal de la raíz aórtica, punto de separación entre ésta y la aorta ascendente proximal. Es la circunferencia que une las tres comisuras, siendo una especie de cintura o anillo. Se compone de fibras elásticas circunferenciales, siendo parte integral del mecanismo valvular. Posee un diámetro menor que los senos de Valsalva, teniendo una geometría, en realidad, elíptica.

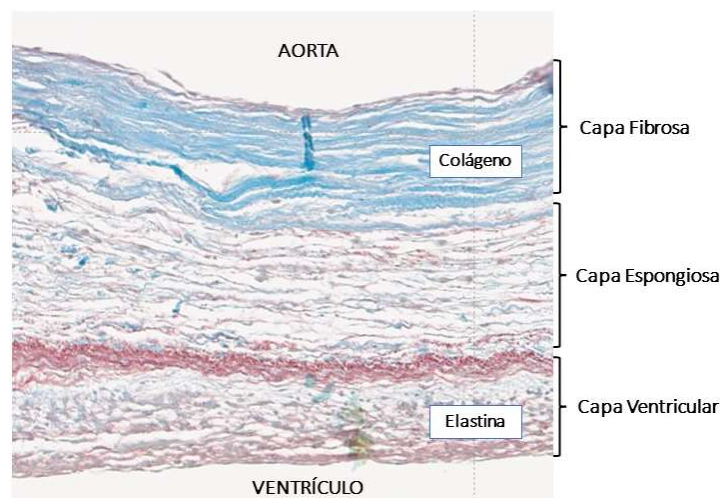


## 3.2. Histología

### 3.2.1. Válvula

La válvula aórtica se constituye principalmente por tejido conectivo. Cada cúspide presenta tres capas diferenciadas (Figura 6), que desde su cara aórtica a la cara ventricular son:

- a) *Capa arterialis o fibrosa*. Predominan las fibras colágenas. Los haces de colágeno más grandes se alinean circunferencialmente, paralelos al margen libre. Las fibras alineadas radialmente se encuentran cerca de la región de la pared de la raíz aórtica. Las fibras de colágeno son principalmente tipo I, aportando solidez a la cúspide.
- b) *Capa esponjosa*. Rica en mucopolisacáridos, tipo glucosaminoglicanos y proteoglicanos.
- c) *Capa ventricularis o ventricular*. Compuesta en su mayoría por fibras de elastina. Estudios biomecánicos aducen que estas fibras resultan esenciales en restaurar la forma original de las fibras de colágeno y, por tanto, de la cúspide con cada movimiento.



**Figura 6.** Corte transversal histológico de un velo aórtico teñido con tinción de orceína.



Las cúspides aórticas son estructuras esencialmente avasculares. La delgadez de las cúspides les permite nutrirse por difusión a partir de la sangre del corazón. Dentro de esta matriz extracelular conectiva, en sus tres capas, podemos encontrar embebidas células que mantienen su homeostasis, llamadas células intersticiales valvulares (VICs, *valvular interstitial cells*, por sus siglas en inglés). Como veremos más adelante, estas células juegan un papel principal en la inflamación y degeneración de la válvula aórtica. Bordeando estas capas, tanto por su cara ventricular como aórtica, hay una monocapa de células endoteliales valvulares (VECs, *valvular endotelial cells*).

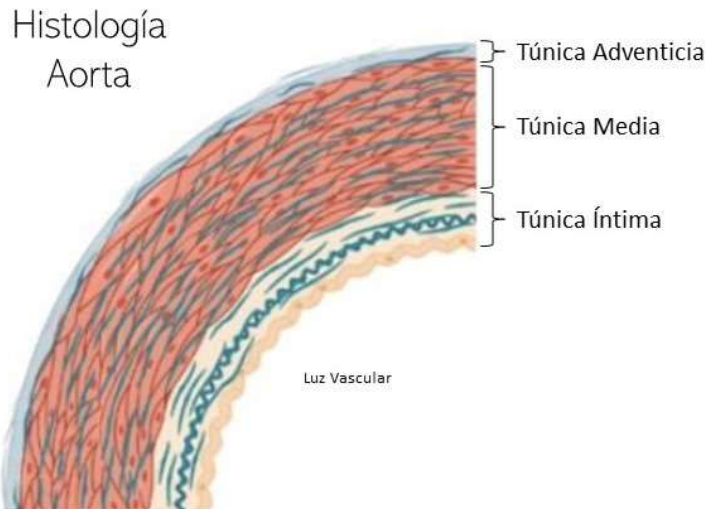
### 3.2.2. Aorta

La aorta es la arteria principal del cuerpo humano y la de mayor tamaño, alcanzando máximos cercanos a 4 cm de diámetro en la raíz aórtica y gradualmente disminuyendo en su recorrido, siendo de 3,5 cm en la aorta ascendente y cerca de 2,5 cm en la aorta abdominal. La aorta es una arteria elástica y su pared consta de tres capas bien definidas que, del interior al exterior, son (Figura 7):

a) *Túnica íntima* formada por la capa endotelial de epitelio plano simple y la capa subendotelial con tejido conectivo laxo. Esta túnica está separada por la llamada membrana elástica interna.

b) *Túnica media*, es la capa más gruesa y principal, constituida por, aproximadamente, 50-70 capas de fibras elásticas fenestradas que dan soporte y flexibilidad a la pared, junto con fibras musculares lisas, fibras colágenas y células del tejido conectivo. Está separada de la siguiente capa por la membrana elástica externa.

c) *Túnica adventicia*, capa exterior compuesta por tejido conectivo laxo, tejido adiposo, fibras colágenas y donde se encuentran los *vasa vasorum* y los *nervi vasorum*.

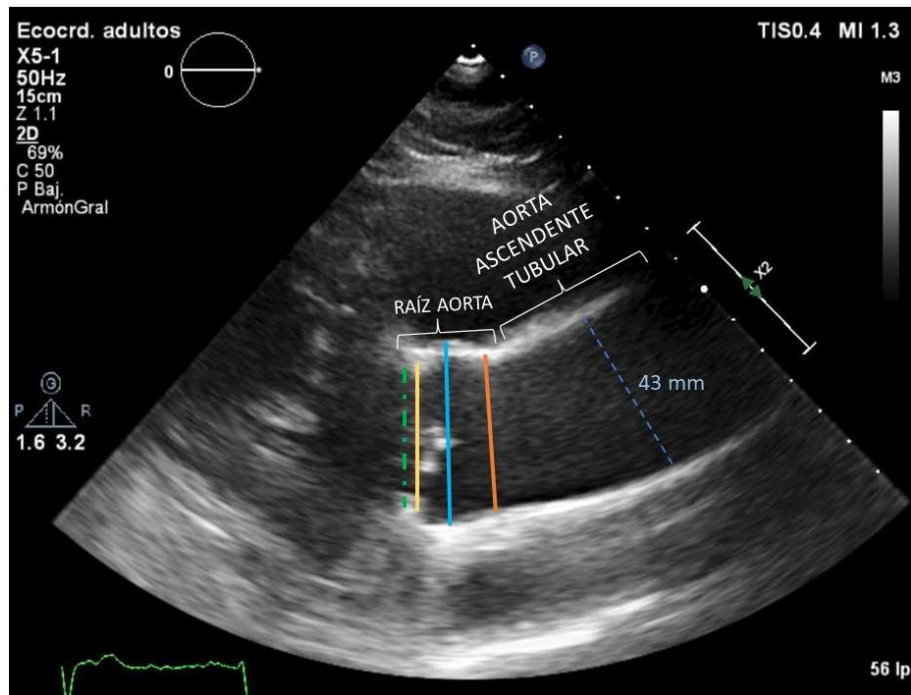


**Figura 7.** Esquema histológico en corte transversal de la pared del vaso arterial aórtico. Se muestran las diferentes estructuras y capas que la componen. Modificada de <https://www.lecturio.com>, licencia libre CCBY 4.0

### 3.3. Una unidad fisiológica

La raíz aórtica y la válvula aórtica constituyen un complejo sistema que trabaja al unísono, para preservar el objetivo de mantener la dirección del flujo sanguíneo (27). Las relaciones geométricas entre el anillo aórtico, los senos de Valsalva, las cúspides y la UST son impecables. Constituye una solución óptima para conseguir la máxima apertura y el mejor cierre con la mínima resistencia. Una alteración en cualquiera de los componentes descritos previamente altera la funcionalidad del sistema. Está demostrado como la morfología y diámetros de los senos de Valsalva y de la UST son intrínsecamente importantes para la competencia de la válvula aórtica (Figura 8) (27) (32). Es importante tener presente que las mediciones del anillo virtual, senos de Valsalva, UST y aorta ascendente tienen implicaciones clínicas para el paciente con VAB.





**Figura 8.** Imagen de ecocardiografía transtorácica en eje paraesternal largo centrado en aorta. A la derecha, se señala la leve dilatación de aorta ascendente tubular proximal (43 mm) del paciente. A la izquierda, se señala en código de colores los niveles de la raíz aórtica: anillo aórtico “virtual” (verde punteado), unión ventrículo-arterial anatómica (amarillo), senos de Valsalva (azul) y unión sinotubular (UST, naranja).

Durante el ciclo cardiaco, los movimientos de apertura y cierre de la válvula aórtica son pasivos, dependiendo de los gradientes de presión. Los senos de Valsalva se mueven con la aorta ascendente, es decir, se expanden durante la sístole y disminuyen su tamaño con el llenado ventricular. Sin embargo, los triángulos intervalvares se mueven con el ventrículo, reduciendo su longitud con la expulsión y aumentando de tamaño en diástole. De esta forma, durante la sístole, debido al ensanchamiento de la UST (que tira de las comisuras para separar los velos), la flexibilidad de las valvas y la fuerza del flujo sanguíneo, las cúspides son presionadas hacia las paredes de la aorta, ofreciendo escasa resistencia al flujo. La disposición de la raíz aórtica se convierte en un cono truncado, con la zona estrecha hacia el ventrículo izquierdo, facilitando la progresión de la sangre, recordando un movimiento de peristalsis intestinal, de manera que se optimiza la eficiencia del sistema. En la diástole, la retracción elástica de la aorta hace retroceder la



sangre. Gracias a los espacios de los senos de Valsalva, se crean corrientes circulares en ellos, manteniendo separadas las valvas de la pared aórtica, y permitiendo la irrigación coronaria. Además de este factor, el anillo aórtico y los triángulos intervalvares se expanden y la UST se retrae, tirando de la base de la valva, contribuyendo al cierre. Así, las valvas se aproximan entre sí, cerrando bruscamente el orificio al apoyarse una valva sobre la otra, como si de un paraguas invertido se tratara, evitando que la sangre retorne al ventrículo izquierdo (27) (28) (29).

Por consiguiente, podemos decir que la raíz aórtica provee un extraordinario contexto de bajo estrés mecánico con el fin de favorecer la durabilidad de las cúspides aórticas. En el caso de la aortopatía bicúspide este sofisticado sistema se ve alterado, por lo que no debe sorprender que exista mayor estrés hemodinámico sobre las valvas y la pared aórtica, conllevando un deterioro precoz de las estructuras que lo componen.

### 3.4. Dimensiones de la raíz aórtica

Estudios ecocardiográficos en poblaciones de individuos aparentemente sanos han demostrado que los diámetros de la raíz y de la aorta ascendente son proporcionales al tamaño del cuerpo (comúnmente expresado como área de superficie corporal, ASC), a la edad (aumentando en 0,1 mm/año en adultos) y que varían según el género, siendo mayores en hombres (33) (34). Debido a los cambios en el tamaño del cuerpo y las estructuras cardiovasculares que ocurren desde la infancia y adolescencia, en dichas edades se utiliza *z-score* para comparar las mediciones aórticas obtenidas respecto al rango normal para su edad y ASC, siendo anormal aquél identificado como un *z-score* superior a dos desviaciones estándar por encima de la media.

En las series documentadas pueden aparecer variaciones debido a la controversia que ha existido sobre cómo medir la aorta (borde externo a borde interno, borde interno a borde interno, etc.) (35). Los consensos más actuales (Tablas 1 y 2) han tratado de



resolver este problema, pero se ha visto como en las series de VAB en adultos, la ecografía transtorácica (ETT) subestima sistemáticamente la medida de la raíz de aorta (también debido a la asimetría de los senos de Valsalva) en comparación con la tomografía computarizada (TC), mientras que las mediciones son generalmente más congruentes entre el ETT y la TC en diástole para la aorta ascendente (36).

**Tabla 1.** Valores de referencia por ecocardiografía transtorácica de la raíz aórtica, según el consenso de 2022 de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (ASE).

	Diámetro de la raíz aórtica					
	Hombres			Mujeres		
Rango de edad, años	18-40	41-65	>65	18-40	41-65	>65
Anillo aórtico, mm	21,5±2,1	21,2±2,2	20,7±2,2	19,5±1,9	19,5±2,2	19,4±2,3
Senos de Valsalva, mm	31,2±3,4	32,8±3,7	33,1±4	28,1±3,6	29,8±3,2	31,1±3,2
por ASC, mm/m <sup>2</sup>	16,5±2,2	17,4±2,4	18,2±2,7	17,3±2,4	17,9±2,4	19,3±2,8
Unión sinotubular, mm	26,7±3,2	28,4±3,6	28,6±4	24,4±3,3	26±3,2	26,7±3
por ASC, mm/m <sup>2</sup>	14,1±2	15±2,2	15,7±2,6	15±2,2	15,6±2,2	16,6±2,6

ASC: área de superficie corporal. Adaptada de (34).

**Tabla 2.** Valores de referencia por ecocardiografía transtorácica de la aorta ascendente tubular según diferentes estudios.

Guía	Diámetro de la aorta ascendente tubular, mm	
	Hombres	Mujeres
Sociedad Americana de Ecocardiografía, 2016 (37)	29,7±3,6	27,4±3,1
Estudio de Hamburgo, 2021 (33)	27,91 [27,68–28,13]	25,15 [24,97–25,32]
Asociación Europea de Imagen Cardiovascular (EACVI), 2017 (38)	29,9±3,8	27,3±3,4

#### 4. Definición, nomenclatura y subtipos de válvula aórtica bicúspide

Las primeras descripciones de VAB tienen lugar ya en el Renacimiento italiano, cuando comienzan los primeros estudios anatómicos en Europa, en pleno desarrollo sociocultural, junto con el afán por el conocimiento de todas las disciplinas. Clásicamente se atribuye a Leonardo da Vinci (siglo XVI) la descripción y estudio por vez primera de una VAB en humanos (39). Los manuscritos de estos estudios se han conservado hasta



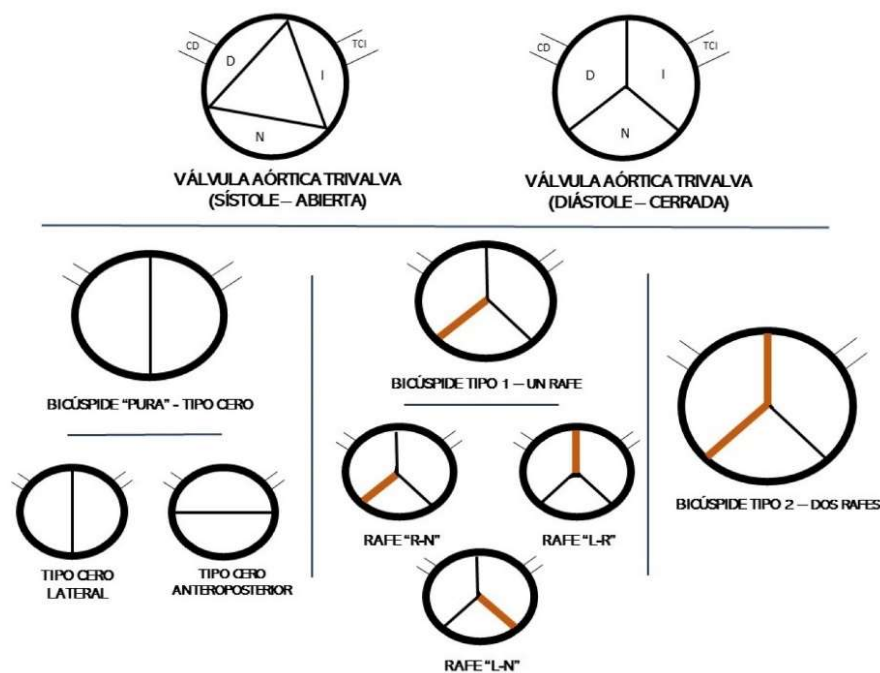
hoy y forman parte de la colección de la corona de Inglaterra, pudiendo visitarse en este enlace: [www.royalcollection.org.uk](http://www.royalcollection.org.uk).

No es hasta el siglo XIX, junto con la revolución científica, cuando se realiza el primer estudio por Paget (1831) donde se advierte que la configuración de este tipo de válvula le lleva a enfermar precozmente (40). En 1858, Peacock relaciona la VAB con mayor deterioro, estenosis e insuficiencia (41). Y en 1886, Osler, tras el estudio de 18 casos, llama la atención sobre su predisposición a la inflamación y a la EI subaguda (42). Es durante el siglo XX cuando también se comienza a relacionar con la enfermedad de la aorta, en trabajos como el de Maude Abbott (gran estudiosa de las cardiopatías congénitas) en 1927 (43). Más avanzado el siglo, en la década de 1970, médicos estadounidenses comienzan a plantear que esta entidad congénita tiene un patrón hereditario (44) y se realizan los primeros trabajos con ecografía para identificar en vida portadores de VAB, como el de Nanda *et al.* en 1974 (45), ya que hasta ese momento los estudios eran en series de necropsias. A partir de ahí, progresiva y exponencialmente hasta el día de hoy, se han ido publicando cada vez más estudios y artículos sobre las diferentes características y condicionantes de esta anomalía congénita.

La VAB es aquella con dos comisuras que delimitan dos velos valvulares, si bien hay una gran variabilidad individual respecto a las características pormenorizadas de la válvula: simetría, presencia de rafe, carácter de las comisuras, etc. (3) (46). Esta variabilidad fenotípica ha complicado históricamente la nomenclatura empleada para las definiciones de los diferentes subtipos. Se han propuesto distintas clasificaciones, desde 1970 en trabajos anatomopatológicos como el de Roberts (47) hasta más actuales con TC (48) (49) o resonancia magnética cardíaca (RMC) (50). Quizá, la más extendida y utilizada en los últimos años sea la propuesta por Sievers y Schmidtke en 2007 (51). Diferencian tres subtipos (0, 1 y 2) según la ausencia de rafe, y la presencia de uno o de dos rafe, respectivamente. Luego realizan una subdivisión según la posición espacial del



rafe y los velos. De este modo, en el tipo 0, donde no hay rafes (VAB llamada “pura”), existen dos subcategorías: a) posición lateral, estando los velos a derecha e izquierda; o bien, b) posición anteroposterior de los velos. En el tipo 1 existen tres velos anatómicos pero dos velos funcionales por la presencia del rafe. Es el tipo más frecuente. El rafe puede situarse entre el velo izquierdo y derecho (L-R, por sus siglas en inglés), subtipo más común; entre el derecho y el no coronario (R-N); o bien, por último, entre el no coronario y el izquierdo (N-L), subtipo menos común de los tres. Por último, e infrecuente, el tipo 2 con dos rafes, presentes prácticamente en todos los casos entre el izquierdo y el derecho (L-R) y entre el derecho y el no coronario (R-N) (Figura 9, (52)).



**Figura 9.** Esquema de la clasificación de los tipos de válvula bicúspide según Sievers y Schmidtke. CD: coronaria derecha; TCI: tronco coronario izquierdo; D: velo coronario derecho; I: velo coronario izquierdo; N: velo no coronario; L-R: fusión izquierdo-derecho (*Left-Right*); R-N: fusión derecho-no coronario (*Right-No coronario*); L-N: fusión izquierdo-no coronario (*Left-No coronario*). Adaptado de (51).

Todas estas clasificaciones, con sus limitaciones y particularidades, han traído confusión y pluralidad a la hora de definir cada fenotipo, aumentando la variabilidad intrínseca de los estudios de VAB. Debido a ello, un grupo internacional con los



principales investigadores médicos y científicos dedicados al estudio de la válvula aórtica y de la aorta publicaron recientemente, en 2021, un consenso para intentar homogeneizar y estandarizar la terminología respecto a la VAB (3).

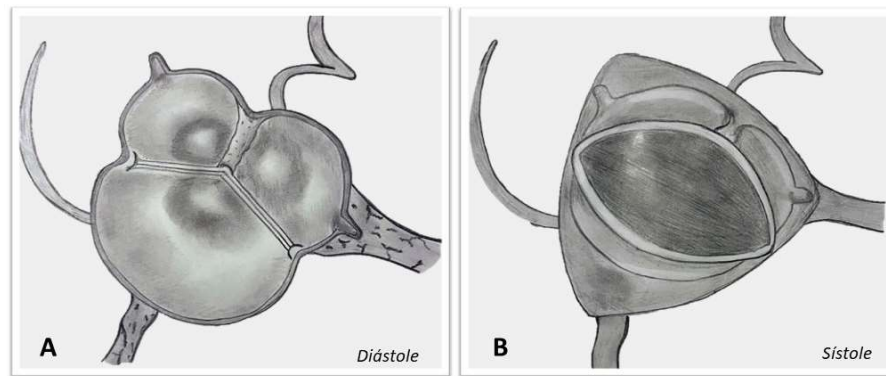
El consenso establece tres subtipos principales de VAB:

#### **A) VAB Fusionada**

Representa el subtipo más común, 90-95 % de los casos. Se caracteriza por poseer tres senos de Valsalva, pero dos cúspides y dos comisuras, debido a la fusión de dos de las cúspides (Figura 10). Esto origina dos cúspides funcionales, de diferente tamaño, asimétricas, siendo de mayor superficie la fusionada. Existe variabilidad en los grados del ángulo comisural de la cúspide no fusionada. En la mayoría existe un *rafe*, llamada así aquella cresta fibrosa dirigida desde el borde libre valvular hasta la pared arterial, y que representa la zona de unión de los componentes del velo fusionado. Por ecografía, el rafe puede no ser visible al inicio, y volverse visible años más tarde cuando comience a calcificarse (altamente ecogénico); además, la calcificación del rafe puede identificarse fácilmente por el patrón de atenuación en TC (53).

La forma de apertura valvular y la posición del rafe van a definir diferentes fenotipos dentro de este grupo.

- *Fusión cúspide derecha e izquierda (R-L)*. Es el más común en términos generales (70-80 %) y el más frecuente en pacientes con síndrome de Turner o con complejo de Shone. Estadísticamente, con relación a los diferentes patrones de dilatación aórtica, este fenotipo también es el más frecuente en cada uno de ellos. También se ha relacionado con mayor insuficiencia aórtica y predominio masculino (54). El fenotipo R-L se ha asociado a coartación de aorta en niños (55)



**Figura 10.** Representación esquemática del fenotipo de válvula aórtica bicúspide fusionada con rafe R-L como se observaría en ecocardiografía transtorácica en un plano paraesternal eje corto. Aplicable en vistas similares obtenidas de TC y RMC. Se muestra la fusión de las cúspides derecha-izquierda (más común) con rafe visible (A). Remarcar que todas las VAB subtipo fusionadas tienen tres senos de Valsalva distinguibles y dos cúspides funcionales de diferente tamaño y/o forma. El diagnóstico suele realizarse en sístole, con la abertura en oval, en “boca de pez” (B).

- *Fusión cúspide derecha y no coronaria (R-N)*. Supone el 20-30 % de los casos. Es el más prevalente en pacientes con síndrome de Down. En diferentes trabajos se asocia a desarrollo progresivo de insuficiencia aórtica (55) (56). Se ha documentado que este subtipo parece más prevalente en poblaciones asiáticas en comparación con las europeas (57).
- *Fusión cúspide izquierda y no coronaria (L-N)*. Es el menos frecuente, suponiendo el 3-6 % de los casos.

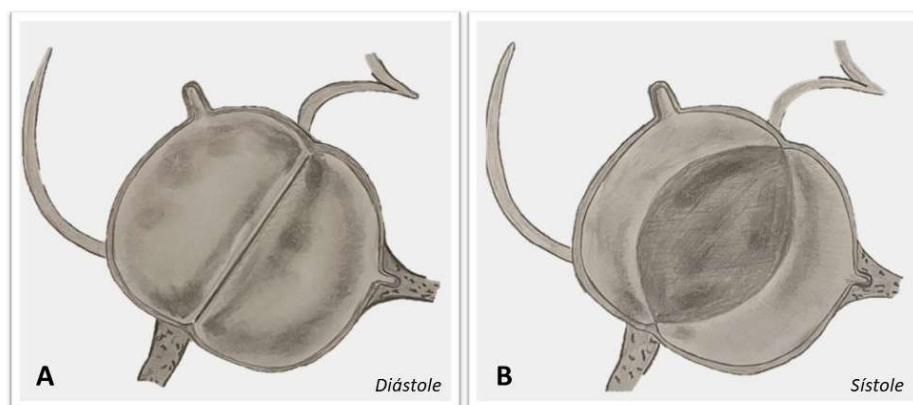
En determinados casos resulta imposible definir el tipo de fusión, por lo que debemos referirnos a ello como VAB con indeterminada fusión de cúspides. Por otro lado, recientemente y cada vez con mayor trascendencia, resulta esencial la evaluación del grado de simetría de la VAB fusionada de cara a planear una cirugía de reparación. Cuanto menor es el ángulo de la comisura (sobre todo  $< 140^\circ$ ), más asimetría y más difícil es la reparación exitosa para el cirujano (58) (59).



Se asume que este tipo de VAB es debido a un defecto durante la remodelación/maduración de las almohadillas endocárdicas, en cuanto a su tabicación y excavación en el desarrollo embrionario (21).

### **B) VAB de 2-senos**

Es un subtipo poco común, representando el 5-7 % de los casos. Este tipo de morfología lleva a pensar que solo dos cúspides se formaron dentro de dos senos de Valsalva, siendo las dos valvas aproximadamente iguales de tamaño, ocupando la mitad de la circunferencia, sin sugerir la fusión de dos de las tres cúspides normales. No hay rafe visible (Figura 11).



**Figura 11.** Representación esquemática del fenotipo de válvula aórtica bicúspide de 2-senos subtipo latero-lateral como se observaría en ecocardiografía transtorácica en un plano paraesternal eje corto. Aplicable en vistas similares obtenidas de TC y RMC. La figura muestra solo dos senos aórticos distinguibles en diástole (A) y dos cúspides en sístole (B) de aproximadamente el mismo tamaño y forma, cada una ocupando 180 grados de la circunferencia, con un ángulo de 180 grados en las comisuras.

Dentro de esta categoría hay dos fenotipos posibles según su disposición espacial:

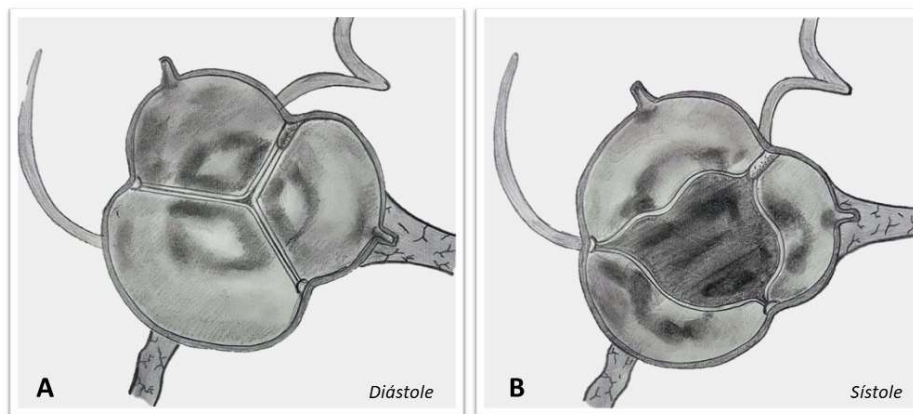
- *Latero-lateral.* En este, una arteria coronaria surge de cada seno. Es el más común de los dos.
- *Antero-posterior.* Puede suceder que una arteria surja de cada seno, o que ambas arterias surjan del seno anterior.





Faltan datos científicos sobre las asociaciones clínicas y el aspecto pronóstico de esta categoría de VAB. Se considera que es debida a una alteración en la formación de las propias almohadillas endocárdicas durante el desarrollo embrionario, asumiendo que simboliza una expresión más grave del mecanismo embrionario. Solamente apuntar, que el tipo 2 de la clasificación de Sievers, que constituía aquellas válvulas con dos rafes, no se incluye en esta clasificación actual, ya que se considera un tipo de válvula unicúspide, y no una VAB propiamente dicha.

### C) VAB con fusión parcial



**Figura 12.** Representación esquemática del fenotipo de válvula aórtica bicúspide con fusión parcial como se observaría en ecocardiografía transtorácica en un plano paraesternal eje corto. Aplicable en vistas similares obtenidas de TC y RMC. La apariencia en diástole (A) es la de una válvula aórtica tricúspide. El diagnóstico por imagen se suele realizar en sístole (B), ya que a pesar de que la abertura parece triangular, hay una pequeña fusión (mini-rafe) entre las cúspides izquierda y derecha.

Este tercer grupo de VAB ha sido reconocido y actualizado gracias al desarrollo de técnicas de imagen con mayor resolución espacial (60) (61) (62). Su prevalencia poblacional es desconocida. Su apariencia es la de una VAT normal, con tres senos, tres velos dispuestos en ángulos de 120° y tres comisuras; sin embargo, una de las comisuras tiene una fusión parcial (< 50 % desde la base), formando un pequeño *mini-rafe* (Figura 12). Esta forma frustrada o incompleta, debido a su defecto de apertura, genera patrones de flujo alterados y excéntricos. Pacientes con dilatación de aorta ascendente, sin clara



definición de VAB en el ecocardiograma, podrían formar parte de este subgrupo. También familiares de pacientes con VAB. Resulta difícil el diagnóstico de este subtipo, pudiendo pasar inadvertido. Es necesaria mayor investigación al respecto.

Está cada vez más aceptado el concepto de que la VAB constituye un espectro anatómico con diversos fenotipos que se dirigen hacia la *bicuspidización*: desde la VAB con fusión parcial, que representa el más cercano a una VAT normal, hasta la VAB de 2-senos que encarna la VAB “más pura” por excelencia (3). Los fenómenos que dan lugar a cada *nivel* de VAB de este espectro no se conocen actualmente.

## 5. Epidemiología

Por su curso muchas veces asintomático y la ausencia de un cribado poblacional generalizado, la prevalencia real de VAB en el mundo no es del todo conocida. Los estudios clásicos, realizados en grupos de población caucásica, estiman una prevalencia del 0,5 - 2 % de la población (4) (63) (64). Dada esta alta frecuencia de aparición, ha sido considerada tradicionalmente la cardiopatía congénita más prevalente. Estudios más recientes corroboran estos porcentajes. Por ejemplo, en un reciente estudio poblacional australiano, que analizó mediante ecocardiografía 264.159 adultos, el 1,8 % tenían VAB (69 % hombres) (65); otra cohorte danesa observó una prevalencia de 0,77 % entre 25.556 nacimientos (66). Pero, cabe cuestionarse si esta prevalencia es similar en todos los grupos étnicos. Cada vez encontramos más estudios en este sentido, que hacen sospechar ligeras variaciones geográficas. Estudios de imagen con ecocardiografía en población originaria de África subsahariana presentan discordancias en la prevalencia, pero parecen indicar que puede ser menor en esta subpoblación (67) (68) (69) (70). También otro estudio en población afroamericana resultó en una baja prevalencia de VAB oscilando



entre el 0,11 % y 0,28 % (71). Por el contrario, en un estudio centroamericano con 2.750 pacientes se observó mayor prevalencia de VAB, alcanzando un 4,9 % de la población (72). También encontramos lagunas de conocimiento en si existen diferencias en la morfología y función de la válvula y las dimensiones de la raíz aórtica entre distintos grupos étnicos. Un reciente estudio describió mayor incidencia de fusión entre velo coronario derecho y no coronario en asiáticos, respecto a la cohorte europea (57). También se han descrito mayores diámetros aórticos y mayor prevalencia de insuficiencia valvular en población de origen chino, respecto a otros países asiáticos (73).

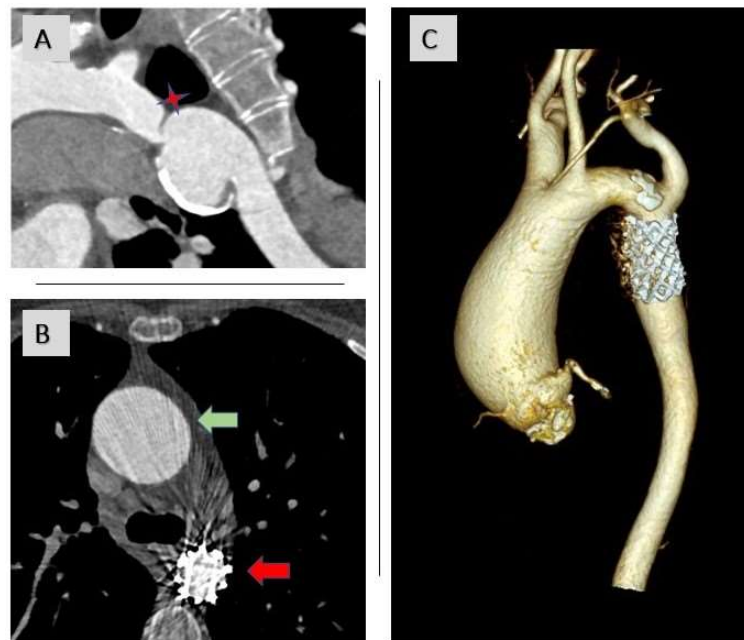
La VAB es más frecuente en el género masculino, alrededor de 3:1 (46) (74) (75). Un estudio realizado por Tutar *et al.* (4) con cribado en recién nacidos, describe mayor frecuencia en varones (7,1/1000) que en las niñas (1,9/1000). Estas diferencias de género sugieren que el cromosoma X pueda ocupar un papel importante en su origen, estando esta hipótesis apoyada por la alta incidencia de VAB en la subpoblación con síndrome de Turner (monosomía del cromosoma X) (76). Los hombres tienen mayor incidencia de aortopatía y mayor grado de insuficiencia valvular a la hora del diagnóstico de VAB. Sin embargo, no hay diferencias de supervivencia entre hombres y mujeres con VAB (74) (77) (78).

Se sabe que la VAB presenta agregación familiar, con penetrancia y expresividad variables. En torno a un 10 % de los familiares de primer grado del paciente diagnosticado de VAB, también la presentan, lo que supone una elevada heredabilidad (5). Un reciente estudio multicéntrico español corroboró este hecho en una larga cohorte. Además, demostró una alta variabilidad intrafamiliar en la morfología de la VAB y no se observó heredabilidad en cuanto a la dilatación aórtica (12). Por este hecho, las guías de práctica clínica actuales recomiendan realizar un cribado mediante ecocardiografía a todos los familiares de primer grado de un individuo afecto de VAB (6) (7).



## 6. Historia natural y complicaciones asociadas

El desarrollo anómalo de la VAB se integra, hoy en día, en las llamadas *anomalías del TSVI*, incluida en este espectro junto con la coartación de aorta, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, etc. Por ejemplo, aproximadamente el 50 % de los pacientes con coartación de aorta asocian VAB, mientras que solo el 7-10 % de los pacientes con VAB presentan coartación de aorta (3) (79) (80) (Figura 13). Bien conocida es la marcada heterogeneidad genética subyacente a la VAB, apareciendo ligada a distintas cromosopatías y enfermedades genéticas (81). Se ha descrito una mayor prevalencia de VAB en el síndrome de Down (trisomía 21) o en el síndrome de DiGeorge (monosomía 22q11). También en el síndrome de Marfan, en el de Loeys-Dietz o en el de William-Beuren, así como en el síndrome de Turner (82). Sin embargo, la mayoría de las personas con VAB no la padecen bajo un síndrome de este tipo.



**Figura 13.** Aortopatía bicúspide y coartación de aorta. A) Reconstrucción multiplanar de tomografía computarizada (TC) donde se identifica la zona de coartación aórtica (asterisco rojo) con región aneurismática inmediatamente distal. B) Corte transversal donde puede observarse al mismo tiempo el segmento dilatado de aorta ascendente (flecha verde) y el *stent* colocado en el segmento más proximal de la aorta torácica descendente a nivel de la coartación (flecha roja). C) Reconstrucción tridimensional de TC de aorta del paciente con válvula bicúspide. *Imágenes cedidas por el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Universitario Central de Asturias.*



La manifiesta pluralidad en su forma ha hecho que el consenso internacional sobre VAB (3) divida en tres grupos diferentes a los portadores según su presentación y pronóstico:

a) *Válvulo-aortopatía compleja. Asociada a otros síndromes.* Forma poco común de presentación de la VAB en términos generales. Es el grupo de pacientes definido por presentar síndromes sistémicos-genéticos más complejos, que son los que, en realidad, van a determinar su morbilidad y pronóstico, habitualmente menos favorable que el de la población general (79) (83). Aquí se incluyen pacientes con síndrome de Turner, complejo de Shone, síndrome de Loeys-Dietz, o pacientes con coartación de aorta compleja, entre otros. La presentación clínica en este subgrupo es variable, con desarrollo progresivo de valvulopatía y/o aortopatía. En muchas ocasiones la presentación de la valvulopatía o de la aortopatía es a una edad temprana (infancia-adolescencia), requiriendo intervención para mejorar su supervivencia.

b) *VAB típica.* Es el grupo, *a priori*, más numeroso. Estos pacientes van a desarrollar valvulopatía y/o aortopatía de manera progresiva, apareciendo complicaciones clínicas a una edad media más temprana que en la población general. Esta condición genera un aumento de la morbilidad en este subgrupo de pacientes, con necesidad de seguimiento médico prolongado y/o intervenciones quirúrgicas. Una diferencia esencial con los pacientes del grupo anterior, es que los portadores de VAB no asociada a otros síndromes mayores poseen la misma esperanza de vida que la población general de su misma edad y sexo (75) (84).

c) *VAB no complicada o no diagnosticada.* La prevalencia de este subgrupo de pacientes no es conocida. Son personas que poseen una VAB, pero no desarrollan complicaciones clínicas derivadas de la misma y la condición se



conoce, o bien en una autopsia, o bien a través de pruebas de imagen de forma casual.

La historia natural de esta cardiopatía congénita ha intentado ser evaluada en distintos estudios prospectivos, demostrándose una amplia variabilidad de presentación y comportamiento, que puede ir desde el desarrollo de una estenosis grave en la infancia que requiera tratamiento invasivo, hasta tener un curso asintomático durante prácticamente toda la edad adulta. Globalmente, lo que genera fundamentalmente es alta morbilidad, con aparición de un evento médico o quirúrgico en hasta 4 de cada 10 pacientes en el seguimiento a 20 años (84).

Como vemos, dado que solamente los pacientes sintomáticos, con o sin enfermedad valvular, buscan atención médica, existe una laguna de conocimiento sobre las consecuencias reales de esta condición congénita. De este modo, es posible que el conocimiento actual de la enfermedad no se ajuste a la realidad, al observar en la práctica médica solo aquellos individuos con complicaciones. Los resultados publicados en la literatura en forma de series de pacientes pueden resultar discordantes. Por este motivo, más estudios contemporáneos, en la era de la imagen cardiaca multimodal, que permite un diagnóstico más temprano de VAB, son necesarios acerca de su historia natural.

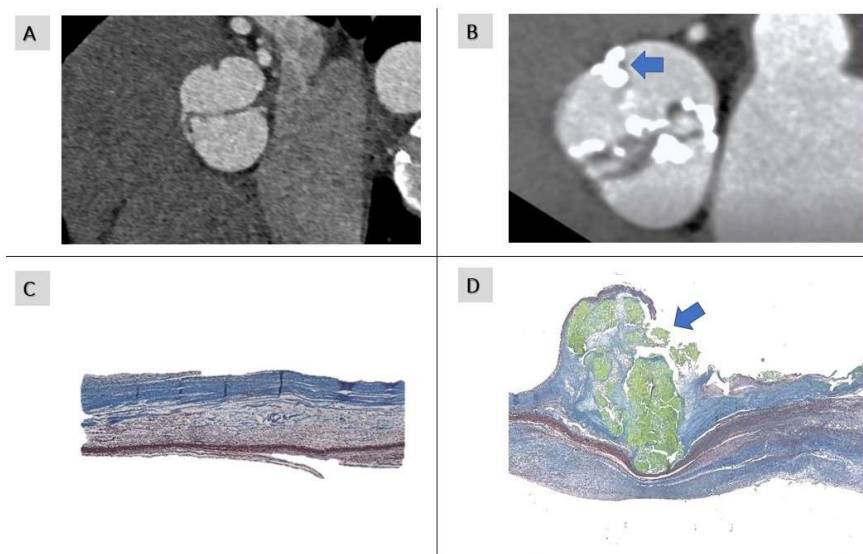
Las principales complicaciones que la acompañan se describen a continuación.

### 6.1. Disfunción valvular

La complicación derivada más común es la disfunción valvular. Por ella se entiende el desarrollo progresivo de insuficiencia aórtica (IAo) o estenosis aórtica (EAo) significativas, que acaban conduciendo a la necesidad de intervención quirúrgica en forma de recambio valvular aórtico.



En la infancia, el curso típico es asintomático, sin desarrollo, en términos generales de disfunción valvular. En la juventud y primera adultez, la mayor parte de las consultas e intervenciones quirúrgicas son secundarias a IAo grave (85) (86). El mecanismo etiológico puede ser funcional, por dilatación de la raíz de aorta, o bien primario valvular, por prolapso, degeneración mixomatosa, fibrosis y retracción o EI. En detalle, estos mecanismos patogénicos subyacentes que progresivamente conducen a IAo significativa son de momento poco comprendidos. Con el paso de los años, los individuos suelen desarrollar progresivamente EAo en diferentes grados, por un proceso de calcificación valvular acelerada, precisando intervención quirúrgica a una edad media 20-30 años anterior que pacientes con VAT estenóticas (7) (8) (85) (87). Morfológicamente, la calcificación parece suceder de manera similar a lo que ocurre en la VAT (Figura 14).



**Figura 14.** Comparación de válvula aórtica calcificada y no calcificada. Imágenes axiales de tomografía computarizada mostrando una válvula aórtica bicúspide (fila superior) y de microscopía óptica de cortes transversales de velos aórticos teñidos con orceína (fila inferior). A) válvula bicúspide sin calcificación; B) válvula bicúspide calcificada; C) velo no calcificado; D) velo calcificado mostrando la desestructuración. Flecha azul marcando un nódulo de calcificación en (B) y su correspondencia histológica en (D). *Imágenes cedidas por el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Universitario Central de Asturias (A y B).*



Las investigaciones actuales tratan de dilucidar si la variabilidad en la edad de presentación de la calcificación en la VAB respecto a la VAT se debe predominantemente a factores mecánicos o genéticos (10). Por ejemplo, en una larga serie publicada por Roberts y Ko sobre 932 pacientes sometidos a recambio valvular aórtico estima una prevalencia de VAB del 53 %. Del total de las cirugías analizadas en ese estudio, el 7 % se llevaron a cabo en menores de 50 años, de las cuales dos tercios eran VAB y el otro tercio unicúspides. Casi la mitad de las cirugías fueron realizadas en menores de 70 años y dos tercios de ellos tenían VAB (87). Se describe que, en los 25 años siguientes al diagnóstico, el riesgo de necesitar intervención es de hasta el 40-50 %. Además, la prevalencia de EAo significativa, y la necesidad de cirugía por la misma, es 2,5 veces mayor que la de IAo (3) (78). Suele coexistir cierto grado (leve-moderado) de IAo acompañando a la EAo, que no influye en la clínica o en la decisión para el recambio valvular. En la serie de Roberts y Ko, solo el 7 % de las intervenciones debidas a IAo aislada ocurrieron en pacientes con VAB sin datos de EI (87). En otro reciente estudio de Kong *et al.* se evaluó si la presencia de rafe (VAB fusionada) ejercía un peor pronóstico a los pacientes. Comparó a 1881 pacientes con VAB con rafe frente a 237 pacientes con VAB sin rafe, demostrando que la presencia de un rafe se asoció con una mayor prevalencia de EAo, IAo y necesidad de cirugía de recambio valvular, pero no se mostró como un predictor de mortalidad independiente (88).

Respecto al manejo e indicaciones médico-quirúrgicas de la EAo y de la IAo, éste debe ser el mismo en los pacientes con VAB que en los pacientes con VAT, siguiendo las guías de práctica clínica vigentes (7) (89) (90).

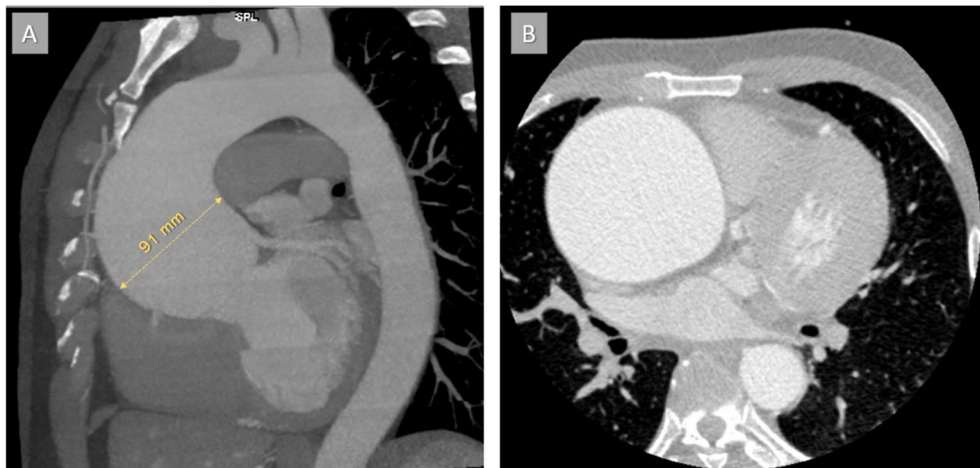
## 6.2. Dilatación de aorta y complicaciones derivadas

Hoy en día, está demostrado que los pacientes con VAB, en comparación con personas con VAT, tienen mayor riesgo de desarrollar dilatación de aorta ascendente





(Figura 15), (3) (7) (10) (91). Incluso, en algunas publicaciones actuales, este hecho es englobado dentro del mismo síndrome bajo el nombre de *aortopatía bicúspide* (92) (93) (94). El consenso internacional aboga por abandonar el término *aneurisma* de los informes médicos y prefiere estandarizar el término *dilatación de aorta* (3). El riesgo de dilatación aórtica es 80 veces mayor que en la población general (7). Sin embargo, los datos sobre la prevalencia de la asociación son variables (del 40 al 70 % de los casos de VAB), quizá debido a la propia heterogeneidad de la enfermedad, a la falta de consenso en los estudios sobre las medidas para definir dilatación, a las técnicas de imagen usadas, a la región de la aorta considerada, etc. (54) (95).



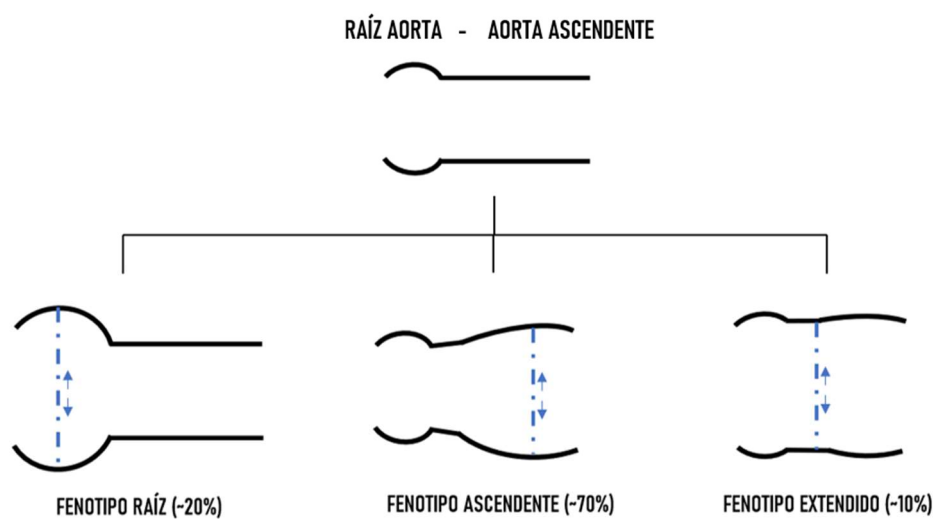
**Figura 15.** Imágenes de aorta torácica ascendente dilatada tomadas mediante tomografía computarizada. A) Reconstrucción multiplanar con una llamativa dilatación de hasta 91 mm de la aorta ascendente. B) Corte axial a nivel del segmento dilatado de la aorta ascendente proximal. *Imágenes cedidas por el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Universitario Central de Asturias.*

En el estudio de Michelena *et al.* sobre la historia natural de la VAB, de los 212 individuos asintomáticos se observó dilatación de aorta ascendente ( $> 40$  mm) en el 15 % de ellos al inicio, pero esta proporción aumentó hasta un 39 % durante el seguimiento tras 15 años. No se diagnosticó disección aórtica, ni hubo fallecimientos por complicaciones aórticas. Sin embargo, se comprobó como la dilatación progresiva de la aorta es real y



conlleva la necesidad de un seguimiento. Ocho pacientes necesitaron cirugía de reparación aórtica (84).

También la población en edad pediátrica presenta diámetros mayores de aorta ascendente en comparación con controles. Gurvitz *et al.* compararon las dimensiones de la raíz aórtica en 76 niños ( $8,5 \pm 4,9$  años) con VAB frente a 41 controles. La raíz de aorta era de tamaño mayor y el segmento más afectado era la porción de aorta tubular, siendo la dilatación independiente de cualquier alteración en la función valvular (96).



**Figura 16.** Esquema con los diferentes fenotipos de dilatación aórtica.

Existen diferentes patrones o fenotipos de dilatación aórtica. Fundamentalmente se diferencian tres (Figura 16). El menos frecuente (alrededor del 20 % de los casos) es aquel donde se dilata la raíz aórtica, preferentemente en los senos de Valsalva. El fenotipo más común (aproximadamente un 70 %), consiste en la dilatación de la aorta ascendente tubular. Suele encontrarse en pacientes (hombre o mujer) de mayor edad, que asocian cierto grado de estenosis valvular. Existe un tercer fenotipo en el que la dilatación inicial de la aorta ascendente se extiende en el seguimiento hacia segmentos adyacentes, tanto la raíz como, sobre todo, el arco aórtico (3) (97). La forma de dilatación de raíz suele asociarse a pacientes más jóvenes con IAo. Se ha asociado a peor pronóstico y dilatación



más rápida. De hecho, se ha asociado con mayores tasas de disección aórtica aguda en el seguimiento postquirúrgico de pacientes con VAB que habían sido sometidos a recambio valvular aislado, en comparación con el fenotipo de dilatación de aorta ascendente (98).

Resulta oportuno cuestionarse si se relacionan con el subtipo de VAB. Tras varios estudios en este contexto, continúa habiendo controversia. El subtipo fusionado R–N se asocia infrecuentemente al fenotipo de dilatación de raíz y se ha visto frecuentemente asociado con dilatación a nivel del cayado aórtico. Por el contrario, la fusión R–L se asocia frecuentemente con el fenotipo de dilatación de la raíz (99) (100). Sin embargo, esas asociaciones no son inequívocas y la fusión R-L puede estar asociada con cualquier fenotipo aórtico (101) (102) (103) (104) (105). Se ha intentado asociar el tipo de dilatación de aorta con los subtipos de VAB con resultados no determinantes. En general, los datos publicados sobre la progresión de la aortopatía según los subtipos morfológicos son inconsistentes.

En casos de VAB, la dilatación de los segmentos aórticos progresa de manera más rápida que los casos asociados a VAT y se presenta a edades más tempranas (91). Según los últimos estudios publicados, las tasas de crecimiento aórtico para el segmento ascendente tubular en adultos con VAB oscilan entre 0,4 y 0,6 mm/año. Raros casos crecen más de 2-3 mm al año (105) (106). En el estudio de Davies *et al.* (107) se analizaron 514 pacientes con dilatación de aorta no reparada, 70 de ellos con VAB. Una mayor proporción de pacientes con VAB requirió tratamiento quirúrgico (72,8 % frente a 44,8 %) a una edad significativamente más joven (48,9 vs 63,1 años). Las aortas de VAB crecieron más rápido 1,9 mm/año en comparación con el otro grupo, 1,3 mm/año. Sin embargo, entre los pacientes no operados no hubo detrimento en la supervivencia para el grupo de bicúspides. Aunque los factores de riesgo asociados a un mayor ritmo de progresión no son bien conocidos, se han relacionado la presión arterial elevada, el sexo



masculino, la presencia de disfunción valvular y, la que parece la variable de mayor peso, la edad (107).

Secundario a esta enfermedad de la aorta, el riesgo de complicaciones aórticas agudas es mayor en pacientes con enfermedad de VAB que en la población general (7). Y, en efecto, una complicación muy temida es la *disección aórtica*, patología aguda que condiciona alta mortalidad cuando aparece, y que suele tener lugar cuando la aorta ascendente se encuentra dilatada. No obstante, existe gran controversia al respecto. Se describe una incidencia 8 veces mayor respecto a la población general, aumentando en pacientes con diámetros aórticos  $> 45$  mm (3) (85) (108). Y, estudios de centros terciarios sugieren que la aparición de disección aórtica es de 5 a 9 veces más frecuente en pacientes con dilatación y VAB que en aquellos con dilatación y VAT (109), mientras otros estudios no observan tal asociación (84) (110). Trabajos más actuales informan de un riesgo existente, pero menor. El Registro Internacional de Disección Aórtica (IRAD por las siglas en inglés de *International Registry of Acute Aortic Dissection*) describe una muy baja prevalencia de disección en VAB ( $< 2$  %) (111). El estudio de Itagaki *et al.* que evaluó a 2079 pacientes con VAB informa de una incidencia de disección aórtica del 0,55 % a los 15 años (112). De vital importancia es comprender que no es necesaria una disfunción valvular significativa para que se produzca dilatación de aorta y, por ende, una posible complicación aórtica aciaga. Sin embargo, sí se ha visto que los pacientes con VAB y enfermedad valvular significativa (estenosis o insuficiencia) tienen un mayor riesgo de disección de la aorta en el seguimiento (7) (107) (113).

### 6.3. Endocarditis infecciosa

Otra complicación no valvular que clásicamente se relacionó con VAB es la EI. La mayoría de los pacientes diagnosticados desconocen previamente poseer una VAB. Esta grave complicación aumenta la necesidad de cirugía de recambio valvular y la incidencia



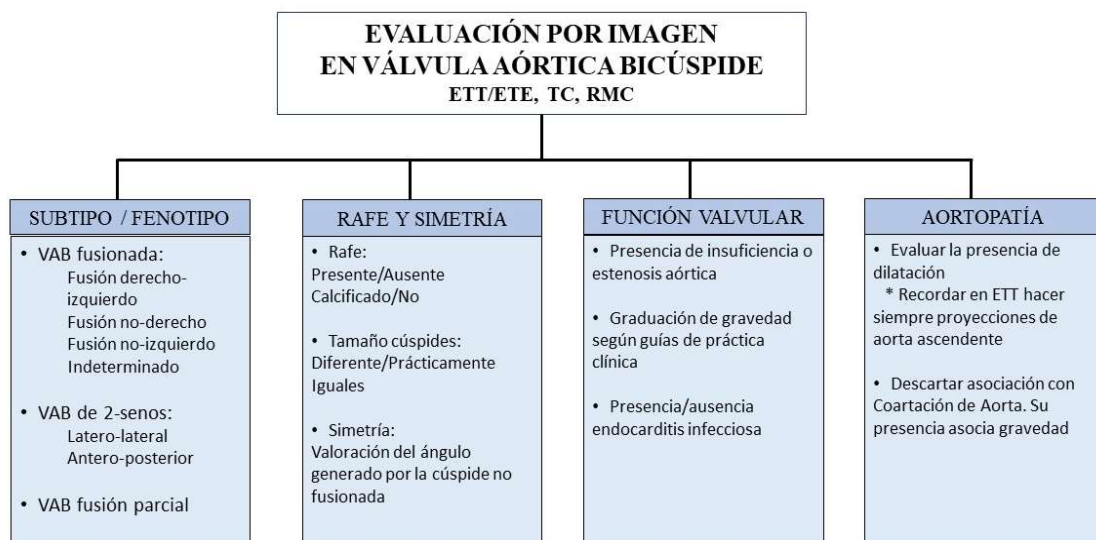
de muerte asociada. El riesgo de EI descrito en las primeras series era muy alto, hasta un 10-30 % (9), por lo que las guías de práctica clínica en cardiología recomendaban realizar profilaxis antibiótica a todos los pacientes con VAB cuando fueran a someterse a procedimientos invasivos. Series más recientes y de mayor envergadura estiman que la incidencia de EI en este subgrupo poblacional es, en realidad, mucho menor de lo que se reflejaba, aproximadamente del 2 % (85) (114). En este contexto, las actuales guías europeas de práctica clínica consideran a las personas con VAB en un riesgo intermedio, y aunque no recomiendan realizar profilaxis antibiótica de rutina, si dejan la posibilidad de considerarla individualizando; exceptuando pacientes con historia previa de EI, o bien, portadores de prótesis valvulares donde si se recomienda rutinariamente (115). El riesgo de desarrollar esta complicación infecciosa es hasta 11 veces mayor que en la población general (114), lo cual debe hacernos permanecer en alerta ante signos o síntomas relacionados con la misma. Además, existen aún pocos datos sobre su incidencia en la era en la que no se está recomendando encarecidamente la profilaxis antibiótica.

A pesar de todas estas posibles complicaciones descritas, y como ya vimos previamente, las series de seguimiento a largo plazo de cohortes con VAB típica confirman un hecho importante: en la era actual, los individuos con VAB no tienen menor esperanza de vida que el resto de la población. En adultos asintomáticos con VAB y diferentes grados de disfunción valvular, la supervivencia a 10 años del diagnóstico fue del  $96 \pm 1$  % (85), y en adultos asintomáticos con VAB sin disfunción valvular significativa, la supervivencia a 20 años fue del  $90 \pm 3$  % (84). Los pacientes, cuando son diagnosticados en la era médica actual, realizan un seguimiento regular y se ofrece la cirugía en el momento oportuno, por lo que el riesgo de eventos aórticos o valvulares catastróficos es bajo.



## 7. Fundamentos del diagnóstico y de la imagen multimodal en válvula aórtica bicúspide

El diagnóstico de una VAB suele realizarse tras la auscultación de un soplo de EAo o IAo, la aparición de síntomas, los cribados familiares, o bien de modo casual durante un estudio de imagen cardiológico, siendo este último aspecto cada vez más frecuente por el amplio uso, hoy en día, de diferentes técnicas de radiodiagnóstico por imagen (imagen multimodal). Dichas técnicas permiten en la práctica clínica cardiológica evaluar los aspectos fundamentales de la VAB (Figura 17). En las siguientes líneas desgranaremos los puntos más importantes de cada una de ellas.



**Figura 17.** Esquema de los pilares fundamentales en la evaluación por imagen de la válvula aórtica bicúspide. VAB: válvula aórtica bicúspide. ETT: ecocardiograma transtorácico, ETE: ecocardiograma transesofágico, TC: tomografía computarizada, RMC: resonancia magnética cardiaca.

### 7.1. Ecocardiografía

El diagnóstico se basa en la imagen bidimensional con ETT y así lo recogen las actuales guías de práctica clínica: *“la ecocardiografía transtorácica es la modalidad de imagen recomendada para la evaluación inicial de la válvula aórtica y la aorta torácica, incluida la evaluación de la función hemodinámica de la válvula; con una evidencia*



*científica clase I*” (7). Este tipo de diagnóstico comenzó en los años 70 con la evaluación por “modo M”, con un desarrollo exponencial, pudiendo usar hoy en día, incluso, representaciones en 3D. Resulta una prueba no invasiva, inocua y aplicable a grandes grupos de población, lo cual ha posibilitado la realización de estudios más amplios sobre VAB. El mejor plano para su valoración es el paraesternal eje corto (plano también usado en TC y RMC). Para establecer el diagnóstico, la válvula debe visualizarse en sístole (válvula abierta). No debe realizarse en diástole (válvula cerrada), ya que el rafe puede hacer que la válvula aparezca como trivalva, generando confusión (3) (7). Cuando la válvula se encuentra muy calcificada, como sucede en las estenosis avanzadas, diferenciar las cúspides valvulares es más difícil y el diagnóstico es menos preciso. La ecografía transesofágica (ETE) obtiene una visión más detallada y de mejor calidad, pudiendo utilizarse cuando existan dudas.

Por otro lado, la evaluación de la función valvular aórtica cuando existe EAo o IAo se realiza con ecocardiografía, siendo insuperable el valor del Doppler en la gradación y evaluación de la gravedad de la disfunción valvular (89) (90).

En la práctica diaria, la ETT es la técnica más utilizada para evaluar la dilatación de la aorta ascendente proximal. Aunque la raíz aórtica y la aorta ascendente proximal se visualizan bien en la vista del paraesternal eje largo, la aorta ascendente media debe visualizarse moviendo la posición del transductor a una posición en un espacio intercostal superior. Se aconseja realizar la medición en diástole (coincidiendo con el inicio del QRS del electrocardiograma). El diámetro de la aorta ascendente por ETT (medido de primer eco a primer eco) resulta congruente y similar a valores de TC y RMC medidos de borde interno a borde interno (116). En todas las técnicas de imagen se aconseja indexar la medida por ASC. La ecocardiografía puede subestimar el diámetro máximo de la raíz de aorta, al ser esta asimétrica, y medir con la ecografía solamente un plano del espacio. También las medidas pueden ser inexactas debido a planos oblicuos, no totalmente



ortogonales (117). El ETT presenta también limitaciones ante la falta de visualización de los segmentos más distales de la aorta ascendente. Debido a estas limitaciones, se recomienda que los diámetros de la aorta ascendente de 45 mm o más obtenidos por ETT se investiguen más a fondo mediante TC o RMC. Si las mediciones son comparables y reproducibles entre técnicas, entonces las futuras mediciones periódicas de seguimiento se pueden obtener solo mediante ETT, con estudios de TC/RMC cada 3 años para verificar la concordancia. Si las mediciones iniciales son discrepantes, entonces debemos realizar el seguimiento de la enfermedad aórtica con TC/RMC (7). Se ha comprobado como los diámetros aórticos ecocardiográficos iniciales no son predictores de la tasa de progresión de la dilatación durante el seguimiento y, por lo tanto, se recomienda la obtención de imágenes a intervalos regulares (habitualmente anuales) independientemente del diámetro aórtico inicial en pacientes con VAB. Además, debido a que la dilatación aórtica es independiente de la disfunción valvular y que los pacientes que se han sometido a un recambio valvular aórtico tienen mayor prevalencia de eventos aórticos en el seguimiento (118), deben continuar realizando revisiones periódicas de control de los diámetros aórticos (3) (7).

## 7.2. Tomografía computarizada

La TC es la técnica de imagen con mayor resolución espacial, proporcionando una incomparable visualización de la válvula aórtica, tanto su morfología como su grado de calcificación, así como de las dimensiones de la raíz aórtica y los segmentos de la aorta ascendente y descendente. Gracias a la adquisición de capturas isovolumétricas, se puede analizar cada segmento aórtico en los diferentes planos del espacio, usando cortes ortogonales, permitiendo una medición óptima y exacta de su tamaño. Además puede utilizarse cuando existan dudas sobre el diagnóstico de VAB (119). El protocolo de adquisición es esencial para la interpretación del estudio y se recomienda la





sincronización con el electrocardiograma. Para el estudio de la válvula aórtica suele requerirse una adquisición retrospectiva, que permita analizar fase sistólica y diastólica. Los estudios con TC de arterias coronarias (en el contexto de estudios de dolor torácico) suelen adquirir imágenes solo en diástole, pudiendo llevarnos a pasar por alto la fusión total o parcial de las cúspides y a confundir una VAB con una VAT, por lo que el diagnóstico en este contexto resulta limitado. La TC resulta igualmente útil, y cada vez con mayor frecuencia, en la evaluación de la anatomía coronaria preoperatoria de pacientes con VAB que deban intervenir. También se muestra esencial en la planificación para el implante de una válvula aórtica transcatheter (TAVI, por las siglas en inglés *Transcatheter Aortic Valve Implantation*) (120) (121) (122).

### 7.3. Resonancia magnética cardiaca

La RMC ofrece ventajas sobre la ecocardiografía, pudiendo aportar datos funcionales, anatómicos y de caracterización tisular miocárdica (realce tardío de gadolinio (RTG), viabilidad, mapeo T1 y T2). Además, es una técnica de imagen que no utiliza radiación ionizante (a diferencia de la TC), hecho de alta valía en pacientes jóvenes o en personas que deban someterse a controles y estudios periódicos durante toda su vida, como es el caso de los pacientes con VAB.

Aunque permite la valoración de la función valvular (cuantificación de la IAo mediante las secuencias de contraste de fase), el principal uso de la RMC en el contexto de pacientes con VAB es para la evaluación de la aorta. Así, se utiliza en la práctica clínica cuando existe discrepancia entre las medidas de los diámetros aórticos estimados con ecocardiografía, o para la valoración de la morfología y diámetros de la raíz de aorta y aorta ascendente cuando éstos no puedan evaluarse correctamente con ecocardiografía, o bien en pacientes con historia familiar de disección aórtica.



Se ha descrito que la presencia de fibrosis mesocárdica (mediante RTG) en el ventrículo izquierdo en pacientes asintomáticos con una disfunción valvular avanzada tipo estenosis supone un marcador de estrés y remodelado dañino ventricular, comportándose como un factor pronóstico y ayudando a elegir el mejor momento de intervenir al paciente (123) (124).

En los próximos años, la RMC-4D revolucionará la cardiología en diferentes aspectos. Uno de ellos es su capacidad para la evaluación de los flujos en la aorta ascendente. Permite el estudio de la dinámica del flujo sanguíneo y su dependencia de los fenotipos de VAB. Se ha comprobado como en la fusión de las cúspides derecha-izquierda (R-L), debido a la forma de apertura, el flujo incide en la pared externa de la aorta más proximal, mientras que la fusión derecha-no coronario (R-N) resulta en un flujo dirigido hacia la pared externa de la aorta ascendente distal. Esto podría explicar parcialmente las asociaciones fenotípicas de la aortopatía, es decir, la mayor prevalencia de dilatación de la raíz en la fusión R-L y la mayor dilatación de la aorta ascendente distal-arco aórtico con la fusión R-N (102) (125) (126).

Por otro lado, basar todas las decisiones acerca del riesgo de complicación de un segmento aórtico en el diámetro resulta limitado. Otros factores participan en el riesgo de disección o rotura aórtica. La RMC-4D permite la medición de diferentes componentes de la mecánica vascular, como la tensión tangencial sobre la pared (WSS, por sus siglas en inglés *Wall Shear Stress*), que es la fuerza que ejerce el flujo sanguíneo tangencialmente a la pared del vaso, siendo un factor conocido de remodelado vascular (127) (128). Dos estudios muy actuales, publicados en 2022, evalúan esta propiedad de la RMC. Soulat *et al.* evaluaron mediante RMC-4D a 72 pacientes con VAB sin lesiones valvulares significativas con un seguimiento a cinco años (129). Determinaron que la presencia de un área de WSS más elevada se correlaciona con tasas de mayor dilatación aórtica anual, validando el concepto de WSS como predictor independiente del



crecimiento aórtico. Por otro lado, Guala *et al.* estudiaron a 47 pacientes con VAB sin disfunción valvular mediante RMC-4D, seguida de dos angioTC consecutivas y separadas más de 6 meses de la resonancia (130). En esta población, la mediana del diámetro aórtico fue de 41 mm y el 70 % de los pacientes presentó dilatación de la aorta al inicio. La tasa de crecimiento medio fue de 0,24 mm/año, similar al estudio de Soulat *et al.*, y al igual que en el otro estudio, no se encontraron asociaciones significativas de la tasa de crecimiento en función de la edad, el ASC, el volumen sistólico, el sexo, la presión arterial o el fenotipo VAB. El WSS elevado (en su componente circunferencial) mostró una asociación significativa con la tasa de crecimiento. Como vemos, este factor puede acabar teniendo su aplicación en la práctica clínica diaria, correlacionando factores hemodinámicos y mecánicos con la predicción de eventos clínicos adversos futuros (131).

#### 7.4. ¿Disponemos de algún biomarcador?

Existe un interés creciente en la comunidad médica por encontrar biomarcadores en VAB que ayuden durante los procesos diagnósticos y de seguimiento clínico (132). Debemos recordar que un biomarcador es una molécula biológica mensurable que se encuentra en la sangre y/u otros fluidos o tejidos del organismo, siendo un signo que permite evaluar el proceso de una enfermedad. Hasta la fecha, no se utiliza ningún biomarcador específico de aortopatía bicúspide en la práctica clínica diaria, pero, de cara a tomar decisiones sobre el momento óptimo de la cirugía, resultaría muy útil sumar a las pruebas de imagen, perfiles de riesgo, evaluar el pronóstico del paciente y controlar la progresión de la calcificación aórtica o de la dilatación de la pared aórtica, etc., mediante biomarcadores fiables. En la práctica, los datos actuales son limitados y se centran principalmente en las alteraciones de la aorta (133) (134). Respecto a la disfunción valvular, hay estudios que constatan que los pacientes con VAB y una mayor gravedad de la EAo o la IAo tienen niveles más altos de péptido natriurético tipo N-terminal pro-B



(NT-proBNP) en comparación con los de bajo grado y, además, aquellos con IAo grave tienen niveles más altos de troponina-T (medida como troponina T de alta sensibilidad (hsTnT)) (133). Sin embargo, estos dos biomarcadores no son específicos de la aortopatía bicúspide, sino que reflejan el impacto de la enfermedad valvular en el mal funcionamiento ventricular (135).

Otros biomarcadores plasmáticos han sido propuestos, como los niveles de metaloproteasas de matriz (MMP) y/o de los inhibidores tisulares de MMP (TIMP) en pacientes con VAB (136) (137); o bien, la asociación existente entre los niveles plasmáticos de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno competitivo de la sintetasa de óxido nítrico (NOS), y el diámetro de la aorta ascendente en pacientes con dilatación aórtica (138) (139).

Asimismo, se ha evaluado un posible biomarcador más específico: el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Sabemos que la vía del TGF- $\beta$  juega un papel crucial en la remodelación vascular. Estudios recientes encontraron niveles séricos elevados de esta molécula en pacientes con aorta dilatada en el contexto de un síndrome (síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz) aunque los resultados se basaron en pequeñas cohortes (9-30 pacientes) (140). En 2017, Forte *et al.* publicaron un estudio en una serie pequeña que sugiere que durante el seguimiento de 3 años, una ratio alta de TGF- $\beta$ 1/sENG (TGF- $\beta$ 1 circulante dividido por niveles de su receptor soluble endoglina) se asocia con un patrón dañino, con progresión hacia dilatación aórtica (141). Sin embargo, en otros estudios posteriores no se encontró asociación entre los niveles séricos de TGF- $\beta$ 1 y el diámetro aórtico en pacientes con VAB (133). Un hecho por considerar es la variabilidad de los niveles de referencia de TGF- $\beta$ 1 en suero según el estudio, lo que compromete la interpretación de los resultados. Para poder comparar adecuadamente los estudios, el biomarcador debe medirse con la misma técnica de laboratorio y los niveles



de referencia deben establecerse sobre la base de grandes cohortes de pacientes sanos, lo cual supone una dificultad añadida a la hora de valorar muchos de estos biomarcadores.

Otro estudio se centró en un miembro de la familia de las adipoquinas, el péptido apelina, que se sabe que está implicado en las funciones cardiovasculares a través de la liberación de óxido nítrico (NO). Pero, lo que es más importante es que en modelos animales de aneurisma se ha demostrado que la administración de apelina consigue prevenir el aumento en el diámetro de la aorta (142). En coherencia con esto, Simsek *et al.* encontraron que los niveles de apelina sérica estaban disminuidos en los pacientes con VAB y dilatación de la aorta ascendente en comparación a los pacientes con VAB sin dilatación aórtica (143). Así, la apelina podría ser un biomarcador sérico para la dilatación de la aorta ascendente.

Las investigaciones en curso se centran en localizar moléculas circulantes fácilmente medibles en el laboratorio, relacionadas con las vías intracelulares, y no solo proteínas sino también pequeños ácidos ribonucleicos no codificantes (ncRNA, del inglés *non-coding RNA*) circulantes (144). En conclusión, por el momento, no hay datos sólidos que permitan el uso de biomarcadores de aortopatía bicúspide en la práctica clínica y se necesitan más investigaciones y recursos en este campo.

## 8. Consideraciones del tratamiento actual y pronóstico

El tratamiento que precisan los pacientes con VAB generalmente es quirúrgico, bien sobre la propia válvula aórtica, bien sobre la aorta, o bien sobre ambas. En este apartado se revisarán las diferentes indicaciones terapéuticas.



## 8.1. Reparación o sustitución valvular.

Cuando la disfunción valvular se hace notoria, hecho que suele acompañarse de síntomas, hay que plantearse la intervención quirúrgica sobre la VAB. Las indicaciones para actuar son las mismas que en VAT. Según las últimas guías europeas publicadas en 2021 (89), a aquellos pacientes sintomáticos con disfunción valvular de grado grave, ya sea por IAo o por EAo, se les debe ofrecer la intervención sobre la válvula enferma. En el caso de pacientes sin síntomas, pero con disfunción valvular grave, también se recomienda la cirugía en los siguientes supuestos:

a) en caso de IAo, cuando el diámetro telesistólico de ventrículo izquierdo (LVESD, por sus siglas en inglés) sea  $> 50$  mm o cuando haya un  $LVESD > 25$  mm/m<sup>2</sup> por ASC, o bien, haya una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) en reposo  $\leq 50$  %;

b) en caso de EAo, cuando exista una FEVI en reposo  $\leq 50$  %, o bien, durante una prueba de esfuerzo se desenmascaren síntomas o presente una caída de la presión arterial ( $> 20$  mmHg);

c) en casos en los que se vaya a intervenir por otro motivo de cirugía cardíaca (cirugía de revascularización aorto-coronaria, otra válvula, dilatación de aorta, ...).

El recambio valvular por una prótesis mecánica o biológica es el tratamiento, en general, de elección, con una tasa de supervivencia a 15 años de alrededor de un 80 % (7). Debemos tener presente que los pacientes con VAB, al ser de media más jóvenes cuando se someten a la intervención y, por tanto, tener una esperanza de vida mayor, son más susceptibles a lo largo de los años de tener complicaciones derivadas del recambio protésico, ya sean secundarias a la necesidad de anticoagulación, al riesgo de trombosis protésica, a embolismos asociados a prótesis mecánicas, a la degeneración protésica en el caso de prótesis biológicas, o bien, a padecer una posible EI en ambas (52).



La reparación valvular, en lugar de la sustitución protésica, se ha convertido en una realidad en pacientes con IAo grave, aunque no es posible cuando hay una calcificación grave en la válvula. Existen actualmente varias técnicas quirúrgicas reparadoras cuyas tasas de éxito y durabilidad de la reparación son altas en centros con experiencia, por lo que es una opción aceptada para estos pacientes (145) (146).

Aquellos individuos con VAB y EAo grave, pero con comorbilidades asociadas, no susceptibles de cirugía cardíaca mediante esternotomía, se les debe considerar para realizar un recambio valvular percutáneo (TAVI) (3) (89) (90). Sin embargo, continúa habiendo cierta controversia en esta subpoblación. De hecho, los grandes ensayos clínicos que asentaron el uso de TAVI en pacientes con EAo grave, dejaron sin incluir a los pacientes con VAB (representaba un criterio de exclusión explícito), en parte debido a preocupaciones de que los resultados fueran subóptimos (147) (148). Posteriormente, se fueron realizando estudios en pacientes con VAB; con la primera generación de TAVI, los procedimientos se asociaron a un menor éxito y a mayor proporción de insuficiencia paraprotésica respecto a VAT (149). Investigaciones más actuales aportan mejores resultados de TAVI en VAB, gracias a las nuevas y mejoradas generaciones de prótesis y a una cuidada planificación de la intervención mediante la TC previa (150) (151). Sin embargo, la tasa de éxito no es paralela a la de los pacientes con VAT. Un reciente metaanálisis describe que los pacientes con VAB tienen una mortalidad similar a los 30 días y al año, así como similares tasas de ictus e implantación de nuevo marcapasos en comparación con los sujetos con VAT, pero tienen un mayor riesgo de insuficiencia paraprotésica moderada/grave, conversión a cirugía y/o fallo del dispositivo (152). Con todo, la investigación debe ir encaminada a comprender la anatomía bicúspide, los patrones de calcificación y sus relaciones con los resultados de la TAVI, para averiguar qué fenotipos valvulares resultan mejor para cada modelo de prótesis o qué fenotipo es menos favorable a realizar TAVI.



## 8.2. Reparación de dilatación aórtica.

Al contrario que la disfunción valvular grave, la progresiva dilatación aórtica suele ser asintomática y la indicación quirúrgica la marca, hoy en día y de forma fundamental, el diámetro del vaso (7) (89) (153). El momento óptimo de la intervención quirúrgica, para evitar la posibilidad de una emergencia aórtica que pueda ser fatal, se define como el momento en el que el riesgo del manejo conservador excede el riesgo de la cirugía profiláctica. Sin embargo, la determinación precisa de este momento es difícil y depende de varios factores, como la edad del paciente, los factores de riesgo, las comorbilidades, la experiencia del equipo quirúrgico, los antecedentes familiares y la presencia o ausencia de enfermedad valvular aórtica significativa. De este modo, el riesgo de una complicación relacionada con la reparación aórtica debe sopesarse frente al beneficio potencial de prevenir el desarrollo de complicaciones aórticas. En este sentido, la cirugía de reemplazo de aorta ascendente aislada se asocia con un riesgo de mortalidad periprocedimiento del 3,4 % y un riesgo de accidente cerebrovascular del 3,2 % (7).

Al comenzar las investigaciones de VAB, se pensaba que la aortopatía observada no era diferente de la asociada con la enfermedad de los pacientes con VAT. No obstante, en las décadas de 1990 y 2000, varios estudios hicieron pensar que la historia natural era diferente y había un fuerte papel genético subyacente, con un aumento sustancial de emergencias aórticas y riesgo de muerte en esta población de pacientes (154). Por esas fechas, se planteó un enfoque quirúrgico más agresivo, equiparándola al síndrome de Marfan, como se esgrime en las guías americanas de 2010 (155). Posteriormente, trabajos más actuales lo han llevado a un término medio, donde los componentes hemodinámicos y genéticos desempeñan papeles variables en diferentes subgrupos y donde el riesgo de complicaciones aórticas en VAB no es tan alto como se pensaba previamente (112) (156).





En las guías actuales se aconseja la cirugía para sustituir el segmento aórtico afectado por un tubo sintético cuando la dilatación sea superior a 55 mm en población general con VAB o VAT y a 50 mm para pacientes con VAB que posean ciertos factores de riesgo de disección. En caso de pacientes portadores de VAB con síndrome de Marfan que asocien factores de riesgo o pacientes con variantes patogénicas en los genes *TGFBR1* o *TGFBR2* (por ejemplo, síndrome de Loeys-Dietz) se aconseja la cirugía cuando la aorta sea  $\geq 45$  mm (6) (89).

Con un menor nivel de evidencia, las guías de práctica clínica aconsejan, cuando la cirugía está indicada para el problema valvular, considerar en el mismo acto quirúrgico el reemplazo de la raíz aórtica o de la aorta ascendente tubular cuando sus diámetros sean  $\geq 45$  mm (7) (89). Esta recomendación se fundamenta principalmente en un estudio retrospectivo del año 2004 de Borger *et al.* (157) que mostró una mayor incidencia de eventos aórticos durante el seguimiento de pacientes con VAB que habían sido sometidos a recambio valvular aislado con un diámetro aórtico de 45 mm o más. Es necesario señalar que la mayoría de los eventos no consistieron en complicaciones aórticas, sino en la necesidad de realizar una nueva operación electiva para reparar la aorta torácica al sobrepasar los límites por diámetro. Otro estudio que apoya esta indicación mostró que la mayoría de los pacientes con VAB sometidos a recambio valvular aislado que desarrollaron disección aórtica tenían una dilatación aórtica basal de 45 mm o más (158).

Asumiendo que la evolución natural de la dilatación aórtica es hacia el aumento paulatino de su diámetro hasta que se produce la rotura de este o la disección de las capas de su pared por la tensión parietal mantenida (ley de Laplace), se estableció un punto de corte para indicar su reparación ya que dichas complicaciones se relacionaron con el diámetro transversal máximo. El clásico estudio de Coady *et al.* (159) demostró este hecho, al observar que la probabilidad de rotura o disección fue un 25 % superior en pacientes con diámetros  $\geq 6$  cm en comparación con aquellos con diámetros entre 4-4,9



cm. Otro estudio que ayudó a establecer el punto de corte en 55 mm fue el de Davies *et al.* (160), donde analizaron a 721 pacientes con dilatación de aorta ascendente y comprobaron de nuevo como la tasa de rotura o disección mostró una clara correlación con el tamaño: 2 % al año para diámetros < 50 mm, 3 % por año para diámetros entre 50-59 mm y 7 % por año en aquellos con diámetro  $\geq$  60 mm.

Sin embargo, parece limitado basar toda la decisión de reparar la dilatación aórtica en su diámetro. Se ha observado que muchos pacientes con complicaciones tienen diámetros menores de 55 mm (161) (162) (163). La búsqueda de nuevos factores no se detiene. Varias técnicas de imagen modernas, como la tomografía por emisión de positrones (PET)-TC híbrida y la RMN flujo-4D, se han mostrado prometedoras para detectar la inestabilidad de la pared del vaso en una etapa más temprana (162). Sin embargo, la ausencia de datos consistentes y el riesgo quirúrgico absoluto bajo, aunque no despreciable, de una cirugía “de prevención” hacen que, por el momento, se mantengan dichos puntos de corte para ofrecer la intervención. Se ha establecido una aproximación más conservadora en VAB, lejos de indicaciones más agresivas de los trastornos conectivos como el síndrome de Marfan. Quizá también porque se ha comprobado un menor riesgo de complicaciones aórticas en VAB respecto a este subgrupo de pacientes (105) (107).

### 8.3. Opciones de tratamiento farmacológico

A pesar de los esfuerzos de la investigación, no hay en la actualidad tratamiento farmacológico efectivo que ayude a retrasar o que corrija la degeneración valvular o la progresiva dilatación de aorta.

Se recomienda un control exquisito de las cifras de presión arterial en estos pacientes. Además, aunque con un nivel de evidencia bajo y extrapolado de estudios realizados en población con enfermedades del tejido conectivo, fundamentalmente



Marfan, se recomienda el uso de betabloqueantes e inhibidores del sistema renina-angiotensina como fármacos preferentes en estos pacientes, dado que se piensa que poseen un efecto protector sobre la progresiva dilatación aórtica (7) (164) (165).

Por otro lado, la EAO que, como hemos visto, es la principal indicación de cirugía en pacientes con VAB, se relaciona con procesos moleculares de aterosclerosis y alteraciones del metabolismo óseo como veremos más adelante. Curiosamente, aún no ha sido descubierto un tratamiento capaz de detener o revertir la calcificación progresiva. Por otra parte, con la teoría de que el proceso degenerativo inicial a nivel del endotelio valvular comienza con inflamación y captación de lípidos oxidados, en las últimas dos décadas se han desarrollado varios ensayos clínicos con estatinas, para evaluar si estos hipolipemiantes presentaban efectos beneficiosos en pacientes con EAO. Estos estudios aleatorizados han obtenido resultados insatisfactorios (166) (167) (168). Se están buscando nuevas dianas terapéuticas como, por ejemplo, lipoproteína(a), un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica y de calcificación valvular (169). Un ensayo clínico publicado recientemente en 2022 analiza el efecto sobre los niveles de lipoproteína(a) del nuevo fármaco *olpasiran* (un pequeño RNA de interferencia, siRNA, del inglés *small interference RNA*) demostrando su franca reducción en sangre y permaneciendo en espera un posterior estudio sobre sus efectos clínicos (170).

## 9. Etiopatogenia

### 9.1. Genética

La presencia de una agrupación o afectación familiar en VAB ya fue sugerida hace décadas (171), siendo considerada hoy en día como un trastorno autosómico dominante



con baja penetrancia y expresividad variable (172) (173). Aunque diferentes genes se han asociado a VAB (Tabla 3), su origen genético preciso aún no ha sido dilucidado.

**Tabla 3.** Principales genes asociados a aortopatía bicúspide.

Gen	OMIM	Mecanismo/Rol	Referencia
<i>NOTCH1</i>	190198	Desarrollo de la válvula y regulación de vías de depósito de calcio	(174) (175) (176) (177)
<i>GATA4</i>	600576	Mayor susceptibilidad a VAB	(178) (179)
<i>GATA5</i>	611496	Desarrollo embrionario valvular	(179) (180) (181)
<i>GATA6</i>	601656	Mayor susceptibilidad familiar a VAB	(182)
<i>TBX5</i>	601620	Fibrilación auricular. Predispone a VAB	(183)
<i>SMAD6</i>	602931	Relación con la vía TGFβ. Relación con dilatación de aorta	(184) (185)
<i>FBNI</i>	134797	Integridad de pared vascular. Dilatación de aorta. Relación con Marfan	(186)
<i>ROBO4</i>	607528	Receptor de membrana. Predispone a VAB y dilatación de aorta	(187)
<i>ACTA2</i>	102620	Posible asociación familiar a dilatación de aorta en VAB	(188) (189)
<i>ELN</i>	130160	Desarrollo arterial. Correlacionado con diámetros de aorta en VAB	(190)

El principal gen, con la evidencia más sólida demostrada, que está asociado con VAB tanto en determinadas formas familiares como esporádicas es *NOTCH1* (ubicado en el cromosoma 9q 34.4, OMIM 190198). La vía NOTCH está directamente involucrada en el desarrollo de las almohadillas endocárdicas durante la cardiogénesis, siendo crucial en pasos tan importantes como la regulación de la EMT y la remodelación de la válvula aórtica inmadura (25) (175). Variantes genéticas en *NOTCH1* causan defectos del desarrollo en la válvula aórtica y, además se ha comprobado que generan una disminución de la represión de procesos que aumentan el depósito de calcio tisular, el cual causa la enfermedad de la válvula aórtica calcificada (CAVD, *calcific aortic valve disease*) (174). Además, también se han identificado variantes de pérdida de función en *NOTCH1*



asociadas a otras cardiopatías congénitas que afectan al TSVI o a la válvula mitral, en una forma autosómica dominante y expresividad variable (177).

La familia de genes GATA constituye una superfamilia de factores de transcripción que también se han relacionado con VAB (191). Esta familia consta de seis miembros, de los cuales *GATA4*, *GATA5* y *GATA6* son esenciales en la embriogénesis cardiovascular, así como en otros tejidos derivados del mesodermo y endodermo. Variantes de pérdida de función en *GATA4* (8p23.1, OMIM 600576) (178), *GATA5* (20q13.33, OMIM 611496) (180) (181) y *GATA6* (18q11.2, OMIM 601656) (182) se han asociado con una mayor susceptibilidad a padecer VAB. Nuestro grupo de investigación identificó en un trabajo previo cuatro variantes genéticas en *GATA4*, *GATA5* y *GATA6* solo presentes en pacientes con VAB, con potencial efecto patogénico predicho por herramientas bioinformáticas, apoyando la implicación de estos genes en el desarrollo de esta enfermedad congénita (179).

Otro factor de transcripción recientemente asociado con VAB es *TBX5* (12q24.21, OMIM 601620). Este gen previamente se había asociado con el desarrollo de fibrilación auricular y defectos de septación cardiaca pero una nueva variante que afecta a la actividad de la proteína también segrega con VAB (183).

El regulador transcripcional codificado por el gen *SMAD6* (15q22.31, OMIM 602931) se ha confirmado también que está relacionado con VAB y dilatación de aorta torácica asociada (185). El trabajo reciente de Luyckx *et al.* que estudió 473 pacientes con dilatación de aorta no relacionada con otros síndromes corroboró este hecho, identificando siete nuevas variantes probablemente patogénicas de *SMAD6* en individuos con VAB que poseían dilatación de aorta (184).

Otro gen que recientemente se ha relacionado con VAB es *ROBO4* (11q24.2, OMIM 607528). Gould *et al.* en su reciente investigación encontraron dos variantes que segregaban con dilatación de aorta ascendente en sujetos con VAB en dos familias



diferentes. La participación de *ROBO4* en el desarrollo de VAB y la enfermedad aórtica asociada se confirmó en el laboratorio utilizando animales deficientes (*knock out*) para *Robo4* (187).

El gen *FBNI* (15q21.1, OMIM 134797) codifica una glicoproteína extracelular (fibrilina-1), componente esencial del tejido conectivo. Es producida por las células de músculo liso vascular y regula la integridad estructural de la túnica media de la pared aórtica. Estudios previos han evidenciado la presencia de variantes genéticas en el gen *FBNI* en pacientes con VAB y dilatación de la raíz aórtica, y en pacientes con síndrome de Marfan que poseen VAB (186) (192). Se han propuesto como mecanismos para la enfermedad de la pared aórtica, tanto el aumento de la actividad de las metaloproteasas como la disminución de la expresión de fibrilina-1 en la pared aórtica (193).

Finalmente, variantes en el gen *ACTA2* (10q23.31, OMIM 102620), que codifica la actina de músculo liso, son responsables de hasta el 14 % de los problemas de dilatación aórtica y disecciones hereditarias en grupos familiares (188). Sin embargo, aunque se contempla como candidato, este gen no ha sido relacionado con la aortopatía en pacientes con VAB (189).

No solo las mutaciones sino también los polimorfismos podrían resultar importantes en la identificación precoz de los pacientes de mayor riesgo. Se ha demostrado que el polimorfismo funcional rs2071307 en el gen de la elastina (*ELN*, 7q11.23, OMIM 130160) se correlaciona con los niveles de fragmentos solubles de elastina circulante y el diámetro de la aorta ascendente en pacientes con VAB (190). Estos hechos podrían ser un importante punto de partida en la explicación de la dilatación de aorta en estos sujetos y estudios futuros tratarán de mostrar si la alteración en la estructura histológica de la elastina provoca una dispersión de la distribución de la tensión aórtica, pudiendo ser una causa de formación de dilataciones aórticas.



Sin embargo, aunque ya hay una gran lista de genes relacionados con VAB y la aortopatía asociada, todavía estamos lejos de un completo conocimiento de la base genética de esta enfermedad compleja y heterogénea.

## 9.2. Epigenética

Los mecanismos epigenéticos juegan un papel clave en el desarrollo embrionario del corazón y su desregulación puede ser la causa de diversas patologías (194). Hasta la fecha, se ha descrito una regulación epigenética aberrante en varias enfermedades cardíacas, por ejemplo, en los procesos de isquemia miocárdica, o también, en la aortopatía de pacientes con VAB (195). Los mecanismos epigenéticos principales relacionados son la metilación del DNA y la modificación de histonas.

La metilación del DNA suele tener lugar en dinucleótidos CpG agrupados en islas CpG, lo que da como resultado el silenciamiento estable de la expresión génica. En el caso de pacientes con aortopatía bicúspide, los resultados de Pan *et al.* mostraron un perfil diferencial de metilación de genes en pacientes con VAB en comparación con aquellos con VAT (196). Otro estudio reciente, realizado específicamente en pacientes con síndrome de Turner, analizó el metiloma del DNA en sangre obtenido de 45 individuos comparando pacientes con VAB frente a pacientes con VAT. Apuntan diferencias de patrones de metilación en el gen *MYRF* y hallan también patrones diferenciales en la vía de NOTCH1 entre mujeres con VAB y síndrome de Turner frente a mujeres con VAB euploides (197).

Asimismo, el papel que juega la modificación de histonas también es crucial. La modificación de la histona H3 cerca del promotor del gen *SMAD2* se ha observado en pacientes con dilatación de aorta torácica asociada a VAB, como mecanismo epigenético que genera la sobreexpresión de *SMAD2* (198). Esto sugiere un mal funcionamiento de los procesos celulares relacionados con la reparación y remodelación de la matriz



extracelular debido a la desregulación de la vía TGF $\beta$ -/SMAD, que juega un papel importante en la homeostasis del sistema vascular (199).

### 9.3. microRNAs y otros RNAs reguladores

El descubrimiento de otros mecanismos de regulación de la expresión génica supuso una revolución en la biología molecular. Estos mecanismos de regulación postranscripcional son los que involucran a los ncRNA, centrándonos, principalmente, en microRNAs (miRNAs) y RNAs no codificantes largos (lncRNA, del inglés *long non-coding RNA*).

Los miRNAs tienen un tamaño de 22 a 25 nucleótidos y regulan negativamente la síntesis de proteínas al inhibir la traducción o al promover la degradación de los RNA mensajeros (mRNA) (200). Además, hay que tener presente que, al transcribirse también de genes, el miRNA puede sufrir, a su vez, regulación transcripcional y también mecanismos epigenéticos. Se han descrito modificaciones postranscripcionales de miRNAs, como uridilación, adenilación y oxidación, que pueden cambiar su estabilidad y función. El descubrimiento de una cantidad significativa de miRNAs a nivel extracelular en suero o en plasma ha agregado otro nivel en la búsqueda de biomarcadores. La posibilidad de medir sus niveles utilizando métodos no invasivos ha abierto una nueva vía en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades, entre ellas, las cardiovasculares (201).

Actualmente, se sabe que se produce una expresión atípica de variados miRNAs en pacientes con VAB (202), y esta expresión anormal también puede deberse a la presencia de polimorfismos en los genes que codifican para estos miRNAs (203). Múltiples estudios han encontrado varios tipos de miRNAs con diferentes niveles de expresión en pacientes con VAB en comparación con pacientes con VAT (Tabla 4) (204).





**Tabla 4.** Principales microRNAs que muestran una expresión diferencial en pacientes con válvula aórtica bicúspide, con o sin aortopatía asociada.

microRNA	Regulación	Vía molecular implicada	Referencia
miR-141	↓	BMP2-genes relacionados con la calcificación tisular	(205)
miR-424	↓	SMAD7	(206)
miR-3688-3p, miR-424-3	↓	Vías TGFβ e Hippo	(207)
miR-423-5p	↓	TGFβ y SMAD2	(208)
miR-200	-	EndMT/EMT – dilatación de aorta	(209)
miR-130, miR-195, miR-497	↓	Genes pro-osteogénicos ALPL y BMP2	(210)
miR-133a, miR-143	↓	TIMP2	(211)
miR-145	↓	NOTCH1	(212)
miR-17/miR106a	-	↓TIMP1/2 /↑ MMP2	(213)
miR-122, miR-486	↓	Genes relacionados con la vía TGFβ	(208)
miR-130a	↑	Genes relacionados con la vía TGFβ	(208)
miR-718	↓	Remodelado vascular	(208)

↓: Disminuye la expresión; ↑: Aumenta la expresión

Además, aunque aún de forma incipiente, podrían resultar útiles para el tratamiento de diferentes patologías. Por ejemplo, se han probado en modelos animales con cáncer, siendo capaces de producir la regresión tumoral (214). También, la administración de un anti-miR-92a ha demostrado reducir el tamaño del infarto de miocardio en modelos porcinos (215).

Por otra parte, los lncRNAs son moléculas de más de 200 nucleótidos que regulan la expresión génica a varios niveles. Un estudio realizado por Carrión *et al.* mostró que los niveles del lncRNA HOTAIR están disminuidos en VAB comparado con tejido de VAT en células intersticiales aórticas humanas expuestas a fuerzas mecánicas cíclicas de estiramiento. Además, demostraron que la represión de HOTAIR *in vitro* condujo a un aumento en la expresión de genes relacionados con la calcificación, lo que sugiere que esta relación mecano-respuesta de HOTAIR es una de las razones por las que se produce una calcificación acelerada en pacientes con VAB, en los que la desconfiguración anatómica puede implicar mayores fuerzas mecánicas que deben soportar las cúspides (216).



Otra investigación publicada en 2022 por Lim *et al.* analiza la expresión de 28 subtipos de lncRNAs en tejido aórtico de pacientes con VAB sometidos a cirugía aórtica por aortopatía, comparándolos con controles sanos. La expresión del lncRNA TUG1 fue significativamente menor en tejido aórtico de VAB, mientras que la expresión del lncRNA MIAT fue significativamente mayor, mostrando de nuevo como este tipo de moléculas reguladoras están implicadas en la etiopatogenia de los procesos relacionados con la VAB (217).

Por el momento, pese a ser biomoléculas prometedoras, no se ha encontrado ninguna aplicación clínica como biomarcadores ni como dianas terapéuticas. Es necesario un estudio prospectivo a gran escala para evaluar los patrones de expresión de los ncRNA en VAB y esgrimir sus aplicaciones diagnósticas y predictivas (218).

## 10. Patogénesis de la calcificación valvular aórtica

Como hemos comprobado hasta ahora, las valvulopatías constituyen una enfermedad seria, que genera una alta morbi-mortalidad al individuo. Las válvulas del circuito sistémico (mitral y aórtica) son las más susceptibles de sufrir daño con el paso del tiempo, pues son las que mayores presiones soportan. De hecho, la EAo es la valvulopatía más prevalente que precisa intervención en la población occidental envejecida; con una incidencia exponencial, constituye un problema de salud pública de primer orden (89) (219). Se estima que el número de personas mayores de 75 años con EAo degenerativa se triplicará en los próximos 50 años en los países desarrollados (220). Como ya vimos en un apartado anterior, entre los individuos con VAB la causa principal de disfunción valvular es la EAo secundaria a esta progresiva calcificación (CAVD).



La CAVD conduce a una reducción del área valvular efectiva, provocando una estenosis u obstrucción al paso de sangre desde el ventrículo izquierdo a la aorta. Cuando el área de apertura está muy reducida, la estenosis es hemodinámicamente significativa, generando síntomas al paciente y ensombreciendo su pronóstico si no se interviene. Este proceso, en líneas generales, es provocado por una progresiva fibrosis y formación de depósitos de calcio en las cúspides valvulares.

Como se explicó con anterioridad, en las VAB el proceso de calcificación parece encontrarse acelerado, manifestándose la EAo a una edad menor que en los pacientes con VAT. Si bien, en términos globales, los mecanismos genéticos y moleculares de degeneración y progresiva calcificación son similares, cada vez se conocen más detalles que explican este proceso acelerado. Sin embargo, aún no existe un biomarcador capaz de proporcionar un nivel de riesgo de padecerla ni de graduar su gravedad ni predecir su velocidad de progresión. Se debe tener en cuenta que la enfermedad es silente (curso asintomático) hasta grados muy avanzados, donde hay ya repercusión hemodinámica del ventrículo izquierdo; por ello, la investigación en este campo es vital. La CAVD actualmente es reconocida como una enfermedad activa impulsada por la inflamación crónica y se divide en dos fases con una respuesta inmunológica y metabólica diferenciada (221).

### 10.1. Fase inicial: inflamación.

La fase inicial de la CAVD se ha relacionado con procesos inflamatorios a nivel del tejido de las cúspides. Parecen ser similares a procesos que tienen lugar en la aterosclerosis vascular. Varios estudios en los últimos años han destacado la importancia del estrés hemodinámico/mecánico como contribuyente patogénico potencial al daño e inicio de la inflamación tisular. Se ha demostrado como un estrés oscilatorio es capaz de modular alrededor de mil genes y miRNAs en cultivos *in vitro* de VECs (222). Como



consecuencia de ello, el endotelio de la cara aórtica valvular expresa menos genes antiosteogénicos, lo cual concuerda con la mayor fibrosis y mineralización en la cara aórtica que en la ventricular (223). Esto también podría explicar, en parte, por qué la VAB tiende a una calcificación acelerada, ya que la morfología anómala de los velos hace que soporten un mayor estrés hemodinámico en cada ciclo cardiaco, con un deficiente estiramiento axial y mayor presión espacial. De hecho, se ha comprobado que la activación endotelial y la calcificación aparece principalmente en el velo fusionado (224).

En este sentido, la influencia de la tensión mecánica en las cúspides induce, en personas predispuestas, disfunción endotelial en la capa de las VEC. Como veremos más adelante, las células protagonistas y las que orquestan los cambios tisulares son las VICs, células de origen mesenquimal capaces de adaptarse y diferenciar su fenotipo según el microambiente. No obstante, se ha demostrado su interrelación con estas células VECs, y el papel esencial que estas últimas desempeñan también en el proceso de mineralización. La monocapa de VECs forma una barrera que regula la permeabilidad del tejido valvular, la adherencia de células inflamatorias y las señales paracrinas, incluidas señales mecano-sensoriales; estas señales parecen estar relacionadas con el estrés hemodinámico que desemboca en los cambios tisulares. Se ha demostrado que el NO derivado de las VEC es un regulador de la vía NOTCH (225). Asimismo, la sobreexpresión de la cadherina-11 promueve la calcificación, asociándose a regulación positiva del factor de transcripción SOX-9 y de RhoA en las VEC (226).

De este modo, la alteración de este endotelio valvular permite el desarrollo de estrés oxidativo, acúmulo de lípidos e infiltración de células inmunes. De hecho, los niveles plasmáticos altos del colesterol LDL y de lipoproteína(a) son factores de riesgo reconocidos para el desarrollo de CAVD (227). Cada vez hay más pruebas de que el depósito de lipoproteínas en los tejidos induce fuertemente la inflamación crónica. En este contexto, se genera un ambiente oxidativo intravalvular, con presencia de especies



reactivas de oxígeno (ROS), producido por la desregulación de diversas moléculas que aumentan sus niveles, como nicotinamida adenina dinucleótida fosfato oxidasa (NADPH), xantina oxidasa o un desacoplamiento de NOS endotelial (eNOS) (228). En el caso de eNOS, el nivel de expresión es reducido, en general, en válvulas calcificadas, con mayor expresión en la cara ventricular (229). Esta podría ser una de las razones por la que se observa una calcificación más pronunciada en el lado aórtico de las cúspides.

En VAB en concreto, se genera un desbalance franco en la homeostasis. Se ha comprobado que hay un sistema de defensa antioxidante (superóxido dismutasa, catalasas, peroxidasa) deficiente, pudiendo ser consecuencia de variaciones genéticas concretas de estos pacientes (230). Por otro lado, se ha demostrado que las especies oxidadas de LDL (oxLDL) promueven la mineralización de VICs, así como los fosfolípidos oxidados (oxPLs) transportados por lipoproteína(a), estando relacionados directamente los niveles de oxPLs con la diferenciación osteogénica (231). Se ha demostrado que los oxPLs pueden inducir la apoptosis de las VICs al transformarse en lisofosfatidil-colina por la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2), cuyos niveles son mayores en el tejido valvular calcificado (232). Además, los oxLDL promueven la expresión de proteínas de adhesión celular como ICAM-1 o VCAM-1 en el endotelio valvular y, consecuentemente, hay una mayor adhesión y depósito de células inmunes que promueven la inflamación local (233) (234). Este ambiente proinflamatorio activa las poblaciones de macrófagos, monocitos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, en parte por la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*), al igual que en cualquier respuesta inmune, tales como los receptores tipo *Toll* (TLR, *Toll-like receptors*) y la vía del factor nuclear κB (NF-κB) (235). Monocitos y macrófagos participan en desencadenar la diferenciación osteoblástica de las VICs. TLR2 y TLR4 son expresados en las VICs y su unión con ligandos proinflamatorios desencadenan vías de diferenciación osteogénica (236).



Asimismo, la activación de TLR3 en las VICs induce la sobreexpresión de la proteína morfogénica ósea BMP-2, y de TGF- $\beta$ 1 y fosfatasa alcalina (ALPL), cuyas vías moleculares llevan al depósito de calcio (237) (238). Se ha sugerido que la subpoblación M1 de macrófagos posee un papel principal en este contexto, pues expresan niveles altos de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 e inhiben IL-10, interviniendo y promoviendo la inflamación local y, por tanto, la lesión valvular (230). También se ha comprobado que TGF- $\beta$  inhibe la expresión de CD31 y activa los factores de transcripción Snail/Slug, lo que resulta en una disminución de la cadherina endotelial vascular y lleva a la pérdida de uniones endoteliales y a la lesión endotelial (239). Por otro lado, los niveles altos de TNF- $\alpha$  inhiben la eNOS y también la expresión de CD31 y se estimula la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), necesaria para la diferenciación miofibroblástica de las VICs. Otro PRR presente en monocitos y macrófagos, llamado CLEC4E (miembro E de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C), está altamente expresado en válvulas aórticas humanas calcificadas. Este receptor parece reconocer restos celulares y cristales de colesterol, favorece su degradación intracelular, y participa en el proceso de inflamación endotelial vascular y aterogénesis (240).

## 10.2. Fase 2: progresiva mineralización

La inflamación local crónica inicial conduce a la progresiva fibrosis y mineralización del tejido valvular. A medida que avanza la mineralización, ésta se hace más independiente de las células inmunes, siendo regulada por varias vías moleculares relacionadas con la formación ósea (241) (Figura 18). La fibrosis se define por el crecimiento excesivo, endurecimiento y la cicatrización del tejido, y se atribuye al depósito excesivo de componentes conectivos (incluido el colágeno) y a la desorganización de la matriz extracelular. La molécula principalmente relacionada con la



fibrosis es el TGF- $\beta$ , cuya desregulación se ha demostrado en válvulas calcificadas. Conduce a una progresiva alteración de la matriz, contribuyendo a una mayor producción de proteoglicanos y glicoproteínas como la tenascina-C, que participan en la diferenciación osteogénica de las VICs (242). Además, TGF- $\beta$  se ve involucrado en el depósito difuso de material cálcico, secundario a la precipitación de vesículas después de la apoptosis (por aumento de expresión de caspasas) en miofibroblastos-VICs (243). Se ha descrito también la sobreexpresión del transportador de fosfato dependiente de sodio PIT-1 en válvulas aórticas calcificadas y en células VICs cultivadas *in vitro* expuestas a altas concentraciones de fosfato. Parece que la entrada de fosfatos en la célula, mediada por PIT-1, activa la caspasa-3, promoviendo dicha apoptosis (244).

Asimismo, las MMPs juegan un papel esencial, ya que además de participar en el propio remodelado de la matriz, generan péptidos capaces de promover la calcificación (245). La expresión de MMP-1, 2 y 3 es mayor en válvulas calcificadas que en las válvulas no calcificadas; concretamente, MMP-1 se asocia a la actividad de células inmunes, y su expresión se ve incrementada en las VICs en cultivo tras la aplicación de citoquina TNF $\alpha$  (246). Además aparece una sobreexpresión diferencial de MMP-9 en el tejido calcificado (247). Y también se ha encontrado una mayor expresión de MMP-10 en válvulas calcificadas (248).

Por otro lado, las especies oxidativas, el microambiente de la matriz extracelular y las citoquinas secretadas por las células inmunes, conducen a la diferenciación de las VICs en miofibroblastos y osteoblastos. En esta diferenciación participan varias vías: RANK/RANKL/OPG, Wnt/ $\beta$ -catenina, ENPP1, NOTCH, BMP/TGF- $\beta$ , RUNX2 y SMAD. Acontece una reorganización espacial de la matriz extracelular, que con la presencia de proteínas como la osteopontina (OPN) y otras proteínas de la matriz ósea se promueve el depósito de cristales de hidroxapatita.



La citoquina IL-6 es secretada por las VICs y sus niveles se encuentran aumentados en las válvulas aórticas calcificadas humanas. Se ha demostrado que IL-6 promueve la mineralización de VICs *in vitro*, a través de expresión de BMP-2 (249), y también induce la activación de la vía RANK/RANKL/OPG que resulta en la formación de proteínas involucradas en la calcificación tales como ALPL y osteocalcina (250).

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina es un regulador positivo osteoblástico y se relaciona con la actividad de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (ENPP1). ENPP1 hidroliza el ATP extracelular generando fosfato inorgánico y promoviendo así la calcificación. De hecho, un polimorfismo en el intrón 9 de *ENPP1* se asoció con CAVD y con niveles de expresión más altos de ENPP1 en válvulas estenóticas (251). Parece que el ATP extracelular puede actuar como una señal de supervivencia a través de los receptores purinérgicos P2Y2, y la reducción de sus niveles conduce a más apoptosis de las VICs. La disminución de la señalización de P2Y2 aumenta los niveles de IL-6, que a su vez promueve la expresión de BMP-2 y conduce a una mayor calcificación (249,252).

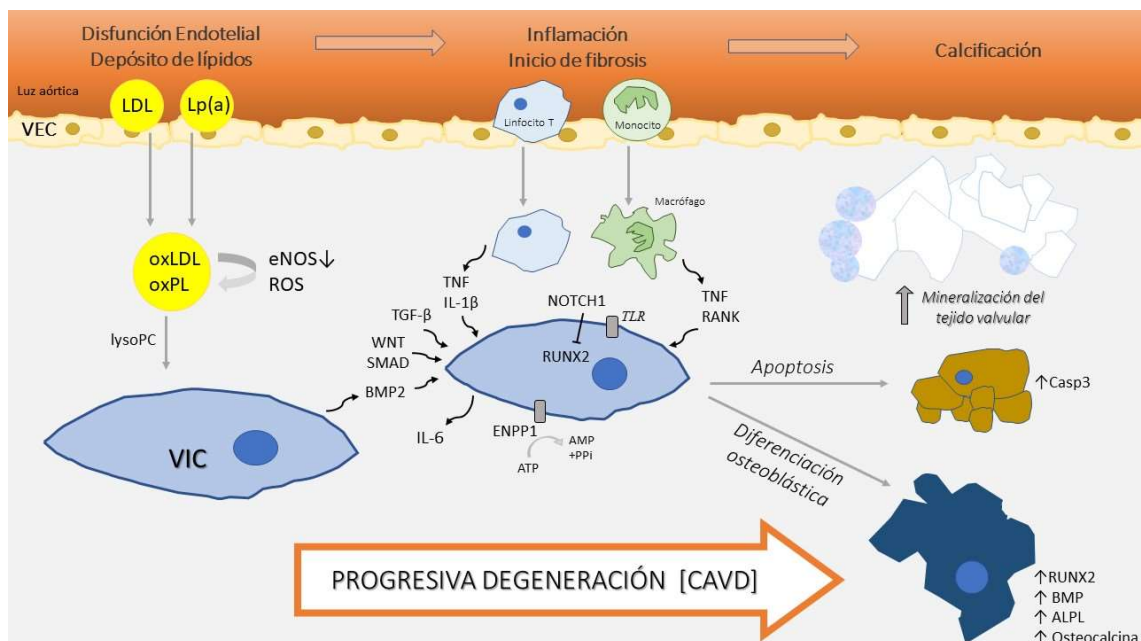
La vía NOTCH1 activa la expresión de Hey1 y Hey2, resultando en la represión de la expresión de BMP-2 y la disminución de la actividad transcripcional de Runx2, protegiendo así a las VICs de la diferenciación osteoblástica (253). Se observó que la eliminación endotelial del ligando Jag1 de NOTCH produjo la formación de nódulos calcificados en la válvula aórtica de ratones adultos (254). Otros estudios han encontrado que NOTCH1 regula positivamente la expresión de la proteína Gla de matriz (MGP), que se sabe que inhibe la calcificación a través del secuestro de BMP (255). Además, la proteína de matriz MGP interactúa directamente con la hidroxiapatita, inhibiendo el crecimiento de cristales en el tejido vascular (256). En concreto en VAB, se han encontrado mutaciones en NOTCH, pudiendo éstas reducir la actividad funcional de la vía proteica y disminuir el perfil de protección que ejerce esta vía molecular, con la consecuencia de la aparición de una calcificación valvular precoz (174). Recientemente





se ha comprobado como la expresión de NOTCH1 es menor en VAB en comparación con VAT calcificadas. La expresión correspondiente de Hey1 también fue más prominente en las células endoteliales derivadas de la válvula bicúspide, y éstas se mostraron más sensibles a la activación de la expresión proosteogénica inducida por OPN, ALPL o POSTN (periostina) (257) (Figura 18).

El factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2) es un factor de transcripción crítico para la formación del esqueleto y la calcificación ectópica de los vasos sanguíneos. Mientras que RUNX2 normalmente no se expresa en las válvulas aórticas y los vasos sanguíneos, numerosos estudios han mostrado como la sobreexpresión de RUNX2 se asocia a la diferenciación de células osteocondrogénicas y la presencia de lesiones calcificadas en enfermedad valvular degenerativa, calcificación diabética y placas ateroscleróticas en humanos y modelos animales (258).



**Figura 18.** Esquema sobre el proceso de progresiva mineralización del tejido del velo valvular aórtico. El estrés hemodinámico continuado junto a otros factores no conocidos desencadena disfunción endotelial, con la consiguiente infiltración de lípidos. Los procesos de oxidación lipídica desembocan en una respuesta inflamatoria que involucra macrófagos y linfocitos T. La inflamación desencadena la alteración de la estructura de la matriz extracelular y el cambio fenotípico de las VIC, resultando en un microambiente perfecto para la calcificación. Dominan



los procesos profibróticos y promineralizantes, con depósito de colágeno, generación de cristales de hidroxapatita, cambio de fenotipo a osteoblastos y aumento de la apoptosis celular. Todos estos procesos moleculares producen la calcificación de los velos aórticos.

Como se puede observar, en los últimos años se han descifrado muchos de los mecanismos que intervienen en la calcificación de la válvula aórtica, pero quedan muchas preguntas sin respuesta. Es una enfermedad compleja, donde interaccionan factores genéticos y metabólicos, células inmunitarias y células endoteliales e intersticiales del tejido valvular. Aunque la enfermedad esencialmente es la misma en individuos con VAB y VAT, existen diferencias entre ellas, como es el momento de aparición, más precoz en VAB. Muchas preguntas siguen abiertas sobre dónde residen estas diferencias. Algunos autores abogan por factores mecanorreceptores (mayor estrés en la hemodinámica valvular de VAB) junto con alteraciones genéticas (susceptibilidad) en esta subpoblación como causas fundamentales. La falta de modelos *in vivo* adecuados y la gran heterogeneidad de los modelos *in vitro* utilizados han limitado la obtención del conocimiento hasta el momento. La aparición de métodos más adecuados mejorará nuestra comprensión y, sin duda, conducirá a nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento.

## **Justificación del estudio**

---





Como se ha expuesto en la introducción, la VAB es la cardiopatía congénita más frecuente en la población general y presenta complicaciones graves y alta morbilidad en la juventud o en la edad media adulta de manera no infrecuente. Un gran porcentaje de las complicaciones son debidas a estenosis valvular, fundamentalmente secundaria a un proceso de calcificación acelerada, que sucede 20-30 años de media antes que en los pacientes con VAT. Las diferencias hemodinámicas que existen entre los dos tipos de válvula aórtica no explican completamente este hecho, lo que sugiere que existan posibles diferencias a nivel genético, epigenético, molecular o inflamatorio entre estos grupos de población (VAB y VAT).

A pesar del incremento exponencial en el conocimiento científico sobre la enfermedad en las últimas dos décadas, siguen existiendo incógnitas en la CAVD, que tiene gran relevancia clínica, pero también social y económica, siendo un importante problema de salud en el mundo occidental. A pesar de que se van identificando nuevas potenciales dianas terapéuticas, en el momento actual, no existe ningún tratamiento ni terapia preventiva eficaz. El único tratamiento definitivo es el reemplazo valvular aórtico, con el riesgo inherente que supone.

Además, el diagnóstico de esta patología, que en la actualidad es principalmente ecocardiográfico, no permite la identificación de los cambios que se producen sobre la válvula aórtica en las primeras fases de la enfermedad y que llevan a su calcificación. Por todo ello, es fundamental la búsqueda de posibles factores plasmáticos que nos permitan un diagnóstico precoz de la CAVD o del desarrollo de aortopatía asociada a la VAB y que, a su vez, constituyen posibles dianas terapéuticas sobre las que poder actuar y modificar así la historia natural de esta enfermedad.



## **Hipótesis y objetivos**

---







## Hipótesis

Los procesos de calcificación y degeneración tisular a nivel valvular son acelerados y tienen una presentación clínica a una edad más precoz en personas que presentan VAB respecto a las que portan VAT. Este hecho sugiere que existirían diferencias, por ejemplo, a nivel genético, epigenético, molecular o inflamatorio entre estos grupos de población. Dichas diferencias podrían resultar útiles en la práctica clínica diaria al permitir identificar a los pacientes con mayor riesgo de progresión de la valvulopatía o de la aortopatía o, incluso, identificar moléculas que podrían llegar a convertirse en nuevas dianas terapéuticas.

Para tratar de aportar conocimiento a estas necesidades, se proponen los siguientes objetivos.

## Objetivos

El objetivo general de la tesis es determinar diferencias que existen en el proceso de degeneración de la VAB desde un punto de vista de susceptibilidad genética o del mecanismo fisiopatológico que la causa. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- *Objetivo 1:* Configurar una base de datos común de pacientes con valvulopatía aórtica con datos demográficos, clínicos y ecocardiográficos y describir los distintos grupos de pacientes.



- *Objetivo 2:* Identificar polimorfismos en genes candidatos y analizar sus frecuencias en los distintos grupos de pacientes para buscar asociación, especialmente con la presencia de VAB.

- *Objetivo 3:* Caracterizar el estado inflamatorio e inmunológico prequirúrgico de los pacientes con VAB sometidos a reemplazo valvular aórtico mediante el estudio de biomarcadores en plasma, suero y células circulantes.

## **Población y métodos**

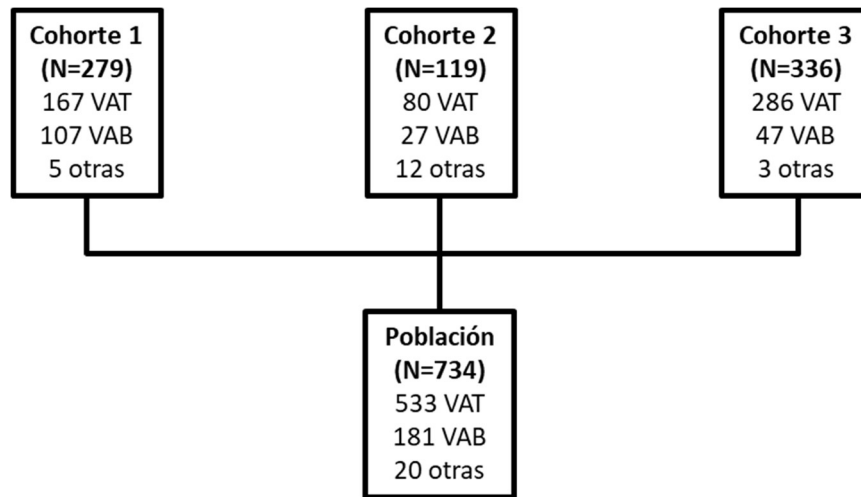
---



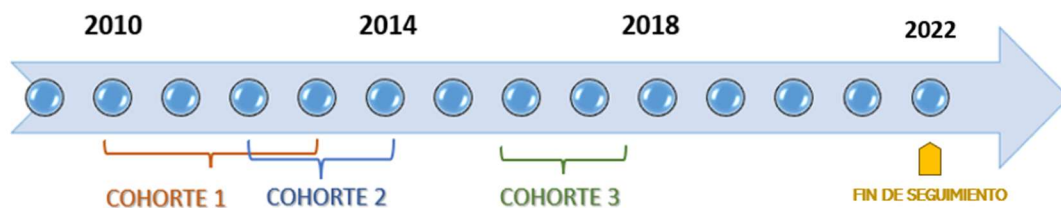


## 1. Población de estudio

La población en la que se basa este estudio consta de 734 individuos reclutados prospectivamente en tres cohortes, todas de la misma región de España (Principado de Asturias), a través del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) (Figura 19 y Figura 20). El diagnóstico principal se basó en la válvula aórtica. Al menos dos observadores expertos y entrenados determinaron el número de cúspides aórticas mediante una prueba de imagen cardíaca (fundamentalmente ecocardiografía). En el caso de pacientes intervenidos quirúrgicamente, la morfología de la válvula se constató por el cirujano durante el propio reemplazo valvular. Los individuos que se sometieron a una ecocardiografía que mostró una válvula aórtica que funcionaba normalmente se usaron como controles (normofuncionantes). Tanto en casos como en controles se siguieron las guías y criterios vigentes en el momento de la recogida para el diagnóstico de IAo, EAo y dilatación de aorta por análisis ecocardiográfico (153) (259). En caso de disección previa o coartación de aorta, los diagnósticos se confirmaron por RMC o TC. En caso de dilatación de aorta ascendente se realizó TC en el proceso diagnóstico según el criterio del cardiólogo responsable. Los datos antropométricos, demográficos, clínicos y bioquímicos se obtuvieron de la historia clínica, que había sido realizada en las consultas médicas cardiológicas o durante la visita preoperatoria de cirugía cardíaca y/o en las sucesivas postoperatorias, de acuerdo con la práctica médica habitual.



**Figura 19.** Composición de la población objeto de estudio según la morfología de la válvula aórtica. VAT: válvula aórtica tricúspide; VAB: válvula aórtica bicúspide. Otras: Pseudobicúspide, monocúspide, desestructurada sin tener confirmación de subtipo.



**Figura 20.** Línea temporal de reclutamiento de pacientes en las diferentes cohortes.

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y los protocolos de recogida de muestras humanas fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación del Principado de Asturias (84/13 y 90/17). Todos los pacientes que aceptaron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado en el que autorizaban la donación de una muestra de sangre y, en los casos procedentes de cirugía, una muestra de tejido valvular aórtico para estudio morfológico, molecular y genético.

Fueron criterios de exclusión de las tres cohortes la presencia de valvulopatía de origen reumático, el diagnóstico previo o sospechoso de síndrome de Marfan, síndrome



de Ehlers-Danlos u otros trastornos del tejido conectivo asociados con enfermedad aórtica, el diagnóstico de enfermedades genéticas relacionadas, como el síndrome de Turner, pacientes reintervenidos que portasen ya previamente prótesis aórticas, pacientes con imágenes ecocardiográficas subóptimas, pacientes menores de 18 años o el rechazo del paciente a participar en el estudio o a firmar el consentimiento informado.

La primera cohorte comprende una muestra de 279 sujetos no relacionados, reclutados prospectivamente durante revisiones médicas en el Servicio de Cardiología - Área del Corazón del HUCA, de octubre de 2010 a septiembre de 2013 en función del número de cúspides aórticas.

Para la segunda cohorte se incluyeron de forma consecutiva un total de 119 pacientes con diagnóstico de valvulopatía aórtica que fueron sometidos a recambio valvular aórtico en el Servicio de Cirugía Cardiovascular - Área del Corazón del HUCA, único centro público del Principado de Asturias que cuenta con Servicio de Cirugía Cardíaca, entre octubre de 2012 y abril de 2014. En concreto en este grupo también se excluyeron además pacientes con diagnóstico de enfermedad renal crónica estadio 5 o que hubieran sido sometidos a una técnica de terapia sustitutiva renal en el periodo cercano a la cirugía, pacientes mayores de 85 años y pacientes con otras valvulopatías concomitantes que ameritasen cirugía asociada o pacientes con miocardiopatías. Se incluyeron pacientes con diagnóstico de EAo, IAo o doble lesión que tenían realizado un ecocardiograma en los 6 meses previos a la cirugía y un estudio anatómico coronario invasivo en los 12 meses previos al procedimiento quirúrgico.

La tercera cohorte procedía de un proyecto de reclutamiento prospectivo de todos los pacientes sometidos a sustitución quirúrgica de la válvula aórtica en el HUCA entre noviembre de 2016 y noviembre de 2017 (N = 336). Se consideraron criterios de



exclusión específicos en esta cohorte los siguientes: pacientes sometidos a sustitución de válvula aórtica con EI activa y pacientes intervenidos de forma urgente.

A los 181 pacientes con VAB se les realizó un análisis retrospectivo exhaustivo y descriptivo recabando información detallada prequirúrgica, así como un seguimiento clínico a largo plazo en el tiempo.

Para el estudio del estado inmunológico e inflamatorio asociado a la enfermedad, se seleccionaron prospectivamente pacientes adicionales a las cohortes previamente descritas, para poder obtener células inmunitarias circulantes. Fueron incluidos durante su estancia en planta de hospitalización de Cardiología, siempre de forma previa a una intervención sobre la válvula y en una situación clínica estable previo al alta hospitalaria, fuera de un evento agudo que pudiera interferir en el estado inflamatorio subyacente. Se clasificaron en tres tipos de diagnóstico: pacientes con VAT y estenosis aórtica grave (EAo-VAT; N = 7), pacientes con VAB y estenosis aórtica grave (EAo-VAB; N = 7) y pacientes con VAT sin ninguna valvulopatía (Control; N = 6).

## 2. Variables a estudio

De la población a estudio, además de las variables demográficas como la edad y el sexo, se recogieron otras variables que se clasificaron en los siguientes grupos:

### 2.1. Variables antropométricas

Se obtuvieron datos del peso (kg), talla (cm), ASC e índice de masa corporal (IMC) utilizando las siguientes ecuaciones para su cálculo:  $IMC = \text{peso}/\text{talla}^2$ ; ASC, fórmula de Mosteller =  $\sqrt{(\text{peso} \times \text{talla})/3600}$ .





## 2.2. Factores de riesgo cardiovascular

### 2.2.1. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) se definió como el cumplimiento de alguno de los siguientes criterios, teniendo en cuenta la guía para el manejo de la HTA de la *European Society of Hypertension* (ESH) (260): historia de HTA diagnosticada o tratada con medicación, dieta y/o ejercicio; presión arterial sistólica igual o superior a 140 mmHg o diastólica igual o superior a 90 mmHg, al menos en dos determinaciones, o tratamiento antihipertensivo que no es administrado como terapia para otra patología distinta a la HTA.

### 2.2.2. Dislipemia

La dislipemia se definió de acuerdo con el cumplimiento de alguno de los siguientes criterios basados en la guía para el manejo de la hipercolesterolemia de la *American Heart Association* (AHA) (261): historia de dislipemia diagnosticada y/o tratada con medicación, dieta y/o ejercicio, cifras de colesterol total superior a 200 mg/dL, colesterol-LDL superior o igual a 130 mg/dL, colesterol-HDL inferior a 40 mg/dL.

### 2.2.3. Diabetes mellitus

Se consideró la existencia de diabetes mellitus en función de la presencia de alguna de las siguientes premisas basadas en los criterios diagnósticos recomendados por la *American Diabetes Association* (ADA) (262): historia de diabetes mellitus acreditada en un informe médico, utilización actual de tratamientos hipoglucemiantes orales y/o insulina subcutánea., glucemia en ayunas superior o igual a 200 mg/dL en cualquier situación y síntomas de diabetes mellitus, al menos dos determinaciones de glucemia en ayunas superiores o iguales a 126 mg/dL (entendiéndose como ayunas un periodo sin



ingesta de al menos 8 horas), determinación de HbA1c  $\geq 6,5$  % o glucemia plasmática a las 2 horas del test de sobrecarga oral a la glucosa  $\geq 200$  mg/dL.

#### 2.2.4. Tabaquismo

Se consideró fumador a cualquier individuo fumador activo durante el último año, exfumador a aquel individuo en el que constase el abandono del hábito tabáquico en un periodo mayor a un año y no fumador a aquella persona que nunca haya adquirido el hábito tabáquico.

### 2.3. Comorbilidades y otros antecedentes médicos

#### 2.3.1. Presencia de enfermedad coronaria aterosclerótica

La existencia de lesiones coronarias ateroscleróticas se evaluó en aquellos pacientes que realizaron coronariografía. La valoración de las lesiones se realizó en el gabinete de hemodinámica. Se definió como enfermedad aterosclerótica aquella que obstruía más del 50 % de la luz de la arteria. Se analizó mediante la revisión del informe del cateterismo cardiaco que hubiesen realizado dentro de los 12 meses previos a la inclusión en el estudio, tanto de la Unidad de Hemodinámica del Servicio de Cardiología del HUCA como del Servicio de Cardiología del Hospital de Cabueñes.

#### 2.3.2. Enfermedad vascular arterial periférica

La presencia de enfermedad vascular arterial periférica se determinó en base al cumplimiento de alguna de las siguientes premisas: claudicación intermitente en el ejercicio, amputación por insuficiencia vascular arterial, reconstrucción vascular, cirugía de derivación arterial o intervención percutánea arterial en las extremidades.



### 2.3.3. Filtrado glomerular estimado (FGe) y estadio de la enfermedad renal crónica

La estimación del filtrado glomerular se realizó mediante la ecuación CKD-EPI (263). La enfermedad renal crónica se define como un daño renal o un FGe  $<60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> durante un periodo superior o igual a 3 meses. Se diferencia en cinco estadios, siendo el estadio 5 la enfermedad renal crónica que precisa de terapia sustitutiva y el estadio 1 la situación más leve (264).

## 2.4. Variables ecocardiográficas

Las pruebas ecocardiográficas se realizaron en los servicios de cardiología del Principado de Asturias (en función del área sanitaria de pertenencia del individuo), analizando posteriormente la información acerca de la morfología y grado de lesión de la válvula aórtica. En la ETT se obtuvieron imágenes en modo M y bidimensionales de cada paciente, además de Doppler (pulsado y continuo) y Doppler color. Cuando se encontraban disponibles en los informes, se recabaron las siguientes medidas ecocardiográficas de los pacientes:

- Presencia y grado de IAo, siguiendo las recomendaciones de la *American Society of Echocardiography* (ASE) (265).
- Presencia y grado de EAo, siguiendo las recomendaciones de la ASE (266).
- Presencia de doble lesión, definida como la coexistencia de ambas lesiones: EAo al menos moderada e IAo significativa (grados 3 y 4).
- Gradientes transvalvular aórtico máximo y medio, obtenidos en milímetros de mercurio (mmHg).
- Área valvular aórtica media, medida en cm<sup>2</sup>.



- FEVI, expresada como porcentaje. Se utilizó para su cálculo el método de Teichhold en modo M o el método de Simpson en 2D mono o biplanar (en la mayoría) (168). Para la gradación de la FEVI se siguieron las guías vigentes (267). El término “preservada” indica un valor normal. Cuando en el informe solo constaba el término preservada, se tomó el valor 65 % para los análisis de datos.

- Espesor de la pared del ventrículo izquierdo, expresado en tres subgrupos según el grado de hipertrofia: grave ( $> 15$  mm), moderada (14-15 mm), leve (11-13 mm) o sin hipertrofia ventricular.

- Presencia de aortopatía asociada. Se definió si presentaba diagnóstico de dilatación de aorta y, cuando se había recogido en la historia clínica, los diámetros de ésta en milímetros, tanto de la raíz como del diámetro máximo de la aorta ascendente tubular.

## 2.5. Variables examinadas en portadores de VAB

Se llevó a cabo un análisis específico retrospectivo de la subpoblación de individuos portadores de VAB. Para mejorar la caracterización de los pacientes con VAB se examinaron las historias clínicas de los pacientes recogidas en los hospitales públicos del Principado de Asturias, recogiendo detalles tanto de información antropométrica, comorbilidades y diagnóstico como de su evolución clínica y eventos cardiovasculares desarrollados en el tiempo, tanto de los pacientes intervenidos quirúrgicamente (mayoría) como de los que no fueron intervenidos. De este modo, se analizaron las siguientes variables en este subgrupo:

### 2.5.1. Motivo del diagnóstico de VAB

Se analizó la fecha recogida en la historia clínica en la que el paciente, debido a la atención médica, fue diagnosticado de VAB, junto con el motivo que llevó a realizar el diagnóstico. Se contemplaron entre los motivos, los síntomas o signos principales



relacionados con VAB: soplo, sensación de disnea, dolor torácico, síncope o bien, si el diagnóstico fue de manera casual, al realizar una valoración cardiológica por un motivo que no fuese estrictamente cardiológico, o bien si éste fue realizado por un estudio de despistaje familiar.

### 2.5.2. Anatomía de la válvula aórtica

Entre los portadores de VAB se distinguieron los siguientes subgrupos:

A. VAB Fusionada. En la cual se contempló, cuando se registraba en el informe ecocardiográfico o en el informe intraoperatorio, la posición del rafe.

B. VAB de 2 senos.

C. Indeterminada. En el caso de que no existiera descripción del subtipo de bicúspide o no fuese posible diferenciar adecuadamente el número de velos debido a la intensa calcificación y/o desestructuración del tejido.

D. Pseudobicúspide. Aquellas VAT que debido al modo de calcificación sugiriesen en primera instancia bicúspide, y posteriormente se corroborase que se tratase de tricúspides.

### 2.5.3. Otras comorbilidades

Además de la presencia de enfermedades asociadas previamente consideradas (enfermedad coronaria, enfermedad arterial periférica, enfermedad renal crónica, factores de riesgo cardiovascular clásicos), fueron evaluadas:

- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Se determinó si se encontraba el diagnóstico de EPOC, que se define como una enfermedad respiratoria caracterizada por síntomas persistentes (disnea y tos crónica) y limitación crónica al flujo aéreo (268).



- Antecedente de accidente cerebrovascular

Se determinó si el paciente había presentado previo a su inclusión un accidente cerebrovascular (ACV) ya fuese éste, isquémico o hemorrágico.

#### 2.5.4. Presencia de endocarditis infecciosa sobre válvula nativa

Se determinó si el paciente con VAB había sufrido un episodio de EI sobre su válvula nativa y la fecha de esta.

#### 2.5.5. Variables relativas a la intervención quirúrgica

Se definió si el paciente había precisado una intervención quirúrgica cardiaca, así como el motivo concreto de la indicación quirúrgica, bien fuese por valvulopatía o por aortopatía, el tipo de intervención y la fecha de esta. Además, se recogió si se realizó una cirugía aislada valvular, o conjunta con cirugía de aorta asociada o con cirugía de revascularización mediante bypass aorto-coronario. También, si se implantó una prótesis valvular mecánica o biológica, en caso de que la válvula fuera sustituida.

#### 2.5.6. Variables relativas al seguimiento clínico.

Se examinaron las historias clínicas de los pacientes desde el diagnóstico de VAB hasta el 30 de octubre de 2022. En el periodo de seguimiento se determinó si surgieron complicaciones aórticas (disección o rotura), o bien si había desarrollado dilatación de aorta o habían aumentado los diámetros de ésta si el paciente ya estaba diagnosticado. Se recogió si había desarrollado insuficiencia cardiaca, complicación protésica, EI protésica tras la intervención, o si había precisado reintervención quirúrgica cardiaca y el motivo de ella. También se analizó si presentó fibrilación auricular (FA) en el seguimiento, o algún trastorno del ritmo que precisara del implante de un dispositivo intracardiaco (marcapasos, desfibrilador o terapia de resincronización). Se estudió si había precisado de ingreso hospitalario debido a alguna complicación relacionada con la VAB,



excluyendo el ingreso por la primera cirugía cardíaca. Asimismo, se analizó la mortalidad, particularmente la mortalidad cardiovascular, la mortalidad relacionada con VAB, la mortalidad perquirúrgica (en aquellos sometidos a una primera cirugía cardíaca) y la mortalidad dentro de los treinta primeros días de ésta.

### 3. Obtención de las muestras

Las muestras de sangre se recogieron en la consulta médica en pacientes ambulatorios o antes de la cirugía en el caso de reemplazo de válvula aórtica para evitar posibles alteraciones postoperatorias en los valores de los biomarcadores. A todos los pacientes se les entregó, en la consulta médica de manos del cardiólogo o en la consulta preoperatoria de manos del cirujano, el consentimiento informado del Biobanco, justificante de la donación de tejido y sangre que realizan. Las válvulas fueron extraídas en el quirófano por los cirujanos cardíacos y depositadas en tubos con RNAlater, para preservar el RNA celular. Las muestras fueron enviadas por un sistema de tubos neumáticos hasta el servicio de Anatomía Patológica (Biobanco del Principado de Asturias). Allí se procesaron de la siguiente forma:

- De las muestras de sangre se obtuvieron el suero, el plasma y el DNA genómico, siguiendo protocolos establecidos, y se almacenaron en alícuotas a -80 °C hasta su uso. En el caso de la obtención de células mononucleares periféricas, también se siguieron protocolos estándar y se almacenaron criopreservadas en el Biobanco.

- Los velos de las válvulas aórticas fueron procesados del siguiente modo: uno de los velos fue fijado en formol e incluido en parafina, otro de los velos fue colocado en etanol 70 % y mantenido a 4 °C hasta su uso y otro de los velos fue dividido en dos fragmentos y congelado directamente a -80 °C. En el caso de válvulas bicúspides, uno de



los velos fue dividido en dos partes para seguir su procesamiento como las válvulas tricúspides. La totalidad de las muestras permanecieron en el Biobanco del Principado de Asturias en esas condiciones hasta el momento del análisis.

Como control para los estudios de las muestras derivadas de sangre, se realizaron extracciones a pacientes que acudieron a la consulta por un motivo distinto a una valvulopatía aórtica y que ésta hubiese sido descartada mediante ecocardiografía. Estos pacientes firmaron el mismo consentimiento informado del Biobanco para la cesión de su sangre a fines de investigación. Estas muestras fueron procesadas en el Biobanco de la misma manera que se ha detallado para las de los pacientes.

#### 4. Genotipado

Las muestras de DNA genómico obtenidas se utilizaron para el análisis de los genotipos, mediante PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman® (*ThermoFisher Scientific*), para los siguientes polimorfismos:

-rs6702619 de *PALMD* (C\_26334289\_10)

-rs10455872 de *LPA* (C\_30016089\_10)

-rs1800795 de *IL6* (-174G>C; C\_1839697\_10)

Los genotipos se identificaron con el *software* StepOne v2.3. Para confirmar la precisión del procedimiento, se seleccionaron aleatoriamente alrededor del 5 % de las muestras y se volvieron a analizar, no encontrándose discrepancias en los genotipos encontrados.

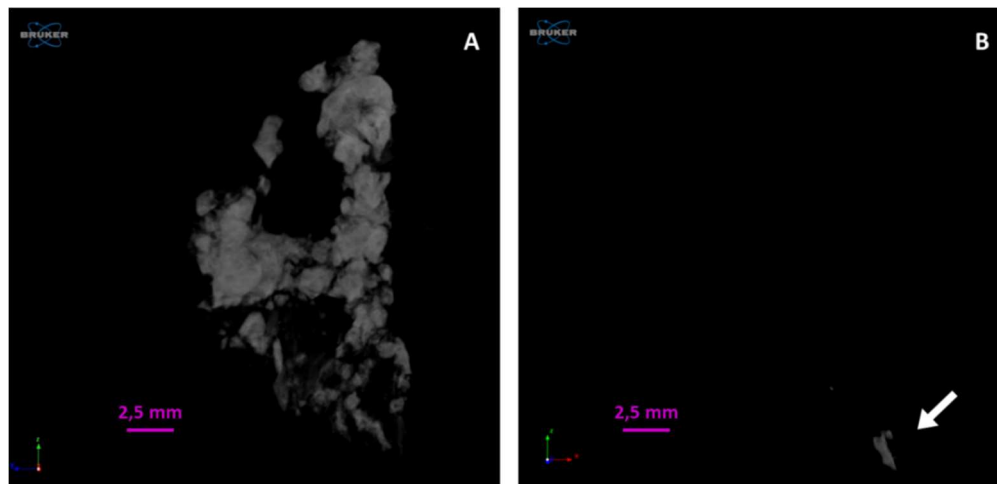




## 5. Medición del contenido de calcio en los velos de las válvulas por microtomografía computarizada

Las muestras de tejido conservadas en etanol al 70 % a 4°C fueron analizadas mediante microCT en un equipo SkyScan 1174 (Bruker, Kontich, Bélgica) disponible en la Unidad de Imagen Preclínica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Las imágenes fueron obtenidas utilizando unos parámetros de 50 kV y 800  $\mu$ A. Se obtuvieron unas 1300 imágenes de cada una de las muestras con un paso de rotación de 0,3° y un promedio de marco de 2 para un escaneo de 180°. El escaneo de cada una de ellas duró entre 10 y 20 minutos (dependiendo del tamaño del velo) usando un tiempo de exposición de 6200 ms. Se realizó la corrección de campo plano al principio de cada escaneo.

Las imágenes obtenidas fueron reconstruidas con el *software* NRecon (Bruker) (Figura 21). Los valores de corrección del coeficiente de atenuación, dureza del rayo, suavizado y artefactos de anillo fueron los mismos en todas las muestras. El análisis morfométrico en 3D fue realizado mediante el software CTAn (Bruker). El volumen de interés fue delimitado manualmente en cada una de las muestras. El umbral que se usó para todas ellas fue de 0,74 -3,39 g/cm<sup>3</sup> de densidad mineral ósea. La cantidad de calcio depositado se expresó como la relación entre el volumen óseo y el volumen total de la muestra de tejido (BV/TV, del inglés *Bone Volume/Tissue Volume*), parámetro comúnmente utilizado en histomorfometría ósea (269).



**Figura 21.** Imágenes de los depósitos minerales obtenidas tras el análisis mediante microtomografía computarizada (microCT) de los velos valvulares aórticos. A) Velo extensamente calcificado; B) Velo apenas calcificado (flecha). *Imágenes cedidas por la Unidad de Imagen Preclínica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.*

## 6. Tinción histológica y clasificación de Warren y Yong

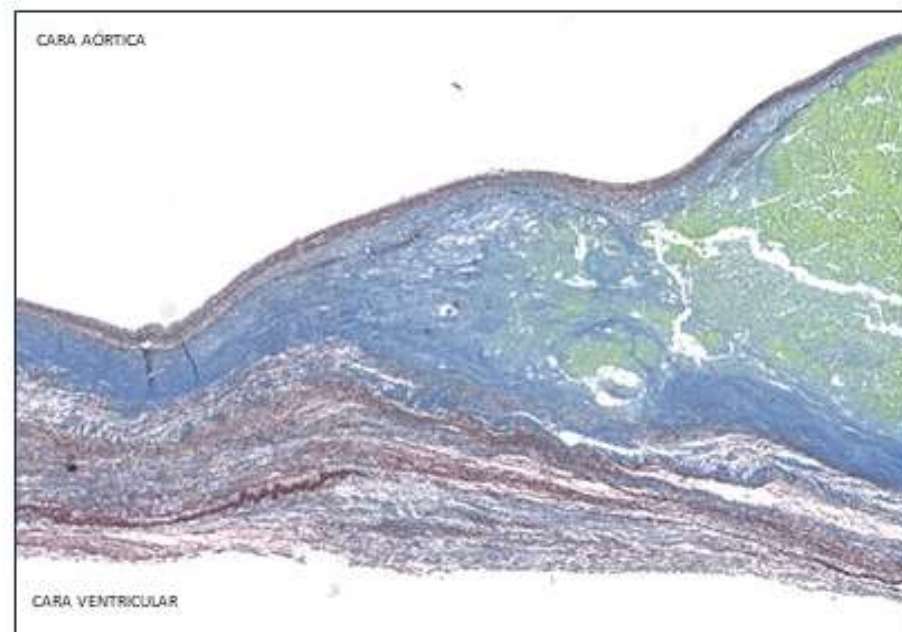
Warren y Yong en 1997 publicaron una clasificación en grados (1 a 4) según el nivel de desarrollo, a nivel histológico, de la calcificación en la válvula, basándose en las observaciones obtenidas de 374 válvulas aórticas de cirugías de reemplazo valvular (270).

Estos autores dividen el grado de calcificación valvular en cuatro estados:

- Grado 1, correspondientes a aquellos casos cuyos velos valvulares mantienen la integridad de la estructura, presentando engrosamiento fibroso sin presencia aún de calcio.
- Grado 2, son aquellas válvulas con fibrosis y aparición de nódulos calcificados con degeneración del tejido conectivo. La calcificación afecta a la capa fibrosa valvular, pero el tejido elástico aún está íntegro.
- Grado 3, los nódulos de calcio son abundantes, provocando una mayor degeneración de las capas, incluido el tejido elástico. Puede haber presencia de metaplasia ósea o cartilaginosa, cristales de colesterol y neovascularización.



- Grado 4, la estructura de los velos se encuentra desdibujada, sus componentes están alterados o incluso destruidos, incluidas las fibras de elastina. Los cambios metaplásicos y la neovascularización son frecuentes.



**Figura 22.** Imagen transversal mediante microscopía óptica de un velo aórtico calcificado teñido con orceína. Las fibras elásticas muestran un tono morado; el colágeno, azul; y la matriz con el mineral depositado en los velos, un tono verdoso. Esto permite localizar la cara ventricular en la parte inferior de la imagen y la cara aórtica en la parte superior. *Imagen realizada en la Unidad de Histopatología de la Universidad de Oviedo.*

Para facilitar esta clasificación, secciones transversales de 5  $\mu\text{m}$  de grosor de velos incluidos en parafina se tiñeron con orceína para poder diferenciar los distintos componentes del velo (Figura 22). Así, las fibras elásticas (elastina) se muestran con un tono morado, el colágeno en un tono azul y la matriz que contenía el mineral depositado en los velos, un tono verdoso. La tinción se llevó a cabo en la Unidad de Histopatología Molecular en Modelos Animales de Cáncer del Instituto Universitario de Oncología del Principado Asturias (IUOPA), siguiendo un protocolo descrito previamente (271). Una vez teñidos los cortes, se les aplicó el medio de montaje Entellan y se cubrieron con un cubreobjetos.



## 7. Citometría de flujo.

Para analizar el estado inmunológico e inflamatorio de los pacientes se midieron distintos marcadores no invasivos de inflamación en células mononucleares circulantes mediante citometría de flujo (FACS, del inglés *Fluorescence-activated cell sorter*). En concreto, se estudiaron los siguientes marcadores:

- subpoblaciones de monocitos circulantes (clásicos, intermedios y no clásicos) según la expresión de CD14 y CD16, así como cuantificación de la expresión del enzima convertidor de angiotensina (ECA) y de las células que lo expresan;

- linfocitos T colaboradores (Th, del inglés *helper*) inmunosenescentes ( $CD4^+CD28^{null}$ ) y linfocitos T angiogénicos (Tang) ( $CD3^+CD31^+CD184^+$ ) tanto funcionales ( $CD28^+$ ) como senescentes/inflamatorios ( $CD28^{null}$ ).

**Tabla 5.** Anticuerpos utilizados para la identificación de distintos subtipos celulares dentro de las células mononucleares circulantes de pacientes, mediante citometría de flujo.

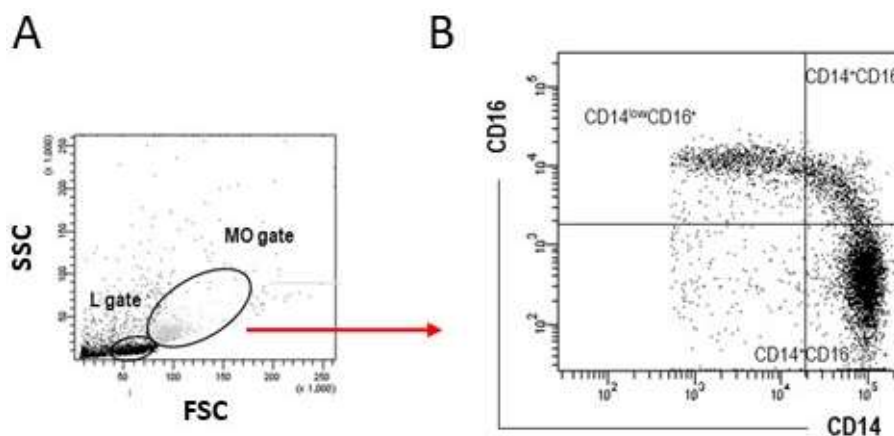
Marcador	Conjugación	Casa comercial
CD14	PE	Immunostep
CD16	APC-Cy7	BioLegend
ACE	APC	Miltenyi Biotech
CD3	PerCP-Cy-5,5	Tonbo Biosciences
CD31	FITC	BD Biosciences
CD184	PE-Cy7	BD Biosciences
CD4	PE	Immunostep
CD28	APC-Cy7	BD Biosciences
CD8	APC	Immunostep

Para cuantificar estas subpoblaciones, las células mononucleares de sangre periférica se incubaron con diversos anticuerpos (Tabla 5) o anticuerpos del isotipo correspondiente como control negativo, durante 30 minutos a 4°C, protegidas de la luz.



A continuación, las células se lavaron dos veces con un tampón fosfato salino y se analizaron mediante citometría de flujo con un equipo FACS Canto II (BD Biosciences) y con el software FACS Diva 6.5.

Para el análisis se utilizaron estrategias descritas previamente (272), diseñando una ventana (*gate*) que excluye los desechos y eventos no celulares. Las regiones de monocitos y linfocitos se definieron de acuerdo con sus características de tamaño y complejidad (gráfico FSC/SSC, del inglés *forward scatter/side scatter*) (Figura 23A).



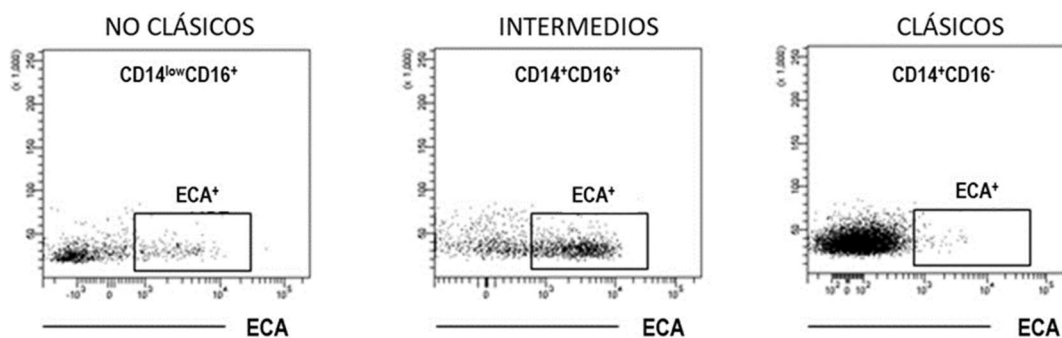
**Figura 23.** Estrategia para la identificación y cuantificación de subpoblaciones de monocitos en células mononucleares de sangre periférica mediante citometría de flujo. A) Gráfico FSC/SSC (tamaño/complejidad). B) Gráfico de puntos basado en positividad para CD14 y CD16. *L gate*: ventana de linfocitos; *MO gate*: ventana de monocitos; CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>: monocitos clásicos; CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>: monocitos intermedios; CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>: monocitos no clásicos. *Imágenes cedidas por Javier Rodríguez Carrio, del Área de Inmunología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.*

Para el análisis de monocitos, los eventos contenidos en la región de monocitos en la gráfica FSC/SSC (*MO gate*) fueron evaluados por su expresión de CD14 y CD16, y los subconjuntos se definieron de la siguiente manera: monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) (Figura 23B). Todos los monocitos estaban contenidos dentro de la región de monocitos definida



por el gráfico FSC/SSC (*MO gate*). Además, no se encontraron linfocitos dentro de esta región, ya que todas estas células se caracterizaron por una expresión de  $CD14^-$ . Tampoco se observaron monocitos dentro de la ventana de linfocitos (*L gate*).

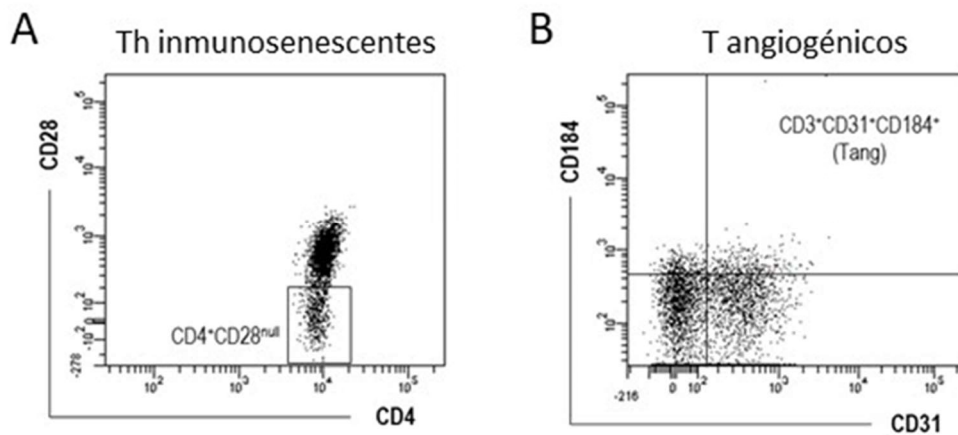
La expresión de ECA se evaluó en la región de monocitos completa, así como en cada uno de los diferentes subconjuntos de monocitos, cuantificando los eventos  $ECA^+$  dentro de cada población (% de monocitos que expresan ECA) (Figura 24). También se cuantificó la expresión de ECA como media de la intensidad de fluorescencia (unidades relativas).



**Figura 24.** Estrategia para la identificación y cuantificación de la expresión de enzima convertidora de angiotensina (ECA) en las distintas subpoblaciones de monocitos mediante citometría de flujo. Gráfico de puntos basado en positividad para ECA dentro de la ventana de cada subpoblación de monocitos. *Imágenes cedidas por Javier Rodríguez Carrio, del Área de Inmunología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.*

Para la identificación y cuantificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos se siguieron estrategias descritas previamente (273). Dentro de las células  $CD3^+$  (linfocitos T) se evaluó la expresión de  $CD4$  y  $CD8$  y las células  $CD4^+$  que carecían de expresión de  $CD28$  se definieron como células Th inmunosenescentes ( $CD4^+CD28^{null}$ ) (274) (Figura 25A). Lo mismo en el caso de las  $CD8^+$ .

Por otra parte, dentro de la ventana de linfocitos  $CD3^+$ , aquellos  $CD31^+CD184^+$  se consideraron Tang ( $CD3^+CD31^+CD184^+$ ) (Figura 25B). Los linfocitos Tang se subdividieron, además, en subconjuntos  $CD4^+$  Tang y  $CD8^+$  Tang.



**Figura 25.** Estrategias para la identificación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos mediante citometría de flujo. A) Gráfico de puntos basado en positividad para CD4 y CD28 dentro de la ventana de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (linfocitos Th inmunosenescentes CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>). B) Gráfico de puntos basado en positividad para CD31 y CD184 dentro de la ventana de células CD3<sup>+</sup> (linfocitos T angiogénicos CD3<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD184<sup>+</sup>). *Imágenes cedidas por Javier Rodríguez Carrio, del Área de Inmunología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.*

La proporción de cada población se refirió como porcentaje de las ventanas parentales a menos que se indique lo contrario. Los niveles absolutos de células se calcularon aplicando los respectivos porcentajes a los recuentos de linfocitos/monocitos obtenidos en los recuentos automáticos de células sanguíneas.

## 8. Medición de los niveles circulantes de interleucinas

Los niveles circulantes de interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), osteoprotegerina (OPG), BMP-2 e IL-1 $\beta$  se midieron en el Servicio de Inmunología del HUCA como parte del ensayo *Human Luminex Discovery Multiplex Assay* (R&D Systems) siguiendo el protocolo del fabricante. Antes de analizarlos, los sueros se centrifugaron 4 min a 16000 g y se diluyeron 1:2 utilizando el diluyente proporcionado por la casa comercial. El procedimiento se basa en la utilización de anticuerpos específicos contra las moléculas que se quieren analizar unidos a micropartículas



magnéticas conjugadas con fluoróforos y permite el análisis simultáneo de las cinco moléculas con una sensibilidad de 3,6; 0,8; 1,7; 1,8 y 3,62 pg/mL para: BMP-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y OPG, respectivamente.

## 9. Análisis estadístico

Las variables continuas fueron descritas mediante media y desviación estándar (SD) o mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se describieron mediante frecuencias relativas y absolutas. Las variables cuantitativas se compararon entre grupos mediante la U de Mann Whitney y las cualitativas mediante la prueba de Fisher. El equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos se probó mediante una prueba de Chi-cuadrado. Se utilizaron modelos de regresión logística multivariable para detectar asociación entre polimorfismos y estenosis. El modelo completo se ajustó con los factores de riesgo cardiovascular clásicos (edad, sexo, tabaquismo, HTA, diabetes mellitus, dislipidemia), utilizando como variable dependiente el diagnóstico agrupado en dos categorías: controles normofuncionantes más IAo vs. EAo o VAT vs. VAB. Se informaron las razones de probabilidad (OR), el intervalo de confianza (IC) del 95 % y los valores de p del modelo. Para el análisis de la variable BV/TV, se utilizaron las pruebas U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Las correlaciones entre variables se determinaron mediante los coeficientes de Pearson o de Spearman. Se utilizaron funciones de Kaplan-Meier para estimar las medianas de supervivencia en años y, en el caso de pacientes intervenidos quirúrgicamente, complicación y reintervención en el seguimiento. Para todos los análisis se consideraron censurados a los pacientes que al finalizar el periodo de seguimiento no habían experimentado el evento. Se presentaron gráficamente las curvas de Kaplan-Meier con su intervalo de confianza al 95%. Los p-





valores inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* de libre distribución R versión 4.1.3 (275).



## **Resultados**

---





## 1. Análisis descriptivo de la población a estudio.

La población inicial consistió en 734 individuos adultos. Para una mejor definición de la muestra, se eliminaron del análisis los individuos que tenían una válvula aórtica con morfología distinta a tricúspide o bicúspide, eliminando así las monocúspides, pseudobicúspides y las altamente desestructuradas (N = 20, Figura 19). De esta forma, la población sometida a estudio consistió en 714 individuos cuyas principales características, agrupadas según la morfología de la válvula, se recogen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Características principales de la población global según la morfología de la válvula aórtica.

Característica	VAT N = 533	VAB N = 181	p-valor
<b>Edad, años</b>	72,7 (8,9)	55,5 (15,0)	<0,001
<b>Sexo, n (%)</b>			<0,001
Hombres	288 (54,0)	141 (78,0)	
Mujeres	245 (46,0)	40 (22,0)	
<b>Exposición a Tabaco, n (%)</b>	183 (34,3)	77 (42,5)	0,047
<b>Hipertensión arterial, n (%)</b>	397 (74,5)	73 (40,3)	<0,001
<b>Dislipemia, n (%)</b>	301 (56,5)	64 (35,4)	<0,001
<b>Diabetes mellitus, n (%)</b>	160 (30,0)	22 (12,2)	<0,001
<b>Valvulopatía, n (%)</b>			<0,001
Estenosis aórtica	372 (69,8)	106 (58,6)	
Insuficiencia aórtica	53 (9,9)	50 (27,6)	
Doble lesión	43 (8,1)	15 (8,3)	
Normofuncionante	65 (12,2)	10 (5,5)	
<b>FGe, mL/min/1,73 m<sup>2</sup><sup>a</sup></b>	67,9 (19,0)	80,9 (22,1)	<0,001
<b>Enfermedad coronaria, n (%)<sup>b</sup></b>	109 (29,8)	15 (10,4)	<0,001
<b>Dilatación aorta ascendente, n (%)<sup>c</sup></b>	11 (4,4)	82 (45,3)	<0,001
<b>Ecocardiografía</b>			
Gradiente medio, mmHg <sup>d</sup>	46,4 (13,6)	49,0 (13,0)	0,194
Gradiente máximo, mmHg <sup>e</sup>	76,8 (21,5)	77,8 (22,0)	0,778

VAT: válvula aórtica tricúspide; VAB: válvula aórtica bicúspide; FGe: filtrado glomerular estimado. mmHg: milímetros de mercurio. <sup>a</sup>: dato disponible para 440 individuos; <sup>b</sup>: dato disponible para 510 individuos; <sup>c</sup>: dato disponible para 429 individuos; <sup>d</sup>: dato disponible para 334 individuos; <sup>e</sup>: dato disponible para 307 individuos.



Entre la población de individuos con VAT no encontramos diferencias de prevalencia respecto al género; sin embargo, en VAB observamos una mayor proporción de varones (78 %). Observamos diferencias en cuanto a la edad media de ambas poblaciones, siendo mayor en el grupo VAT, con una edad media en VAB en el momento de la inclusión dentro de la sexta década de la vida (50-60 años). La proporción de individuos con IAo fue significativamente mayor en el grupo de VAB (27,6 % vs 9,9 %). En el grupo de VAB se incluyó un bajo número de válvulas normofuncionantes (N = 10). Cuando existe EAo significativa, los datos hemodinámicos (gradiente máximo y medio ecocardiográficos) son similares entre las poblaciones. La presencia de dilatación de aorta fue significativamente mayor en el grupo de VAB (45,3 % vs 4,4 %). Respecto a los factores de riesgo cardiovascular, podemos observar como las tasas en cada variable son más bajas en pacientes con VAB (menor número de comorbilidades) respecto a VAT, salvo en la proporción de fumadores, donde resulta similar. De hecho, en el análisis conjunto de factores clásicos también se observa que son significativamente menos frecuentes en el grupo con VAB que en VAT: HTA + dislipemia (23,2 vs 44,3 % respectivamente,  $p < 0,001$ ) y HTA + diabetes mellitus + dislipemia (8,3 vs 16,3 % respectivamente,  $p = 0,008$ ).

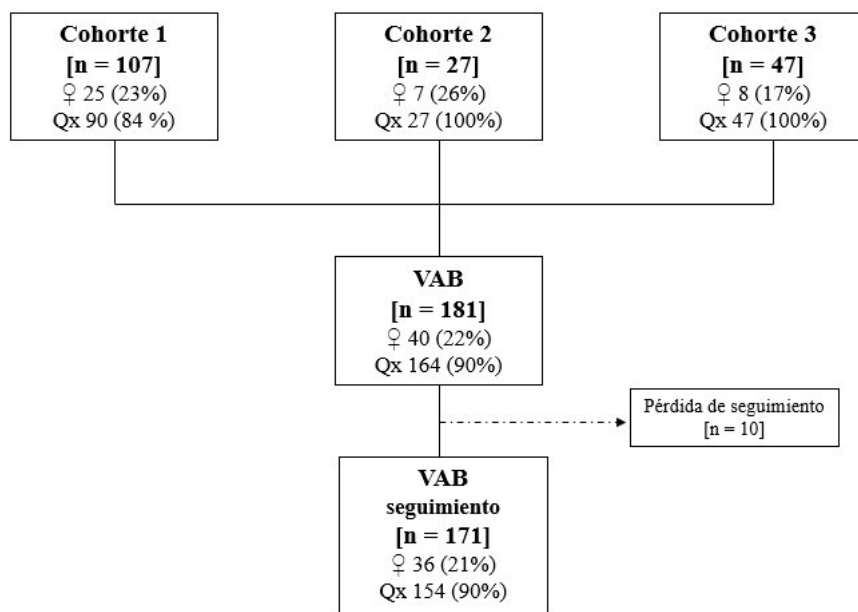
## 2. Análisis de la subpoblación portadora de VAB

Se analizaron de forma retrospectiva las historias clínicas de 171 individuos con aortopatía bicúspide, excluyendo 10 para los cuales no se disponía de acceso a la historia clínica de seguimiento (77,8 % varones, Figura 26).

Entre los factores de riesgo, un 27,5 % eran exfumadores y un 15,2 % fumadores activos. El 43,2 % presentaba HTA, el 36,3 % dislipemia y el 10,5 % diabetes mellitus



tipo 2, habiendo solamente un caso con diabetes mellitus tipo 1. En cuanto a la presencia de otras comorbilidades, el 10 % tenía diagnóstico de fibrilación auricular, el 4,6 % presentaba EPOC, el 1,8 % enfermedad arterial periférica y el 4,6 % antecedente de accidente cerebrovascular (ACV). En cuanto a la presencia de enfermedad renal crónica, se detectaron unos valores medios de creatinina de  $0,92 \pm 0,26$  mg/dL, teniendo el 9,4 % enfermedad renal crónica. Del total de pacientes con VAB, el 9 % presentaba enfermedad coronaria aterosclerótica significativa.



**Figura 26.** Diagrama de flujo de los pacientes con válvula aórtica bicúspide (VAB) incluidos en el subanálisis. ♀ = *sexo femenino*; Qx = *Sometidos a cirugía cardíaca*.

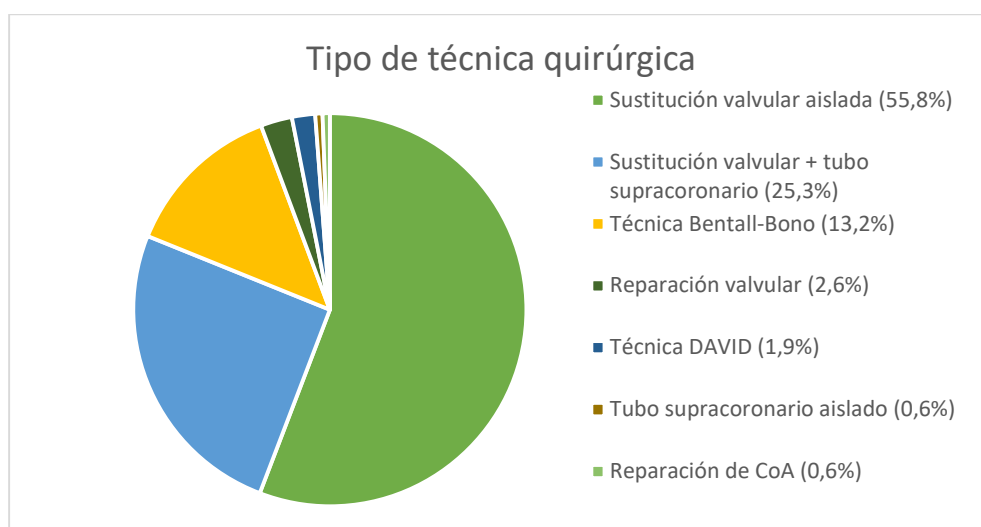
La edad media al diagnóstico de VAB fue de  $40,5 \pm 19,5$  años. Cuando estaba recogido en la historia clínica, se analizó el motivo de diagnóstico, siendo el más frecuente la derivación a cardiología por la auscultación de soplo (51,3 %), seguido de estudio de disnea (22,8 %), dolor torácico (15,8 %), el hallazgo de forma casual al estudiar otro motivo (8,9 %) o por otras causas cardíacas como síncope, taquiarritmias, etc. (1,3 %).



El tiempo total de seguimiento de los pacientes de la serie fue de media  $11,2 \pm 1,0$  años, comprendiendo desde su fecha de inclusión hasta el 30/10/2022, fecha máxima de revisión de las historias de los pacientes.

De los pacientes, el 90,1 % (N = 154) fueron intervenidos por cirugía cardiaca, a una edad media de  $58,1 \pm 14,1$  años, mediana 59,4 años [26,6 – 84,6], siendo el más joven intervenido a una edad precoz, 26 años. La mediana de tiempo entre el diagnóstico de VAB y el momento de la cirugía fue de 4,6 años [0,01 – 46,0].

La causa más frecuente que motivó la intervención quirúrgica fue, en el 88,3 %, la disfunción valvular. Del total de cirugías, el 66,9 % fue debido a EAo grave secundaria a CAVD, seguida de IAo grave en el 17,5 %, y doble lesión valvular grave en el 3,2 % de los casos. En nuestra serie, la edad media en la cirugía de los pacientes con EAo grave fue  $60,7 \pm 14$  años. Se indicó cirugía por dilatación de aorta como principal motivo en el 7,8 % de los casos. Además, 4 casos (2,6 %) fueron operados debido a EI valvular, otros dos casos debido a disección aórtica aguda que generó a su vez disfunción valvular y, por último, otro paciente debido principalmente a coartación de aorta sintomática sin disfunción valvular significativa.



**Figura 27.** Técnicas quirúrgicas utilizadas en los pacientes con válvula aórtica bicúspide intervenidos por cirugía cardiaca.





En las intervenciones, en el 55,8 % de los individuos se realizó sustitución valvular aislada, seguido del 25,3 % de los casos sustitución valvular más tubo en aorta ascendente (supracoronario). En un 13,2 % se realizó la técnica de Bentall-Bono (tubo valvulado sin preservación de válvula aórtica nativa), y en el 1,9 % (3 casos) la técnica de DAVID (reparación de dilatación de raíz de aorta con preservación de válvula aórtica nativa). Solamente en 4 casos (2,6 %) se realizó reparación de la VAB, siempre en el contexto de IAo. Tubo supracoronario sintético aislado solamente se realizó en un paciente (0,6 %), y reparación de aorta por CoA en otro paciente (0,6 %, Figura 27).

En el 9,1 % de las intervenciones se realizó en el mismo acto quirúrgico una derivación aorto-coronaria (*revascularización coronaria*).

De aquellos intervenidos por disfunción valvular, el 71,2 % recibió implante de una prótesis mecánica.

En la revisión de las historias clínicas e informes quirúrgicos solamente se describía el subtipo de VAB en el 41 % de los pacientes, resultando *indeterminado* para el resto de los casos. Entre aquellos donde se conocía el subtipo, solamente un caso resultó subtipo de VAB de dos senos, siendo el resto subtipo fusionada, con rafe situado entre cúspide derecha e izquierda en la mayoría de ellos; 5,7 % entre cúspide derecha y no coronaria, y 2,9 % (2 casos) entre cúspide izquierda y no coronaria.

El 60,8 % de los pacientes presentaba algún grado de IAo, siendo moderada en el 28,8 % de los casos que tenían insuficiencia y grave en el 43,2 %.

El 75,3 % presentaba algún grado de EAo secundaria a CAVD. De ellos, al momento de la inclusión, el 83,5 % (N = 106) era en grado grave y 6,2 % grado moderado por parámetros ecocardiográficos.

Del total de pacientes, el 51,5 % tenía dilatación de raíz aórtica o aorta ascendente. De ellos, el 16,5 % presentaba dilatación de raíz aórtica, el 40,5 % de aorta ascendente



tubular, y el 43 % presenta dilatación de ambas zonas de la aorta. Al analizar aquellos con dilatación de raíz de aorta, la mediana de dilatación fue 43 mm [40 – 74] y en aquellos con dilatación de aorta ascendente tubular, 47 mm [40 – 75]. Debido a dilatación de aorta, siguiendo los límites de diámetro establecidos en las guías de práctica clínica, se realizó cirugía de aorta ascendente asociada en el 43,5 % de las intervenciones. En el total de pacientes se registraron 2 casos de complicación de pared aórtica, uno de ellos diagnosticado intraquirófano, y 9 pacientes (5,3 %) presentaban algún grado de coartación de aorta asociada.

En la cohorte se registraron 9 casos de EI sobre válvula nativa con una media de edad al diagnóstico de  $54,6 \pm 10,9$  años. La mediana de tiempo entre el diagnóstico de VAB y el desarrollo de EI nativa fue de 4,9 [0,1 – 33,8] años. 4 individuos precisaron cirugía debido a este proceso y 5 se resolvieron con terapia antibiótica dirigida.

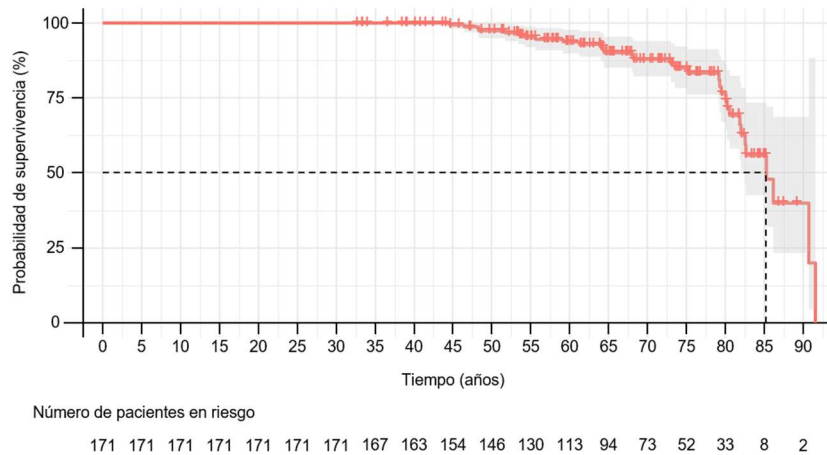
Respecto a otros parámetros ecocardiográficos, el 12,8 % de los casos tenían FEVI  $< 50$  %. En cuanto a la presencia de otras valvulopatías, en ningún paciente existía estenosis mitral asociada. En el 61,8 % de los casos no había tampoco insuficiencia mitral, siendo ésta leve en el 30,9 % de los casos. El 74,5 % no tenía insuficiencia tricúspide, y en aquellos que la presentaban, ninguno era en grado grave. El 24,8 % de los casos no tenían aumento de grosor de las paredes ventriculares, el 23 % era leve (hasta 13 mm), en el 36,4 % era moderada y en el 15,8 % era en grado elevado (más de 16 mm de grosor parietal).

## 2.1. Evolución clínica y pronóstico a largo plazo

La supervivencia global de los pacientes con VAB desde el nacimiento se muestra en la Figura 28. Se observa como la aparición de complicaciones que comprometen la vida del individuo comienza a aparecer a partir de la quinta década de la vida. De hecho,



a los 25 años de edad el 100 % (IC 95 % = 100-100) están vivos, a los 50 años es el 97,4 % (IC 95 % = 94,9-99,9), y a los 75 años el 84,9 % (IC 95 % = 78,2-92,2). La mediana de supervivencia de la serie es 85 años.



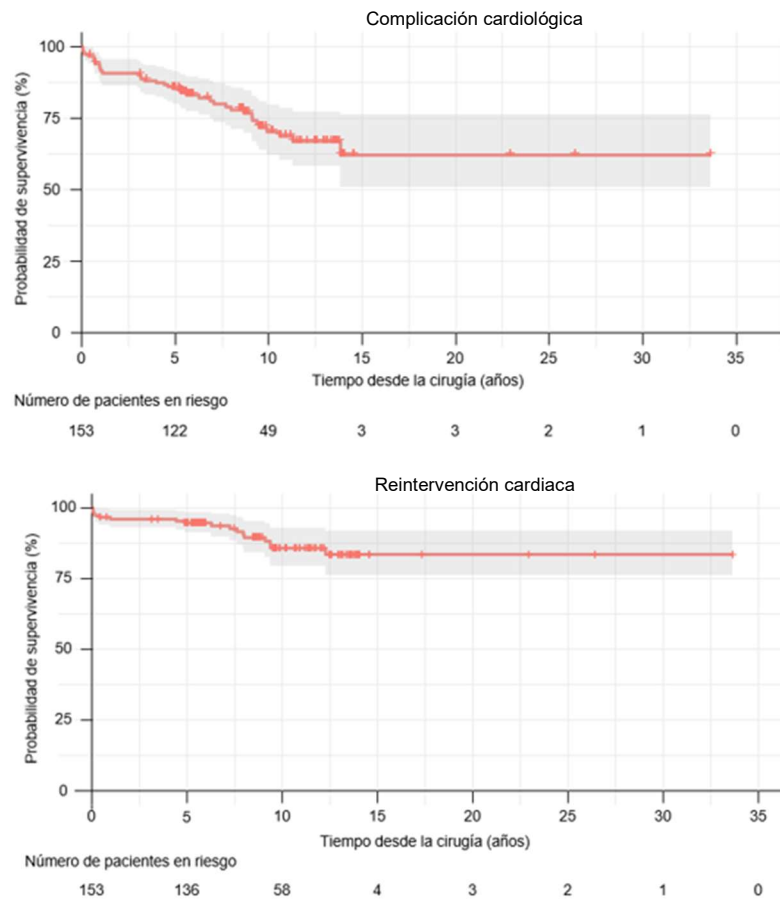
**Figura 28.** Supervivencia global de los pacientes con válvula aórtica bicúspide desde su nacimiento, representada mediante una gráfica de Kaplan-Meier. En gris se muestra el intervalo de confianza al 95 %.

Aquellos pacientes intervenidos quirúrgicamente se siguieron una media de  $9,9 \pm 5,3$  años desde la cirugía. Durante el seguimiento se registraron 34 *exitus* (22 %), 22 de causa no cardiovascular y 12 de ellos de causa cardiovascular, uno de ellos en el momento periquirúrgico y otro en los 30 días siguientes a la cirugía. La mediana de edad de los individuos fallecidos por causa cardiovascular fue de 76 años [44 – 86]. La mediana de tiempo desde el diagnóstico de VAB al *exitus* por causa cardiovascular fue de 10,6 años [0,6 – 40,4], lo que refleja un periodo muy amplio de la vida sin el conocimiento de portar una válvula bicúspide y, por ende, una amplia fase asintomática. En total, de los 12 *exitus* cardiovasculares en el seguimiento, se registraron 11 fallecimientos relacionados directamente con VAB (7,1 % de los pacientes intervenidos previamente). No hubo *exitus* relacionados con VAB entre los pacientes no operados.

En el seguimiento, tras la primera cirugía cardíaca, 30 de los pacientes tuvieron al menos un ingreso en relación con alguna complicación o evento cardiológico mayor



(desarrollo de insuficiencia cardiaca, aparición de disección aórtica o dilatación progresiva de aorta ascendente que requiera nueva intervención, complicación protésica que requiera intervención y/o desarrollo de EI) asociado con VAB. La probabilidad de sufrir un evento cardiológico en los 10 años tras la cirugía fue del 29,6 %. De los pacientes intervenidos por cirugía cardiaca, precisaron reintervención en el seguimiento 17 casos, con un tiempo mediano desde la cirugía a la reintervención de 6,2 años [0,1 – 12,3]. La probabilidad de precisar una reintervención en los 10 años tras la primera cirugía es 14,2 % (Figura 29). Precisó una tercera intervención posterior el 2,6 % (4 casos).



**Figura 29.** Representación mediante gráficas de Kaplan-Meier de la probabilidad, tras la primera cirugía cardiaca, de no padecer una complicación cardiológica (gráfica superior) o de no sufrir la necesidad de una segunda intervención cardiaca (gráfica inferior). En gris se muestra el intervalo de confianza al 95 %.

En el seguimiento a largo plazo hubo 32 nuevos diagnósticos de fibrilación auricular, 29 pacientes tuvieron alguna complicación relacionada con el ritmo cardiaco



(otro tipo de taquiarritmia o bradiarritmia), 22 pacientes precisaron implante de un dispositivo de estimulación (marcapasos) o un desfibrilador automático implantable y 25 pacientes desarrollaron insuficiencia cardiaca.

Hubo 6 casos de EI protésica: 3 casos de EI precoz (a los 2 meses, 3 meses y 5 meses de la cirugía) y 3 casos de EI tardía (13 meses, 15 meses y 109 meses de la cirugía). De estos casos, 3 obligaron a reintervención y recambio protésico. Por otra parte, en 3 casos los pacientes fallecieron a consecuencia de la complicación (2 EI tardía y 1 EI precoz).

Hubo 3 casos de complicaciones relacionadas con aorta ascendente: una rotura de pared aórtica en paciente con dilatación de aorta y 2 pacientes con dilatación progresiva de un segmento aórtico (ya intervenidos previamente por disfunción valvular) que obligó a la reintervención quirúrgica.

### 3. Análisis genético de la población

#### 3.1. Asociación de un polimorfismo de *IL6* con dilatación de aorta ascendente en portadores de válvula aórtica bicúspide

Como se describió en la introducción, los pacientes con VAB tienen un mayor riesgo de desarrollar dilatación de la aorta ascendente en comparación con las personas con VAT. Sin embargo, la disfunción valvular significativa no explica la progresiva dilatación o una complicación aórtica desafortunada; en consecuencia, los mecanismos moleculares involucrados se encuentran en continua investigación, existiendo vías genéticas y vías asociadas a estrés hemodinámico de la pared arterial aórtica (91). Uno de los procesos involucrados en la aortopatía bicúspide es la inflamación. La citocina IL-6 se ha visto asociada con la degeneración de la matriz extracelular aórtica y las



dimensiones de su pared en modelos animales (230). En este sentido, empleamos una aproximación genética analizando el polimorfismo rs1800795, situado en la región promotora del gen *IL6*, que regula positivamente la transcripción del gen, en relación con la dilatación aórtica en nuestros pacientes.

Disponíamos de información acerca de las dimensiones de la aorta ascendente de 429 pacientes, de los cuales un 21,7 % presentaban dilatación según los criterios recogidos en el apartado de Población y Métodos. Sin embargo, este porcentaje es significativamente distinto según se trate de individuos con VAT o VAB (Tabla 6) así que se analizó la asociación con el polimorfismo rs1800795 por separado en ambos grupos. Se obtuvo el genotipo para 364 individuos, de los cuales 155 portaban VAB y 209 VAT. Las características de esta población se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Características de la población de acuerdo con la presencia o no de dilatación de aorta ascendente.

Característica	Válvula aórtica tricúspide N = 209			Válvula aórtica bicúspide N = 155		
	Control N = 200	Dilatación de aorta N = 9	p-valor	Control N = 84	Dilatación de aorta N = 71	p-valor
Edad, años (SD)	70,4 (9,7)	66,3 (15,8)	0,463	53,0 (16,1)	56,2 (13,3)	0,185
Sexo, hombres	55,0 %	88,9 %	0,045	72,6 %	85,9 %	0,044
Fumadores	36,0 %	22,2 %	0,398	36,9 %	47,9 %	0,167
Dislipemia	52,5 %	44,4 %	0,636	32,1 %	33,8 %	0,827
Hipertensión	69,5 %	55,6 %	0,377	32,1 %	45,1 %	0,099
Diabetes	31,0 %	-	0,046	15,5 %	8,5 %	0,184
Valvulopatía			0,251			0,204
Estenosis	58,5 %	33,3 %		65,5 %	50,7 %	
Insuficiencia	7,5 %	22,2 %		27,4 %	35,2 %	
Doble lesión	3,5 %	-		3,6 %	4,2 %	
Normal	30,5 %	44,4 %		3,6 %	9,9 %	

p-valor de la comparación entre los grupos Control y Dilatación de aorta ascendente dentro de cada tipo de válvula.

Las diferencias en la distribución de las frecuencias de los genotipos de rs1800795 no fueron estadísticamente significativas (Tabla 8). Sin embargo, se comprobó que el genotipo homocigoto para el alelo C fue significativamente menos frecuente en pacientes

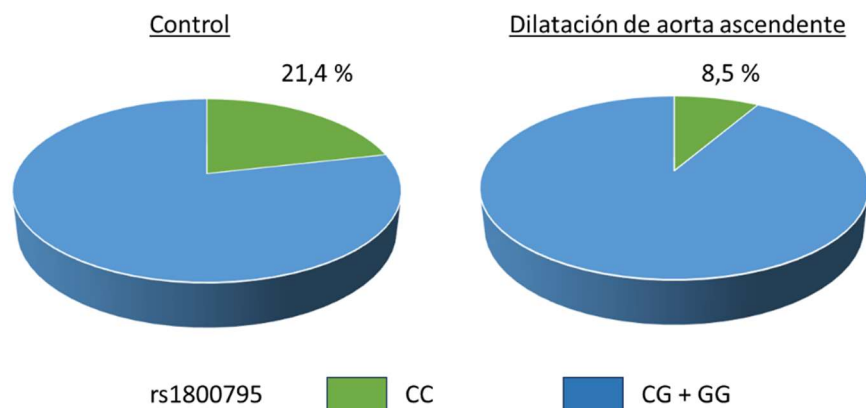


con dilatación de aorta y VAB (OR = 0,34; IC 95 % = 0,13 – 0,91; p = 0,026) (Figura 30).

**Tabla 8.** Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800795 del gen *IL6*.

IL6_rs1800795	Válvula aórtica tricúspide N = 209			Válvula aórtica bicúspide N = 155		
	Control N = 200	Dilatación de aorta N = 9	p- valor	Control N = 84	Dilatación de aorta N = 71	p- valor
CC	18 (9,0)	0 (0,0)	0,218	18 (21,4)	6 (8,5)	0,081
CG	98 (49,0)	7 (77,8)		33 (39,3)	31 (43,7)	
GG	84 (42,0)	2 (22,2)		33 (39,3)	34 (47,9)	

Las frecuencias se muestran como N (%). p-valor para la comparación de los 3 genotipos en cada tipo de válvula aórtica.



**Figura 30.** Distribución de genotipos del polimorfismo rs1800795 del gen *IL6* en controles y pacientes con dilatación de aorta ascendente, en individuos con válvula aórtica bicúspide.  $N_{\text{control}} = 84$ ;  $N_{\text{dilatación}} = 71$ .

Usando modelos de regresión logística multivariable, con variables de confusión como sexo, edad, HTA y valvulopatía, los pacientes con VAB portadores del genotipo CC seguían teniendo menor probabilidad de padecer dilatación de la aorta ascendente (OR = 0,30; IC 95 % = 0,10-0,82; p = 0,026) (Figura 31).



Características		N	OR (IC 95 %)	p-valor
<i>IL6</i> rs1800795	GG + GC	131	Referencia	
	CC	24	0,30 (0,10-0,82)	0,026
Edad		155	1,02 (1,00-1,05)	0,092
Sexo	Hombres	122	Referencia	
	Mujeres	33	0,48 (0,20-1,13)	0,101
Hipertensión	No	96	Referencia	
	Sí	59	1,42 (0,67-3,04)	0,362
Valvulopatía	Normal	10	Referencia	
	Doble lesión	6	0,23 (0,02-2,26)	0,208
	Estenosis aórtica	91	0,17 (0,03-0,76)	0,028
	Insuficiencia aórtica	48	0,35 (0,06-1,61)	0,199

**Figura 31.** Modelo de regresión logística multivariable para dilatación de aorta ascendente. OR: razón de probabilidades; IC: intervalo de confianza.

### 3.2. Asociación de polimorfismos con estenosis aórtica.

Para ampliar el estudio genético tuvimos en cuenta la valvulopatía más frecuente en nuestra población, que es la EAo. Además del polimorfismo rs1800795 en *IL6* descrito en el apartado previo, que era un gen candidato por la relación entre la inflamación y la EAo, identificamos en la literatura genes que hubieran sido asociados con EAo. Los polimorfismos replicados de manera más consistente en estudios previos habían sido los de *PALMD*, un gen que codifica para palmdelphina, y *LPA*, que codifica para apolipoproteína(a). Por ello, y teniendo en cuenta prioritariamente la morfología de la válvula aórtica, también se analizaron en nuestra población polimorfismos localizados en estos genes: rs6702619 en *PALMD* y rs10455872 en *LPA*. Para el análisis no se tuvieron en cuenta los pacientes con doble lesión y se unificaron en el grupo control los pacientes con IAo sin signos de calcificación y los controles con válvula normofuncionante, por no presentar ninguno de ellos CAVD. La estrategia para la obtención de los grupos de pacientes con el genotipo identificado se muestra en la Figura 32 y las características de





los 580 pacientes con el estudio del genotipo, agrupados según la presencia o ausencia de EAo, se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Características de los pacientes incluidos en el estudio genético según la presencia o ausencia de estenosis aórtica.

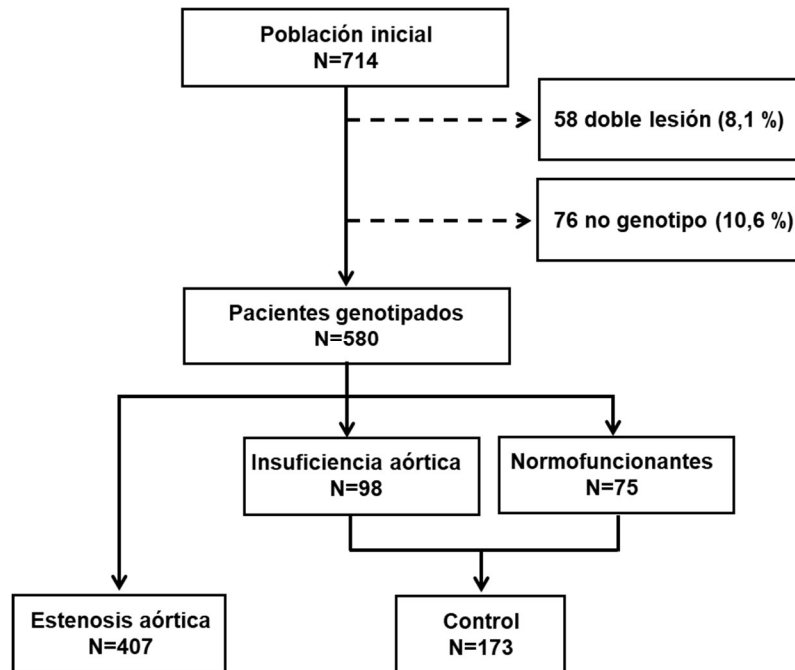
Característica	Control (N = 173)	Estenosis aórtica (N = 407)	p-valor
<b>Edad, años (Mediana [Q1-Q3])</b>	62,0 [52,0-72,0]	74,0 [66,0-79,0]	<0,001
<b>Sexo, n (%)</b>			0,585
Masculino	110 (63,6)	249 (61,2)	
Femenino	63 (36,4)	158 (38,8)	
<b>Morfología valvular aórtica, n (%)</b>			0,005
Válvula aórtica tricúspide	115 (66,5)	316 (77,6)	
Válvula aórtica bicúspide	58 (33,5)	91 (22,4)	
<b>Estado de tabaquismo, n (%)</b>			0,002
Tabaquismo activo	45 (26,0)	60 (14,7)	
Exfumador	23 (13,3)	87 (21,4)	
No fumador	105 (60,7)	260 (63,9)	
<b>Hipertensión arterial, n (%)</b>	93 (53,8)	276 (67,8)	0,001
<b>Dislipemia, n (%)</b>	65 (37,6)	229 (56,3)	<0,001
<b>Diabetes mellitus, n (%)</b>	31 (17,9)	117 (28,7)	0,006
<b>Insuficiencia, n (%)</b>	98 (56,6)	41 (10,1)	<0,001
<b>FGe, mL/min/1,73 m<sup>2</sup> <sup>a</sup></b>	72,9 (19,5)	69,1 (20,6)	0,232
<b>Enfermedad coronaria, n (%)<sup>b</sup></b>	9 (11,0)	83 (26,0)	0,004
<b>Ecocardiograma transtorácico</b>			
Gradiente medio, mmHg <sup>c</sup>	22,5 (16,8)	49,0 (12,3)	<0,001
Gradiente máximo, mmHg <sup>d</sup>	39,2 (26,0)	81,1 (19,8)	<0,001

Las variables cuantitativas se presentan como media (desviación estándar), a menos que se especifique otra forma. Las variables cualitativas se presentan como frecuencia (porcentaje). FGe: Tasa de filtrado glomerular estimada. <sup>a</sup>Datos disponibles para 337 pacientes; <sup>b</sup>Datos disponibles para 401 pacientes; <sup>c</sup>datos disponibles para 292 pacientes; <sup>d</sup>datos disponibles para 284 pacientes.

El grupo de pacientes con EAo la tenía mayoritariamente en grado grave (95 %). No hubo diferencias estadísticamente significativas en sexo o FGe entre los grupos, pero sí se manifiesta que el grupo control era más joven y la VAB y la IAo fueron relativamente más frecuentes en este grupo. El grupo de EAo tenía más pacientes con factores de riesgo cardiovasculares como HTA, dislipidemia o diabetes y enfermedad arterial coronaria que el grupo de control. De hecho, la presencia de más de un factor de riesgo cardiovascular



clásico, como HTA + dislipemia, continuaba siendo significativamente más frecuente en el grupo de EAo (42,4 frente a 28,7 %,  $p = 0,001$ ), al igual que en el caso de si analizamos aquellos que presenten las tres variables HTA + dislipemia + diabetes mellitus (15,9 frente a 9,6 %,  $p = 0,037$ ).



**Figura 32.** Diagrama del flujo de selección de pacientes para el estudio genético.

Las frecuencias se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg para los tres polimorfismos. La comparación de las frecuencias de genotipos y alelos, ajustadas por edad y sexo, arrojó diferencias significativas entre los grupos de casos y controles para el polimorfismo de *IL6* en la población total. Al estratificar por morfología de la válvula aórtica, fueron los polimorfismos de *PALMD* e *IL6* los que se asociaron con EAo pero en el grupo de VAT únicamente (Tabla 10).



**Tabla 10.** Asociación entre los polimorfismos y la estenosis aórtica según la morfología de la válvula aórtica.

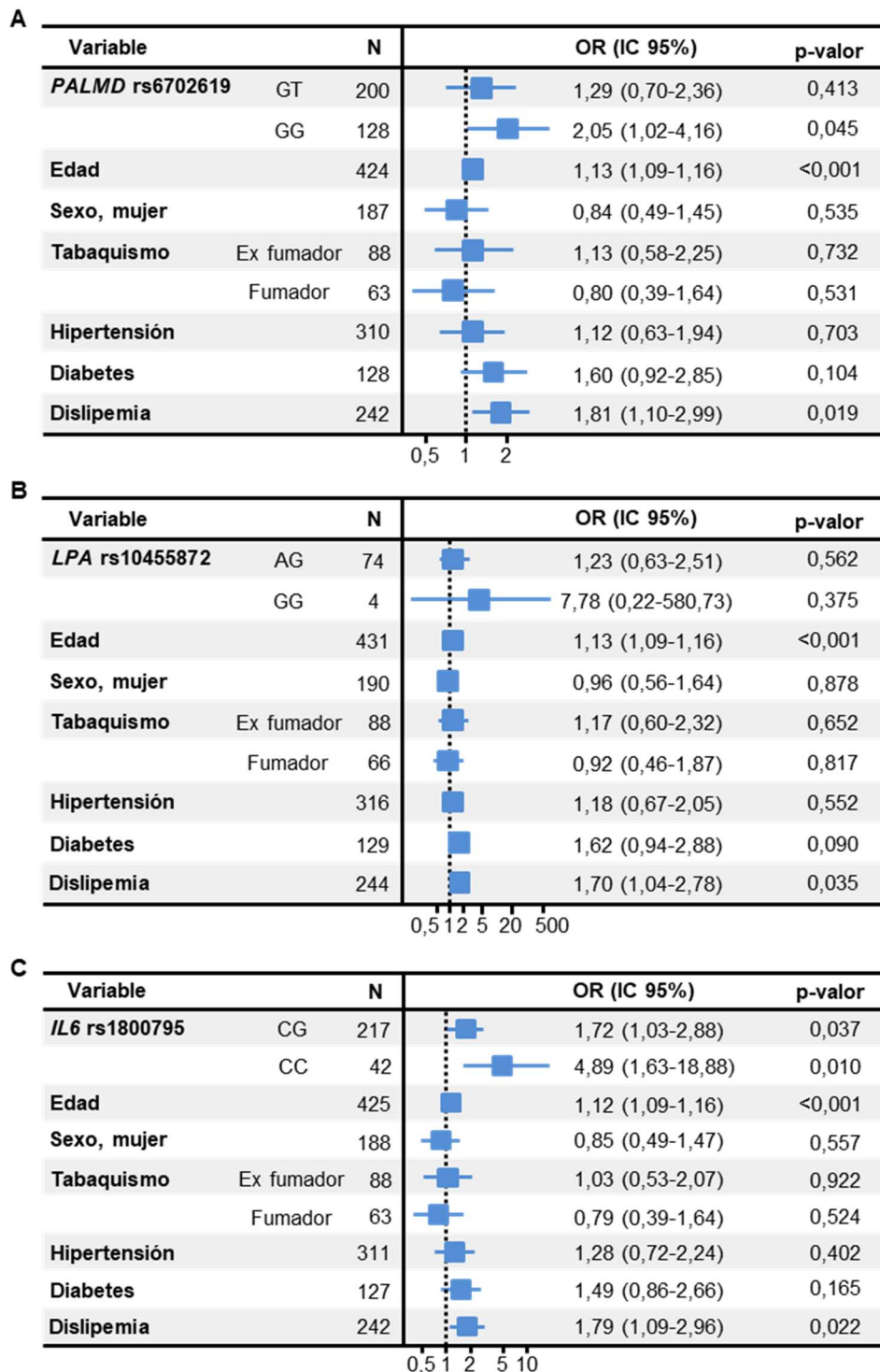
Polimorfismo	Genotipo (Alelo)	Todos N = 580		Válvula aórtica tricúspide N = 431		Válvula aórtica bicúspide N = 149	
		OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor
<i>PALMD</i> rs6702619	GT	1,34 (0,82–2,19)	0,243	1,37 (0,74–2,49)	0,311	1,57 (0,59–4,09)	0,359
	GG	1,58 (0,92–2,73)	0,097	1,99 (1,01–3,97)	0,049	1,05 (0,38–2,86)	0,927
	(G)	1,26 (0,96–1,65)	0,100	1,42 (1,01–2,00)	0,045	0,95 (0,58–1,56)	0,846
<i>LPA</i> rs10455872	AG	1,14 (0,67–2,01)	0,635	1,26 (0,65–2,53)	0,506	0,94 (0,32–3,02)	0,919
	GG	4,20 (0,55–88,82)	0,226	6,05 (0,23–319,2)	0,357	NA (0,00–NA)	0,988
	(G)	1,31 (0,80–2,22)	0,295	1,36 (0,74–2,64)	0,343	1,42 (0,54–4,13)	0,493
<i>IL6</i> rs1800795	CG	1,30 (0,87–1,95)	0,206	1,68 (1,02–2,78)	0,043	0,73 (0,34–1,55)	0,412
	CC	2,11 (1,07–4,40)	0,038	4,73 (1,61–17,90)	0,010	0,65 (0,24–1,81)	0,404
	(C)	1,37 (1,02–1,83)	0,035	1,72 (1,19–2,52)	0,005	0,77 (0,46–1,28)	0,309

Genotipos de referencia: TT para *PALMD*, AA para *LPA* y GG para *IL6*. “Alelo” indica alelo de riesgo. OR: razón de probabilidades; IC: intervalo de confianza. p-valores después del ajuste por edad y sexo.

Centrando el análisis en estos pacientes con VAT, confirmamos la asociación de estos dos polimorfismos con la EAO, independientemente de variables potencialmente confusoras como la edad y la dislipemia que también fueron significativas (Figura 33). El polimorfismo de *LPA* no estuvo asociado, pero el poder estadístico para detectar esta



asociación es limitado por el pequeño tamaño de nuestra muestra y la baja frecuencia del alelo minoritario (9%).



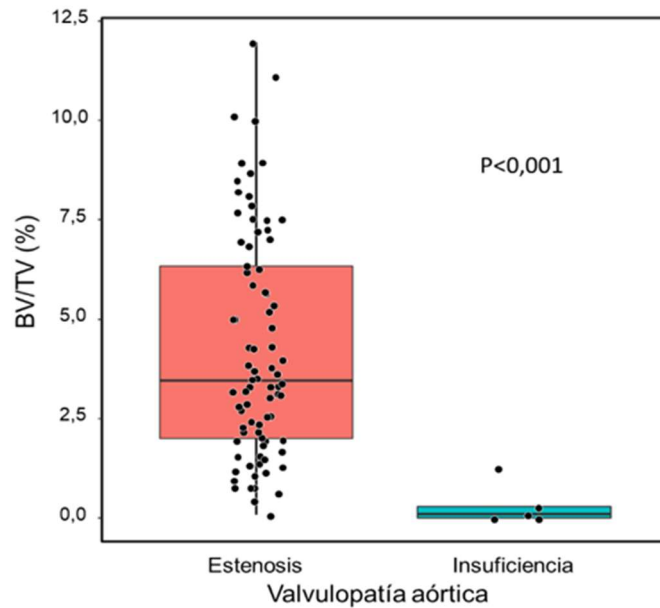
**Figura 33.** Diagramas *forest plot* que muestran los modelos de regresión logística multivariable para la asociación entre los genotipos de *PALMD* (A), *LPA* (B) e *IL6* (C) y la estenosis aórtica en pacientes con válvula aórtica tricúspide. Genotipos de referencia: TT para *PALMD*, AA para *LPA* y GG para *IL6*. OR: razón de probabilidades; IC: intervalo de confianza.



De acuerdo con el modelo de herencia, el polimorfismo de *PALMD* sigue un patrón recesivo: solo se observa una asociación significativa cuando el alelo poco frecuente está presente en homocigosis. Por el contrario, para el polimorfismo de *IL6* se puede aplicar un modelo aditivo, teniendo en cuenta el efecto (OR) creciente de CC en comparación con el genotipo CG (Figura 30). Sin embargo, también se puede considerar un modelo dominante puesto que en la EAo predominan los portadores del alelo minoritario, tanto con una sola copia del alelo poco frecuente (heterocigosis) como con la presencia de dos copias (homocigosis) (GC+CC vs. GG: OR [IC 95%] = 1,87 [1,14-3,09];  $p = 0,013$ , en el modelo completo ajustado).

### 3.3. Asociación de polimorfismos y calcio en válvula aórtica

Dado que la asociación de polimorfismos de *PALMD* e *IL6* era específica para la EAo en VAT, a continuación, analizamos si había una asociación entre los polimorfismos de estos genes y el contenido de calcio de la válvula. Para ello, 82 valvas de pacientes con VAT (77 de pacientes con EAo debida a CAVD y 5 de pacientes con IAo que se tomaron como controles) fueron analizadas por microCT. Como era de esperar, los niveles de calcio medidos como BV/TV fueron significativamente más altos en las válvulas estenóticas (mediana [rango intercuartílico]: 3,54 % [1,97-6,61] para válvula estenótica vs. 0,10 % [0,00-0,77] para válvula insuficiente,  $p < 0,001$ ) (Figura 34) (276).



**Figura 34.** Niveles de calcio medidos mediante microtomografía computarizada, agrupados según criterios diagnósticos de valvulopatía aórtica. BV/TV: volumen óseo/volumen de tejido (del inglés *Bone Volume/Tissue Volume*).

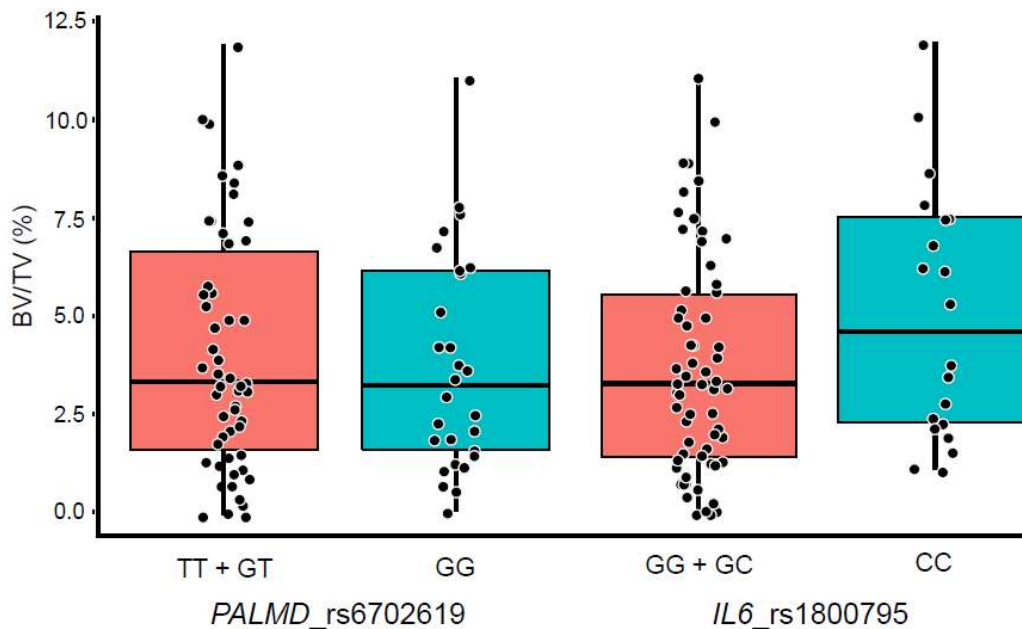
Sin embargo, en cuanto a la asociación de los polimorfismos con el grado de calcificación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de BV/TV entre los diferentes genotipos ( $p = 0,476$  y  $p = 0,197$ , para *PALMD* e *IL6*, respectivamente). Incluso comparando los niveles de BV/TV para homocigotos del alelo de riesgo (genotipo GG para *PALMD* y genotipo CC para *IL6*) con los niveles de los otros genotipos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 11) (Figura 35). Además, se constató un dato fisiopatológicamente razonable: la presencia de una correlación positiva entre los valores de BV/TV y el gradiente medio de presión aórtica, que es uno de los principales parámetros hemodinámicos recomendados para la evaluación clínica de la gravedad de la EAo (coeficiente de Pearson  $r = 0,47$ ;  $p < 0,001$ ).



**Tabla 11.** Asociación entre los polimorfismos *PALMD* e *IL6* y el contenido de calcio en la válvula aórtica medido por microtomografía computarizada.

Polimorfismo	Genotipo	BV/TV	p-valor
<i>PALMD</i> rs6702619	GG (N = 28)	3,28 % [1,59-6,26]	0,699
	GT+TT (N = 36+18)	3,37 % [1,56-6,99]	
<i>IL6</i> rs1800795	CC (N = 20)	4,59 % [2,22-7,53]	0,114
	CG+GG (N = 35+27)	3,27 % [1,38-5,68]	

BV/TV: volumen óseo/volumen de tejido (del inglés, *bone volume/tissue volume*), mediana [rango intercuartílico]. Genotipos de riesgo: GG para *PALMD* rs6702619 y CC para *IL6* rs1800795.



**Figura 35.** Niveles de la relación volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV) de los velos de válvula aórtica, medidos mediante microtomografía computarizada, según los genotipos de rs6702619 de *PALMD* y de rs1800795 de *IL6*.

### 3.4. Asociación de polimorfismos con la escala de Warren y Yong

Además de determinar el contenido en calcio de los velos aórticos mediante microCT como se vio en el apartado anterior, el grado de degeneración de la válvula se pudo analizar en los velos incluidos en parafina utilizando la escala de Warren y Yong.







de arterias coronarias en el subconjunto de 401 participantes (92 casos y 309 controles) para los que se disponía del dato de esta variable clínica (Tabla 9).

**Tabla 12.** Análisis de asociación entre polimorfismos y varios rasgos cardiovasculares.

Característica (N = 580)	<i>PALMD</i> rs6702619		<i>LPA</i> rs10455872		<i>IL6</i> rs1800795	
	Alelo de riesgo G		Alelo de riesgo G		Alelo de riesgo C	
	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor
<b>Válvula aórtica bicúspide</b>	0,82 (0,63-1,07)	0,156	0,72 (0,44-1,19)	0,237	1,00 (0,76-1,32)	1,000
<b>Insuficiencia aórtica</b>	0,91 (0,69-1,20)	0,533	0,9 (0,56-1,47)	0,809	1,03 (0,77-1,36)	0,886
<b>Hipertensión arterial</b>	0,98 (0,77-1,25)	0,902	0,68 (0,45-1,03)	0,069	1,29 (1,01-1,66)	0,048
<b>Dislipemia</b>	0,96 (0,76-1,21)	0,767	1,40 (0,93-2,11)	0,122	0,98 (0,77-1,24)	0,902
<b>Diabetes mellitus</b>	0,90 (0,69-1,17)	0,455	0,98 (0,62-1,57)	1,000	0,89 (0,67-1,17)	0,397
<b>Enfermedad arterial coronaria<sup>a</sup></b>	1,12 (0,80-1,55)	0,553	2,28 (1,38-3,78)	0,002	1,47 (1,03-2,09)	0,037

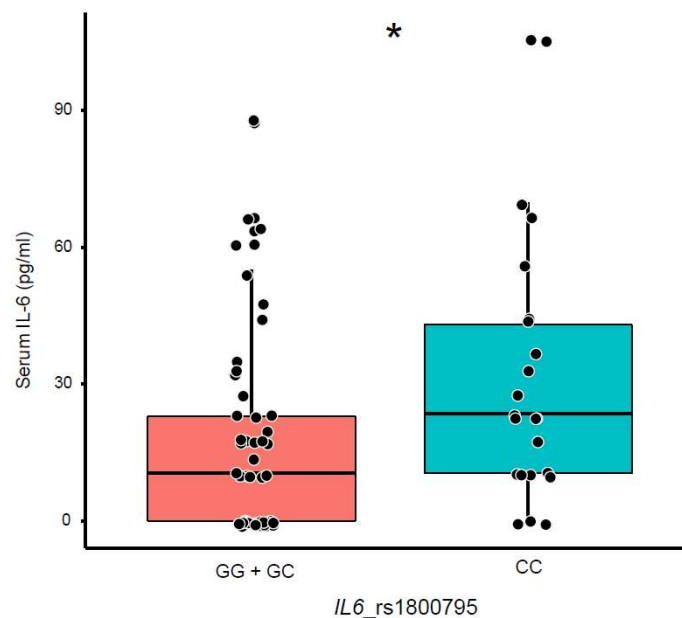
OR: razón de probabilidades; IC: intervalo de confianza. <sup>a</sup> Datos disponibles para 401 pacientes.

#### 4. Análisis de niveles circulantes de IL-6 y su relación con el genotipo

La asociación de los polimorfismos de los dos genes *PALMD* e *IL6* con la EAO podría ser debida a un efecto sobre los niveles circulantes de las respectivas proteínas, lo que permitiría utilizarlas como biomarcadores. Hasta donde sabemos, *PALMD* no se libera a la circulación (277). Por el contrario, investigamos si el polimorfismo de *IL6* podría tener un efecto sobre los niveles circulantes de la citocina en nuestros pacientes, como se describe para la enfermedad arterial coronaria (278), midiendo los niveles de IL-6 en 76 muestras de suero seleccionadas según el genotipo rs1800795. Así, el genotipo CC se asoció con niveles séricos más altos de IL-6 (23,5 pg/mL frente a 10,5 pg/mL del



resto de genotipos;  $p = 0,006$ ) (Figura 37), incluso después de ajustar por edad, HTA y enfermedad arterial coronaria (estimación: 13,92; IC del 95 %: 2,16–25,68;  $p = 0,021$ ). Los niveles de IL-6 no fueron diferentes entre los pacientes con EAo e IAo (10,5 frente a 14,4 pg/mL, respectivamente;  $p = 0,864$ ). Además, los niveles de IL-6 se correlacionaron positivamente con los niveles del marcador inflamatorio proteína C reactiva (PCR; coeficiente de Pearson  $r = 0,83$ ,  $p < 0,001$ ).



**Figura 37.** Niveles circulantes de interleucina-6 (IL-6) según genotipos del polimorfismo rs1800795 del gen *IL6*. \*  $p = 0,006$ .

## 5. Caracterización del estado inflamatorio e inmunológico de pacientes con estenosis aórtica, mediante el estudio de biomarcadores en suero.

Se analizaron distintos marcadores inflamatorios en muestras de suero de 86 pacientes, cuyas características principales se recogen en la Tabla 13.

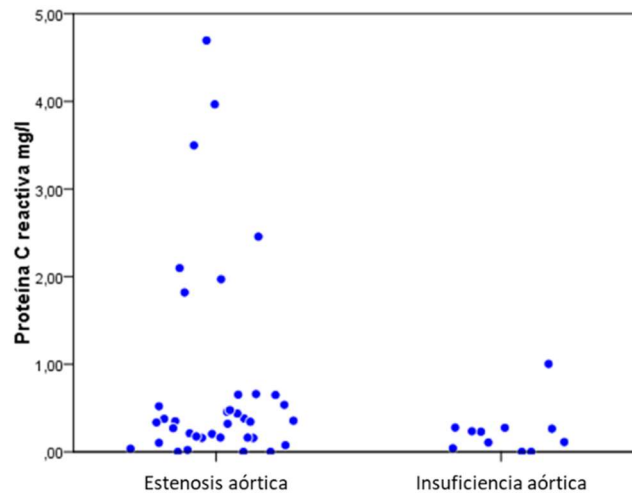


**Tabla 13.** Principales características demográficas y clínicas de la cohorte de pacientes en los que se analizaron los niveles de marcadores inflamatorios.

<b>VARIABLE</b>	<b>COHORTE N = 86</b>
<b>Edad, años</b>	75 [13]
<b>Sexo, hombres</b>	57 (66 %)
<b>Válvula aórtica bicúspide</b>	6 (7 %)
<b>Valvulopatía</b>	
Estenosis aórtica	55 (64 %)
Insuficiencia aórtica	31 (36 %)
<b>Gradiente medio, mmHg</b>	44,8 (20,2)
<b>Gradiente máximo, mmHg</b>	73,9 (20,2)
<b>Tabaquismo</b>	
Fumador	7 (8,1 %)
Exfumador	26 (30,2 %)
No fumador	53 (61,6 %)
<b>Hipertensión arterial</b>	58 (67,4 %)
<b>Dislipemia</b>	47 (54,7 %)
<b>Diabetes mellitus</b>	26 (30,2 %)
<b>Enfermedad coronaria</b>	23 (26,7 %)
<b>Enfermedad renal crónica</b>	31 (36 %)

Las variables cuantitativas se muestran como media (desviación estándar) excepto Edad como mediana [rango intercuartílico]. Las variables categóricas se muestran como N (%).

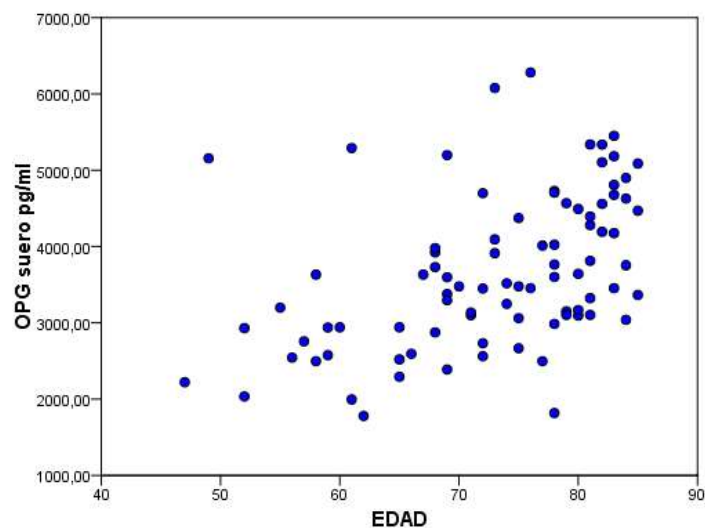
Por una parte, se analizaron los niveles de un marcador clásico como es la proteína C reactiva, encontrando que los niveles fueron diferentes entre el grupo de EAo y el de IAo, aunque esta diferencia se encontró en el borde de la significación estadística quizá debido a la gran dispersión de los valores en el grupo de EAo (mediana [rango intercuartílico] 0,30 [0,07-0,55] mg/L vs. 0,10 [0,05-0,30] mg/L, respectivamente,  $p = 0,050$ ) (Figura 38). Solo 5 pacientes (todos con EAo) presentaron niveles de proteína C reactiva  $> 2$  mg/L, el límite considerado de riesgo cardiovascular (279).



**Figura 38.** Niveles de proteína C reactiva en los pacientes según el diagnóstico de estenosis o insuficiencia aórtica.

Por otra parte, se analizaron otras 4 moléculas: BMP-2, IL-1 $\beta$ , OPG e IL-8. Las dos primeras estuvieron por debajo del límite de detección en nuestras muestras, por lo que no se pudieron hacer comparaciones.

En cuanto a OPG, se vio que correlacionaba significativamente con la edad (coeficiente de Pearson  $r = 0,45$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 39). Sin embargo, los niveles no fueron diferentes entre EAo e IAo ni ajustando por edad (mediana [rango intercuartílico] = 3,5 [3,1-4,6] ng/ml y 3,4 [2,7-4,2] ng/mL, respectivamente;  $p = 0,477$ ).



**Figura 39.** Niveles de osteoprotegerina (OPG) en suero según la edad de los pacientes.



Por otra parte, los niveles de IL-8 en suero tampoco fueron diferentes entre EAo e IAo (mediana [rango intercuartílico] = 57,7 [51,1-72,8] ng/ml y 59,3 [43,9-78,3] ng/mL, respectivamente;  $p = 0,849$ ).

## 6. Análisis y caracterización del estado inflamatorio e inmunológico de los pacientes mediante el estudio de células circulantes.

En el contexto del estado inmunológico e inflamatorio asociado a la enfermedad, se trató de identificar un patrón característico de degeneración valvular en pacientes con VAB. Para ello, se seleccionaron prospectivamente 3 grupos de pacientes: EAo-VAB, EAo-VAT y controles con VAT normofuncionante. Sus características se resumen en la Tabla 14. No hubo diferencias entre los grupos en cuanto a edad o factores de riesgo cardiovascular ni tampoco respecto a la presencia de enfermedad renal crónica. Se identificaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de dilatación de aorta, estando presente entre los pacientes con VAB y no en los otros grupos. Asimismo, la presencia de enfermedad coronaria fue significativamente mayor en el grupo control, dado que se tomaron como controles pacientes cardiopatas sin valvulopatía asociada. Las células mononucleares obtenidas en las muestras de sangre tomadas precirugía de estos pacientes se analizaron mediante citometría de flujo utilizando distintos marcadores inmunológicos.



**Tabla 14.** Características clínicas y ecocardiográficas de los pacientes seleccionados para el estudio inmunológico.

	<b>Control</b>	<b>EAo-VAT</b>	<b>EAo-VAB</b>	<b>p-valor</b>
	<b>N = 6</b>	<b>N = 7</b>	<b>N = 7</b>	
<b>Edad, años</b>	67,2 (2,2)	69,3 (5,7)	66,7 (7,2)	0,665
<b>Sexo, hombres</b>	3 (50)	5 (71)	4 (57)	0,721
<b>Índice de masa corporal</b>	29,3 (1,2)	29,1 (5,2)	24,7 (1,9)	0,032
<b>Hipertensión arterial</b>	3 (50)	4 (57)	2 (29)	0,538
<b>Dislipemia</b>	4 (67)	3 (43)	2 (29)	0,384
<b>Diabetes mellitus II</b>	2 (33)	2 (29)	0 (0)	0,254
<b>Fumador</b>	4 (67)	5 (71)	3 (43)	0,607
<b>Enfermedad renal crónica</b>	0 (0)	1 (14)	0 (0)	0,376
<b>Enfermedad coronaria</b>	6 (100)	1 (14)	1 (14)	0,002
<b>Fibrilación auricular</b>	1 (17)	2 (29)	0 (0)	0,323
<b>Insuficiencia aórtica</b>	0 (0)	4 (57)	3 (43)	0,130
<b>Insuficiencia mitral</b>	1 (17)	5 (71)	3 (43)	0,343
<b>Insuficiencia tricúspide</b>	0 (0)	5 (71)	1 (14)	0,048
<b>FEVI, %</b>	57,8 (8,5)	60,3 (9,7)	56,9 (18,6)	0,886
<b>Diámetro aorta, mm</b>			43,8 (3,8)	
<b>Diámetro TSVI, cm</b>		2,16 (0,12)	2,12 (0,23)	0,730
<b>Diámetro raíz aorta, cm</b>	3,2 (0,3)	3,4 (0,2)	3,5 (0,5)	0,239
<b>Velocidad flujo máximo, m/s</b>	1,4 (0,2)	4,4 (0,2)	4,5 (0,7)	<0,001
<b>Gradiente máximo, mmHg</b>	9,0 (2,6)	76,6 (9,3)	85,6 (24,6)	<0,001
<b>Gradiente medio, mmHg</b>		46,3 (7,4)	50,9 (12,8)	0,429
<b>Área, cm<sup>2</sup></b>		0,83 (0,18)	0,77 (0,29)	0,674
<b>Área índice, cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup></b>		0,47 (0,05)	0,40 (0,12)	0,272
<b>Relación ITV</b>		0,22 (0,03)	0,21 (0,05)	0,796
<b>Dilatación aorta ascendente</b>	0 (0)	0 (0)	6 (86)	<0,001
<b>Estatinas</b>	6 (100)	5 (71)	6 (86)	0,355
<b>Antiagregantes</b>	6 (100)	2 (29)	3 (43)	0,026
<b>Anticoagulación</b>	0 (0)	3 (43)	0 (0)	0,038

Las variables continuas se muestran como media (desviación estándar). Las variables categóricas se muestran como N (%). EAo: estenosis aórtica; VAT: válvula aórtica tricúspide; VAB: válvula aórtica bicúspide; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; TSVI: tracto de salida del ventrículo izquierdo; ITV: integral velocidad-tiempo.

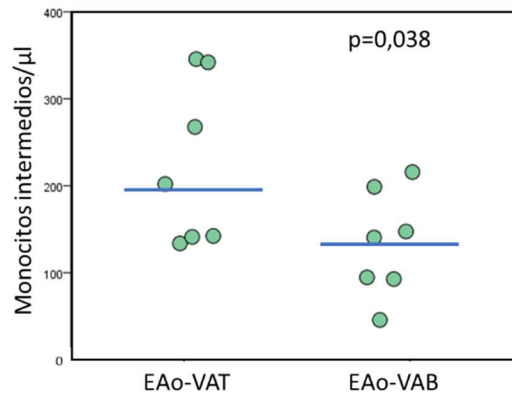
## 6.1. Análisis de monocitos

La diferencia en el recuento absoluto de monocitos intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) entre pacientes EAo-VAT y pacientes EAo-VAB fue estadísticamente significativa, con



valores más bajos en estos últimos (mediana [rango intercuartílico] 133 [110] vs. 196 [187];  $p = 0,038$ ) (Figura 40).

Las otras subpoblaciones de monocitos (clásicos y no clásicos) no mostraron diferencias significativas entre ningún grupo de pacientes (Tabla 15).



**Figura 40.** Niveles de monocitos intermedios en pacientes con estenosis aórtica, según la morfología de su válvula. La barra horizontal representa la mediana. EAo VAT: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica tricúspide; EAo VAB: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica bicúspide.

**Tabla 15.** Proporción y frecuencia de las distintas subpoblaciones de monocitos circulantes en los distintos grupos de pacientes.

		CONTROL N = 6		EAo VAT N = 7		EAo VAB N = 7	
MONOCITOS		Mediana	RIC	Mediana	RIC	Mediana	RIC
<b>Clásicos</b>	% leucocitos	64,6	15,6	57,0	19,7	65,8	23,8
	células/μl	4358	2701	6236	4443	3878	2537
<b>Intermedios</b>	% leucocitos	2,7	1,6	2,6	1,5	1,9	1,0
	células/μl	182	143	196	187	133	110
<b>No clásicos</b>	% leucocitos	6,3	6,9	4,6	8,2	7,1	5,0
	células/μl	558	288	376	400	631	393

EAo VAT: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica tricúspide; EAo VAB: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica bicúspide. RIC: Rango intercuartílico



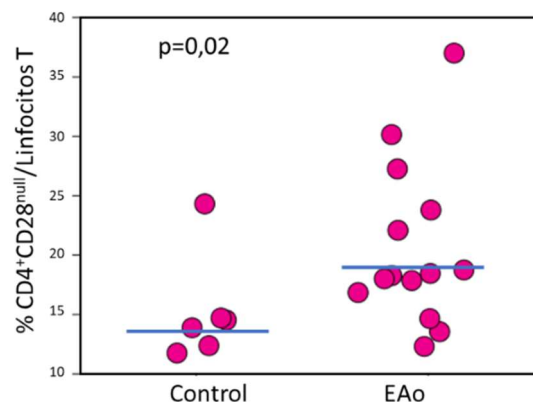
## 6.2. Análisis de linfocitos

La proporción de linfocitos T colaboradores (Th) inmunosenescentes ( $CD4^+CD28^{\text{null}}$ ) respecto al número total de linfocitos T fue diferente en los tres grupos de pacientes (Kruskal-Wallis  $p = 0,037$ ; Tabla 16). Al analizar más en detalle las diferencias, estas eran debidas a la patología valvular (EAo frente a válvula sana: mediana [rango intercuartílico] 19,0 % [9,6] vs. 13,6 % [4,7];  $p = 0,020$ ) (Figura 41), sin diferencias entre VAT y VAB (Tabla 17,  $p = 0,938$ ).

**Tabla 16.** Porcentajes de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes ( $CD4^+CD28^{\text{null}}$ ) respecto al número total de linfocitos T según el grupo de pacientes.

PACIENTES	% $CD4^+CD28^{\text{null}}$		
	N	Mediana	Rango intercuartílico
<b>Control</b>	6	13,6	4,7
<b>EAo VAT</b>	7	19,1	9,0
<b>EAo VAB</b>	7	17,9	6,3

EAo VAT: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica tricúspide; EAo VAB: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica bicúspide.



**Figura 41.** Porcentaje de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes ( $CD3^+CD4^+CD28^{\text{null}}$ ) respecto al número total de linfocitos T en pacientes con válvula aórtica sana frente a estenosis aórtica. La barra horizontal representa la mediana.





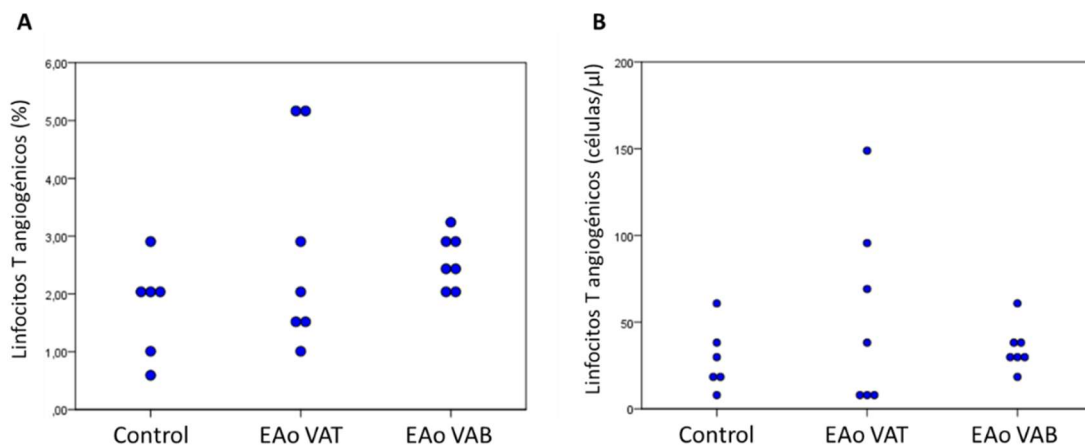
**Tabla 17.** Porcentajes de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes ( $CD3^+CD4^+CD28^{null}$ ) respecto al número total de linfocitos T según la morfología de la válvula.

PACIENTES	% $CD3^+CD4^+CD28^{null}$		
	N	Mediana	Rango intercuartílico
<b>VAT</b>	13	19,0	10,6
<b>VAB</b>	7	17,9	6,3

VAT: pacientes con válvula aórtica tricúspide; VAB: pacientes con válvula aórtica bicúspide.

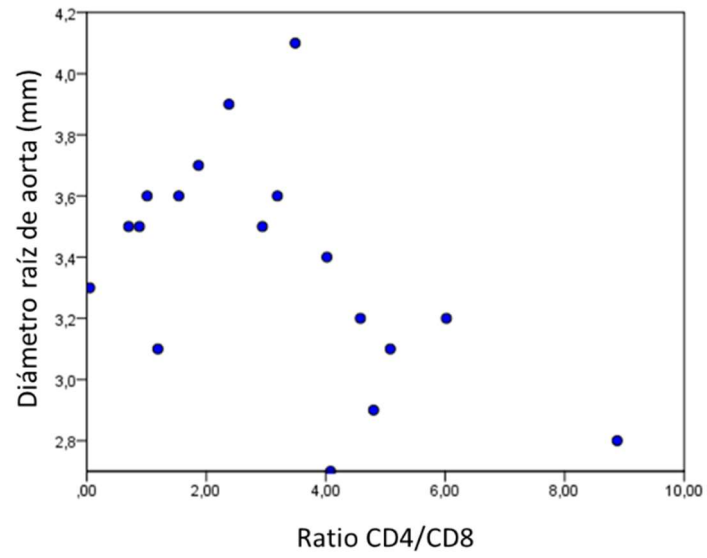
Además, la proporción de estas células Th inmunosenescentes se correlacionó significativamente con la edad (coeficiente de Pearson  $r = 0,53$ ;  $p = 0,017$ ).

A pesar de que en las válvulas calcificadas se produce angiogénesis, no detectamos diferencias significativas ni en el porcentaje ni en el número absoluto de linfocitos T angiogénicos (Tang) ( $CD3^+CD31^+CD184^+$ ) (Figura 42).



**Figura 42.** Linfocitos T angiogénicos ( $CD3^+CD31^+CD184^+$ ) según el grupo de pacientes. A) Porcentaje respecto al número de linfocitos T. B) Número de linfocitos por microlitro de sangre. EAo VAT: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica tricúspide; EAo VAB: pacientes con estenosis aórtica y válvula aórtica bicúspide.

Además, encontramos una correlación inversa entre diámetro de la raíz de aorta y la ratio  $CD4/CD8$  (coeficiente de Pearson  $r = -0,51$ ;  $p = 0,03$ ), lo que sugiere una relación entre dilatación aórtica y senescencia (Figura 43).



**Figura 43.** Correlación entre el diámetro de la raíz de aorta y la ratio CD4/CD8.

## **Discusión**

---





La VAB es considerada la cardiopatía congénita más frecuente en la población, y supone una enfermedad compleja y heterogénea. Posee una alta dispersión interindividual en su forma de presentación, con un espectro que puede ir desde un hallazgo incidental permaneciendo como anomalía subclínica a lo largo de la vida en su extremo más benigno hasta llegar a ser origen de una disfunción valvular grave que pueda condicionar el pronóstico vital. Los datos clínicos y pronósticos sobre la valvulopatía y la historia natural de VAB son limitados. En los últimos años se ha incrementado de forma notable la investigación en este campo para intentar comprenderla mejor. Se han conseguido avances en su caracterización clínica y genética, a la vez que se ha tratado de arrojar luz sobre su patogenia. Fruto de este interés científico surge el presente estudio que recoge una amplia cohorte de pacientes con VAB y VAT de un hospital terciario español.

Se realizó un análisis específico observacional de 171 pacientes con VAB, que aporta datos sobre las características, manejo en vida real y seguimiento a largo plazo de esta cohorte. Aunque es una entidad muy conocida, existen pocos estudios que aborden su historia natural. En concreto, los principales, con tres grandes cohortes, son: Michelena *et al.* (84), que incluyó 212 pacientes con mínima disfunción valvular y asintomáticos; Tzemos *et al.* (85), que incluyó 642 con VAB de cualquier subtipo y que presentaban disfunción valvular en grado variable; y otro posterior de Masri *et al.* (95) con seguimiento y caracterización de 1890 casos consecutivos con VAB de cualquier subtipo y que también presentaban disfunción valvular en grado variable. En el año 2023 se publicaron dos nuevas series sobre seguimiento a largo plazo y análisis de morbimortalidad de pacientes con VAB; uno por el grupo de trabajo de Michelena (280) sobre 652 pacientes norteamericanos, y otro de una cohorte austriaca de 581 casos (281).



Pese a ser una condición congénita, suele diagnosticarse en la edad adulta. De hecho, la edad media de inclusión en los estudios previos fue 29-37 años y 50 años en el de Masri *et al.* Dado que no se realiza despistaje poblacional y, salvo la aparición de disfunción valvular, cursa de forma asintomática, el diagnóstico en muchos casos es tardío. De hecho, en el estudio de Michelena *et al.* la mitad de los pacientes referidos a la inclusión se rechazaron ya que en el momento del diagnóstico ya presentaban disfunción valvular avanzada (84). En nuestro estudio se registró el momento diagnóstico de VAB, con una edad media de  $40,5 \pm 19,5$  años; y entre los pacientes que precisaron cirugía cardiaca, la mediana de tiempo entre el diagnóstico de VAB y el momento quirúrgico fue menor a 5 años, lo que confirma este diagnóstico en una fase avanzada de la entidad. En esta línea, existen pocos datos en la literatura del motivo de derivación para estudio cardiológico de los pacientes. En nuestra serie, más de la mitad de los casos se derivaron a estudio cardiológico por soplo en la auscultación, de forma similar a la serie de Yang *et al.* (280), lo que sugiere la presencia ya de algún grado de disfunción valvular. Otro tercio fue derivado por disnea o dolor torácico, lo que también apunta hacia la presencia de algún grado de cardiopatía subyacente. En los individuos jóvenes diagnosticados, aún sin disfunción valvular y asintomáticos, se aconseja un seguimiento médico periódico dada la posibilidad de aparición de eventos cardiacos y alteraciones en el funcionamiento valvular, como demostró el estudio de Aschauer *et al.* (281).

Dado que son pacientes más jóvenes, los pacientes con VAB asocian un menor número de comorbilidades, hecho que se refleja en nuestros datos al igual que sucede en otros estudios (84) (85) (95) (280). El principal factor de riesgo cardiovascular asociado fue la HTA, apareciendo una prevalencia muy baja de otras enfermedades como accidente cerebrovascular, diabetes mellitus, enfermedad coronaria, EPOC, etc. Además, de



acuerdo con otros datos epidemiológicos publicados, encontramos que prácticamente 4 de cada 5 casos eran varones (75).

En el estudio sobre la historia natural, Michelena *et al.*, realizaban un seguimiento medio de 15 años a 212 portadores de VAB sin datos de degeneración valvular al diagnóstico (84). La supervivencia a 10 años fue del  $97 \pm 1$  %, pero casi la mitad de los pacientes (42 %) tuvo un evento médico o quirúrgico en el seguimiento, demostrándose la morbilidad ligada a la entidad. En el tiempo, 38 pacientes (18 %) precisaron cirugía de recambio valvular aórtico, de los cuales en 26 fue cirugía por EAo grave. La edad media al momento de la cirugía fue de  $49 \pm 20$  años. El tiempo medio desde el diagnóstico a la intervención fue de  $11 \pm 6$  años. De forma similar a otras series, la principal morbilidad que lleva a la necesidad de cirugía en nuestra serie es la disfunción valvular (88 % de los intervenidos) (280) (281). Asimismo, también se reproduce que la CAVD (con su consecuente EAo) es la causa más frecuente de cirugía (95) (118), aconteciendo a una edad media precoz, entre la quinta y sexta décadas de la vida, también congruente en nuestra serie y similar a otras cohortes publicadas (282) (283). Dado que la principal morbilidad proviene de la disfunción valvular, la investigación debe esforzarse en buscar terapias médicas para prevenir o detener la progresión de EAo. Los grandes trabajos sobre pronóstico a largo plazo de pacientes con recambio valvular aórtico quirúrgico incluyen pacientes con EAo sin especificar el subtipo valvular, no siendo la VAB un criterio de exclusión, por lo que no se pueden extrapolar conclusiones de estos al conjunto de pacientes con VAB y disfunción valvular (284) (285). En estos trabajos se señala como los pacientes sometidos a reemplazo quirúrgico de la válvula aórtica tienen una esperanza de vida más corta que la población general. No obstante, la esperanza de vida de personas con VAB asintomática identificados en la comunidad es excelente y similar a la de la población general (84). En años recientes hay varias publicaciones que comparan los



resultados de TAVI en pacientes con VAB y EAo frente a VAT, pero existe una importante laguna de conocimiento en seguimiento de VAB a partir del recambio valvular aórtico y prácticamente hasta 2020 no hay estudios, quedando el pronóstico de este grupo de pacientes por determinar. El principal estudio existente previo a la década actual es el de McKellar *et al.*, que analizó una cohorte de 1286 pacientes con VAB sometidos a recambio valvular, sin cirugía de aorta torácica, entre 1960 y 1995 en la Clínica Mayo, EE. UU. (118). Dado que incluyó pacientes intervenidos hace seis décadas, los datos sobre pronóstico pueden no ser extrapolables a la práctica actual, de hecho, registraron una tasa de mortalidad perioperatoria no desdeñable del 3 %, siendo las actuales mucho menores. En la era actual, uno de los principales estudios realizados es el de Holmgren *et al.* (283), registro sueco de cirugía cardíaca, donde se realizó un seguimiento de 4970 pacientes (1131 bicúspides) que realizaban su primer recambio valvular aórtico, con o sin cirugía de revascularización coronaria asociada, durante un periodo mediano de 4,7 años. En este estudio se comprobó como los pacientes con VAB presentaban mejor pronóstico, con una supervivencia similar a la población general, existiendo diferencias respecto a VAT que presentó peores resultados, encontrando impacto negativo ante la presencia de factores de riesgo como diabetes, enfermedad renal, EPOC o insuficiencia cardíaca. Probablemente la mayor edad (75 vs. 63 años de media) y la mayor prevalencia de factores de riesgo y comorbilidades asociados en pacientes VAT sean motivo de la diferencia encontrada en supervivencia a largo plazo. En la otra gran serie de casos publicada de seguimiento postquirúrgico en VAB, Glaser *et al.* analizaron 865 casos con un periodo de seguimiento medio de 6,3 años. La cohorte presenta una edad media de 60 años en el momento quirúrgico, que fue electivo. Concluyen que existe un pronóstico excelente, siendo similar al de la población general (282). En nuestra serie, el seguimiento a largo plazo fue durante una media de  $9,9 \pm 5,3$  años de los pacientes con VAB





intervenidos quirúrgicamente, superior a estudios previos, aunque sin datos sobre seguimiento de pacientes con VAT intervenidos. En el seguimiento, el 7,1 % de los casos falleció de causa cardiovascular relacionada con VAB, porcentaje ligeramente inferior al estudio de Glaser *et al.* donde la tasa de *exitus* fue un 10,9 % de los casos (282). La mediana de tiempo desde el diagnóstico de VAB al fallecimiento fue de 11,2 [0,6 – 40,4] años, con solo dos de los casos intervenidos fallecidos en los primeros 30 días (1,3 %), ambos cirugías urgentes.

Los datos en la literatura sobre eventos fuera de la mortalidad en el seguimiento eran escasos hasta 2023. En un reciente estudio de una serie de 581 pacientes austriacos con VAB, Aschauer *et al.* registran una mortalidad baja a 10 años, sin embargo, evalúan la morbilidad, siendo ésta sustancial. El 27% de los pacientes experimentan un evento adverso dentro de los 5 primeros años de seguimiento (281). Yang *et al.*, también en 2023, demuestran como la carga total acumulada de morbilidad a lo largo de la vida (desde el nacimiento hasta los 90 años) es elevada (86 %), aunque la supervivencia de los pacientes fue similar a la de la población general de la misma edad y sexo (280). En nuestra serie, la morbilidad también fue elevada en el seguimiento postquirúrgico, ya que hasta 1 de cada 5 pacientes volvieron a precisar un ingreso con relación a complicaciones cardiológicas tras la cirugía, y un 11% precisó una reintervención, bien por EI o por disfunción protésica. En nuestra serie, al igual que en la de Yang *et al.*, la incidencia de EI a lo largo de la vida es mayor que la de disección aórtica (280). Por otro lado, dado que eran pacientes jóvenes, en más de dos tercios se implantó una prótesis mecánica, precisando anticoagulación oral crónica, con el riesgo acumulado a largo plazo de presentar posibles fenómenos hemorrágicos o trombóticos. Esto denota como, a pesar de que el pronóstico global de los pacientes gracias a los tratamientos actuales se ha demostrado similar al de la población general, los individuos con VAB están expuestos a



una alta morbilidad que perjudica su calidad de vida, no siendo una entidad intrascendente, sino sujeta a una gran repercusión sobre la salud de la persona.

En la esfera diagnóstica, el subtipo de VAB ha cobrado relevancia. Hasta la segunda década de este siglo existía poco conocimiento sobre la asociación del tipo morfológico de VAB con el grado de disfunción valvular, la asociación de aortopatía, la aparición de complicaciones, etc. Por ejemplo, Kong *et al.* demostraron como la presencia de rafe frente a la ausencia del mismo en VAB se relaciona con mayor prevalencia de disfunción valvular y necesidad de cirugía (88). Otro estudio de Evangelista *et al.* sobre una cohorte de 852 casos demostró como la fusión de las cúspides coronarias derecha e izquierda está relacionada con un mayor riesgo de dilatación de la aorta proximal, mientras que la fusión de las cúspides derechas y no coronarias preserva esta área. Además se observó como era mayor la prevalencia de válvulas normofuncionantes en aquellas sin rafe (103). Un reciente metaanálisis de este tema confirma la relación entre diferentes fenotipos de VAB y patrones de disfunción valvular (286). En nuestra cohorte, en una gran proporción de casos (59 %) el fenotipo de VAB resulta indeterminado, bien porque no se describe en los estudios de imagen cardiológicos o en los informes de quirófano o bien porque no se puede establecer debido a la extensa calcificación valvular, lo cual supone una limitación en los análisis. En años previos, como es durante el reclutamiento de los casos, existía, por supuesto, entre los profesionales sanitarios la conciencia de diferenciar entre VAB y VAT por las conocidas implicaciones que conlleva; sin embargo, no estaba tan presente la necesidad de aclarar el subtipo concreto (rafe o no, lugar del rafe, simetría o no, etc.) dado que no parecía condicionar la evolución. De hecho, otro de los grandes inconvenientes en las investigaciones con VAB para comparar poblaciones y estudios, ha sido el uso de diferente terminología para referirnos a los subtipos. Esto ha ocasionado pluralidad, confusiones y limitaciones y ha llevado a establecer una clasificación



internacional actualizada que permita el uso de la misma terminología a todas las partes (cardiólogos, cirujanos, investigadores, radiólogos, etc.) (3). Cada vez se demuestra más la importancia del subtipo concreto de VAB que presenta el paciente y, en la actualidad, no podemos dejar de ser exhaustivos en nuestros informes médicos. Tenemos que establecer con el mayor detalle posible las características de la VAB por las implicaciones que tiene para el paciente.

La VAB se reconoce cada vez más como un síndrome que tiene manifestaciones valvulares y aórticas (aortopatía bicúspide). Aunque la prevalencia es variable, en general, más del 40 % de los casos presentan dilatación de aorta asociada, en nuestra serie prácticamente la mitad de los casos (287). La heterogeneidad en el segmento aórtico afectado es conocida, pudiendo afectar a una o a varias zonas. En nuestra población, al igual que en la literatura (7), el segmento más afectado fue la aorta ascendente tubular, presentando dilatación en más del 80 % de los casos afectados de dilatación de aorta. Esto provoca morbilidad asociada y, de hecho, la presencia de dilatación de aorta es un predictor independiente de futuros eventos cardiacos en el seguimiento (281). Por ello, resulta esencial su evaluación desde edades precoces, incluida su valoración y medición adecuada desde la adolescencia (288). Aunque la medición correcta del calibre aórtico sigue siendo un desafío en la edad infanto-juvenil, la medida es importante para dar recomendaciones adecuadas para actividades deportivas, información sobre el seguimiento y el pronóstico. La dilatación de aorta por sí misma no suele ser la indicación quirúrgica del paciente, sino que acompaña a la cirugía valvular, siendo necesaria su reparación/sustitución cuando excede en diámetro a los valores establecidos de riesgo. La necesidad de cirugía combinada no reduce la supervivencia a largo plazo (282), pero aumenta el riesgo del procedimiento quirúrgico al asociar la necesidad de intervención sobre la aorta con tiempos de parada circulatoria más largos. Esto se visualiza en nuestra



serie: entre los casos operados, se realizó cirugía de aorta asociada en el 43,5 % de las intervenciones y solamente un paciente se intervino de tubo supracoronario sintético de forma aislada. En el seguimiento, aunque se haya resuelto el problema valvular, es importante considerar que la aorta puede seguir dilatándose. Esto requiere una monitorización mediante pruebas de imagen y mantener una alerta entre los profesionales que tratan a estos pacientes. De hecho, en nuestra serie, durante el seguimiento, dos pacientes ya intervenidos debido a disfunción valvular tuvieron que reintervenirse debido a la excesiva dilatación de aorta que siguió progresando en el tiempo. Por ello, una vez implantada una prótesis valvular en un paciente joven, no debemos olvidar la posible afectación de la aorta. En otro estudio retrospectivo de Michelena *et al.* se estudió una cohorte de pacientes con VAB, durante un seguimiento medio de  $16 \pm 7$  años. Al diagnóstico, el 7 % tenían dilatación de aorta ascendente, de media  $48 \pm 6$  mm; de ellos, 13 precisaron cirugía aórtica electiva y uno por disección aguda tipo A, lo que supone un riesgo a 15 años de cirugía aórtica del 46 %. De los 384 pacientes sin dilatación de aorta al diagnóstico de VAB, 49 desarrollaron dilatación en el seguimiento, y de este subgrupo casi la mitad de ellos precisaron posteriormente de cirugía de aorta electiva. El estudio muestra una tasa de cirugía aórtica a 25 años del 25 % de la cohorte (108). Estos datos demuestran la alta morbilidad que genera la asociación de aortopatía.

Las temidas complicaciones aórticas (disección o rotura) actualmente presentan tasas más bajas que lo descrito en estudios más antiguos. Si bien la incidencia de complicaciones es mayor en VAB con diámetros  $> 45$  mm respecto a población general (108), el estudio de Itagaki *et al.*, que realizó un seguimiento mediano de 15 años en pacientes con VAB tras la intervención de recambio valvular, mostró datos pronósticos alentadores con una incidencia baja de disección (0,55 %) (112). De igual modo, en el estudio de Masri *et al.*, el 42 % de los pacientes tenían aorta dilatada  $\geq 40$  mm, con solo



2 (0,1 %) disecciones confirmadas durante 8,1 años de media de seguimiento (95). De acuerdo con esa baja incidencia, en nuestra serie, durante el seguimiento tras cirugía previa se registró un único caso de disección aórtica. Dado el curso asintomático de la afectación aórtica, la mayor parte se diagnostican al mismo tiempo que el problema valvular, o bien, de forma incidental durante otros estudios.

La causa de la dilatación de aorta sigue buscándose, estando vigentes dos teorías no excluyentes. Una, llamada teoría hemodinámica, aboga que debido a la apertura anómala de la válvula se forma un flujo excéntrico dirigido contra la pared aórtica, con una carga tensional continua (WSS) (289). Regiones con aumento de WSS tienen una desregulación de la matriz extracelular y degeneración de las fibras elásticas, con niveles más altos de MMP-2, MMP-3 y TGF- $\beta$  en las áreas con mayor WSS, asociado con una mayor pérdida de arquitectura en la túnica media aórtica (290). Sin embargo, esto no da explicación a todos los casos, ya que no todos los individuos con el mismo fenotipo valvular tienen el mismo fenotipo aórtico y, por ejemplo, en familiares de primer grado (con VAT) de pacientes con VAB se ha comprobado una mayor frecuencia de dilatación de aorta, sin que exista la presencia de flujos excéntricos que generen WSS. Por ello, la otra teoría aboga por un origen genético. Los individuos con VAB poseen variantes genéticas que afectan a la estructura aórtica. Esta conexión no debe ser sorprendente ya que la válvula aórtica y la aorta ascendente comparten características embriológicas. Por ello, resulta esencial encontrar signos de susceptibilidad a la aparición de dilatación entre pacientes con VAB. En nuestra investigación mostramos como aquellos individuos con dilatación de aorta y VAB, de forma independiente a otros factores, poseían de forma significativamente menos frecuente el genotipo homocigoto para el alelo C del polimorfismo rs1800795, situado en la región promotora del gen *IL6*. Nuestros hallazgos aportan luz dentro de este enredado campo al demostrar susceptibilidad genética en un



polimorfismo de *IL6*. Parece más sensato pensar que los dos fenómenos (genética + hemodinámica) participan. El flujo de eyección aórtico excéntrico (WSS) sobre una pared arterial débil, con una susceptibilidad genética determinada y predisponente a alteraciones en respuestas moleculares, posiblemente causará o acelerará el desarrollo de dilatación.

Dentro de VAB, la EAo (consecuencia de la CAVD) es la causa más frecuente de cirugía y disfunción valvular. La CAVD es un problema de salud de primer orden, constituyendo una de las enfermedades cardíacas más frecuentes, con una prevalencia que aumenta rápidamente ligada al envejecimiento de la población (89). Las terapias farmacológicas para la EAo, hasta la fecha ausentes, continúan siendo un objetivo importante de la investigación biomédica, ya que podrían beneficiar a este grupo amplio de personas deteniendo o ralentizando la progresiva degeneración valvular. Las razones por las que algunas personas desarrollan EAo con el tiempo y otras no se desconocen debido a los complejos procesos genéticos y moleculares que producen esta enfermedad. En este sentido, el estudio de su patogénesis se revela esencial, por un lado, con el fin de ayudar a la identificación de posibles dianas terapéuticas; y por otro, para la identificación de individuos con predisposición genética para el desarrollo de la enfermedad, fundamental en beneficio de un seguimiento médico más estrecho.

Varios estudios han demostrado como los factores de riesgo cardiovascular clásicos parecen ser también factores de riesgo para la CAVD. A priori, tanto la enfermedad degenerativa de la válvula aórtica como la enfermedad aterosclerótica de las arterias coronarias comparten características patogénicas. En particular, las primeras etapas de la estenosis aórtica se relacionan con daño endotelial, infiltración de lípidos e inflamación que conducen a fibrosis y calcificación valvular temprana, condicionantes también descritos en aterosclerosis vascular. Se conoce que la CAVD y la calcificación de las



arterias coronarias son predictores de la aparición de eventos cardiovasculares mayores; sin embargo, su interdependencia y la supuesta presencia de factores de riesgo compartidos entre ambas no se encuentran aún por completo aclaradas. Es necesario el desarrollo de estudios poblacionales con elevados tamaños muestrales, existiendo un reducido número de estudios de esta índole hasta la fecha. El estudio de Yan *et al.* es uno de los ejemplos, analizando la incidencia de EAo en una población de más de 1 millón de individuos no seleccionados mayores de 65 años y encontrando asociación independiente entre HTA, dislipemia y diabetes con la aparición de EAo que precisase ingreso hospitalario (291). También en el estudio MESA los autores investigaron factores relacionados con la aparición o desarrollo de EAo en una cohorte preclínica y multiétnica de personas entre 45 y 84 años (292). Los factores relacionados con EAo fueron edad, sexo masculino, IMC y tabaquismo. Thanassoulis *et al.* analizaron la presencia de calcio valvular aórtico mediante TC entre los participantes del estudio Framingham y su asociación con factores de riesgo cardiovascular (293). Se halló asociación independiente con niveles de colesterol total y LDL y con tabaquismo, entre otros. En otro estudio reciente, Khurrami *et al.* contrastaron la presencia de CAVD mediante TC sin contraste en una cohorte de 14.073 hombres sanos de entre 60 y 74 años y evaluaron los factores de riesgo asociados. La presencia de CAVD (> 400 UA, Unidades Agatston) se identificó en el 58 % de los casos (294). La presencia de enfermedad extensa (> 1200 UA) fue en un grupo reducido, 1,5 % de los casos. En un análisis multivariable demostraron que los factores de riesgo edad, HTA, obesidad, enfermedades cardiovasculares previas y fosfato sérico estaban asociados a CAVD. En nuestro estudio incluimos pacientes sintomáticos con EAo significativa, observando que una alta proporción de ellos presentan alguno de estos factores de riesgo cardiovascular clásicos, más de la mitad HTA, dislipemia o tabaquismo, y más de un cuarto diabetes mellitus. Estas características fueron



significativamente más frecuentes en el grupo con EAo que en el grupo control, tanto de forma individual como analizadas en conjunto. Entre nuestros pacientes con EAo predomina el sexo masculino, y esto concuerda con la literatura, ya que ha sido identificado como un factor de riesgo importante para la presencia y gravedad de la calcificación de la válvula aórtica (292) (295). A diferencia de otros estudios que incluyen población en fase inicial-intermedia, nuestro estudio incluye pacientes en una fase avanzada de la enfermedad valvular y, por tanto, no se pudo establecer la relación de estos factores de riesgo con el inicio o progresión de la CAVD. En el estudio de Khurrami *et al.*, tener más de cuatro factores de riesgo cardiovascular identificó a los pacientes con una puntuación de calcio en la válvula aórtica  $\geq 300$  UA, con una sensibilidad del 72 % pero una especificidad deficiente del 56 %. Aunque una proporción alta de pacientes con EAo tenga estos factores de riesgo cardiovascular, existe una compleja relación entre la presencia o progresión de CAVD y dichos factores de riesgo. Se conoce la coexistencia de aterosclerosis y EAo y sus factores de riesgo compartidos; pero también se sabe que, actualmente, no es buena la precisión diagnóstica del uso de estos factores de riesgo cardiovascular para identificar posibles grupos de pacientes con CAVD. Por consiguiente, deben existir otros factores importantes asociados por descubrir, como podría ser una susceptibilidad genética, que impulsan el inicio y la progresión de la enfermedad de la válvula aórtica. Esta tesis doctoral trata de ahondar en este hecho. Hoy en día aún está por determinar qué hacer ante una esclerosis valvular aórtica en un paciente asintomático (fase inicial). Abordar los factores de riesgo cardiovascular es una parte importante de su atención médica y de la modificación de su salud cardiovascular general, aunque está mucho menos claro si esto tiene algún efecto sobre su valvulopatía *per se*.

Ahondando en la posibilidad de que exista cierta susceptibilidad genética, nuestro estudio genético incluyó polimorfismos en los genes *PALMD* e *IL6*, encontrando una





asociación con EAo en ambos casos y el último, además, con niveles más elevados de IL-6 circulante.

El polimorfismo rs1800795 en la región promotora del gen *IL6* es uno de los más analizados en enfermedades cardiovasculares. Un metaanálisis reciente examinó más de 40 estudios relacionados con rs1800795, con la firme conclusión de que existe una clara asociación con la enfermedad de las arterias coronarias impulsada, al menos en parte, por los niveles plasmáticos de IL-6 regulados al alza (278). En nuestro trabajo se encontró asociación entre el polimorfismo rs1800795 de *IL6* (genotipo CC) y la presencia de EAo. Al analizarlo por subtipo de válvula VAT o VAB, solamente hallamos dicha asociación entre los casos con VAT, de forma independiente a otras variables confusoras, lo que podría estar en relación con posibles diferencias en la patogénesis del desarrollo de estenosis en ambas. Dado que se trata de un polimorfismo que influye en la expresión de IL-6, estos resultados no sólo concuerdan con la identificación de *IL6* como locus de riesgo de estenosis, sino también con la probable intervención de esta citocina en la calcificación valvular. Puede tratarse de un factor de riesgo que predisponga a una mayor susceptibilidad a procesos progresivos de inflamación y calcificación. Nuestros resultados sirven de base para recomendar un seguimiento más exhaustivo de estos pacientes. Sin embargo, la necesidad de confirmar estos resultados en otras poblaciones sustenta el gran interés de continuar con nuevos estudios al respecto.

La hipótesis es que los individuos portadores del alelo C, a través de varios mecanismos que aún no se han esclarecido por completo, presentan un aumento de la transcripción y la traducción del gen *IL6*. Por lo tanto, los individuos con ambos alelos C presentan concentraciones más altas de IL-6 circulante, lo que los pone en mayor riesgo de desarrollar enfermedades similares a la aterosclerosis, dado su papel proinflamatorio. Sin embargo, en nuestra población no encontramos niveles más altos de IL-6 circulante



en pacientes con EAo significativa, aunque sí encontramos una mayor frecuencia de este alelo en estos pacientes. Investigar y determinar el efecto de un solo polimorfismo no es sencillo, debido a las múltiples interacciones con otros polimorfismos y sinergismos moleculares que pueden subyacer (296). Quizás se deban tener en cuenta otros polimorfismos de *IL6* para explicar mejor la regulación genética de los niveles circulantes de IL-6. Se necesita más información en la literatura sobre datos haplotípicos de *IL6* y su relación con la enfermedad cardiovascular.

La citoquina IL-6 es un péptido proinflamatorio circulante producido por muchos tipos de células diferentes, incluidos linfocitos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales (297). Se ha demostrado que una alta expresión de IL-6 en la válvula aórtica promueve la mineralización, pero nosotros no hemos encontrado una correlación entre los niveles de IL-6 circulante y el contenido de calcio en la válvula medido mediante microCT. Asimismo, tampoco se halló correlación entre el grado de calcificación de la válvula aórtica y el polimorfismo de *IL6*. Estudios *in vitro* han demostrado la relación de IL-6 con BMP-2 y RUNX2, importantes reguladores y promotores de la osteogénesis y elementos clave en el proceso de calcificación al controlar la transición osteogénica de las células intersticiales valvulares durante la CAVD (249). La IL-6 también puede promover la transición endotelio-mesénquima de las VEC, sospechosa de ser una de las primeras etapas del proceso de calcificación de las valvas (298). Estos hallazgos llevaron al intento de tratar la EAo con fármacos diseñados para controlar calcificación, aunque algunos de ellos, como denosumab o ácido alendrónico, no afectaron a la progresión de la calcificación de la válvula aórtica en pacientes con EAo calcificada (299). Todavía hay algunas investigaciones en curso que intentan controlar esta vía de calcificación y otras relacionadas que han sido implicadas en CAVD (300) (301). Sin embargo, los repetidos fracasos en los tratamientos resaltan la necesidad de continuar investigando las vías



moleculares que conducen a la calcificación valvular para encontrar nuevas dianas terapéuticas.

Se sabe que el depósito de calcio genera rigidez valvular que, consecuentemente, reduce la apertura de la válvula, generando así una obstrucción al flujo de salida del ventrículo izquierdo y, por lo tanto, aumentando la velocidad del flujo sanguíneo a través de este. Así, cuando la velocidad se mide por ecocardiografía, el gradiente transvalvular y el área sirven para clasificar la estenosis. Cuando estos parámetros plantean dudas sobre la gravedad, en los últimos años se ha generalizado en la práctica clínica el uso de un *score* de calcio (cuantificación por TC de los niveles de calcio valvular) para ayudar a clasificar la gravedad de la EAo (302). En nuestro estudio, no disponemos de datos de TC, pero sí se midieron los niveles de calcio en el tejido explantado (valvas) mediante microCT, obteniendo una relación congruente y directamente proporcional entre el nivel de calcio (BV/TV elevado) y el gradiente valvular medido por ultrasonido. Sin embargo, no hubo una asociación significativa de la extensión de la calcificación con el polimorfismo de *IL6*, lo que sugiere que la influencia del polimorfismo en la enfermedad podría estar relacionada con otra característica o limitarse a las etapas iniciales de la enfermedad. De hecho, el papel principal de la IL-6 es estimular la síntesis de todas las proteínas de fase aguda implicadas en la respuesta inflamatoria, como la PCR, el amiloide A sérico o el fibrinógeno. Este papel ha sido ampliamente estudiado en la enfermedad arterial coronaria y el infarto de miocardio (303) (304). Se sabe que la aparición de CAVD ocurre muchos años antes de alcanzar el estado de gravedad y se cree que la fibrocalcificación progresiva presenta una etapa inicial relacionada con un endotelio dañado, depósitos de lípidos e inflamación en las valvas, similar, en parte, al proceso de aterosclerosis (293). Se ha visto que hasta el 15 % de los más de 700 genes regulados diferencialmente en CAVD en comparación con una válvula sana están relacionados con



la inflamación (305). Los estudios histológicos revelaron también que la inflamación es un mecanismo relacionado con la calcificación de las válvulas aórticas (306) y se ha descrito la mayor expresión de IL-6 (249). En nuestro estudio hemos demostrado, en un subgrupo de pacientes, niveles séricos elevados de PCR que se correlacionan con los niveles séricos de IL-6, en línea con los resultados de otras investigaciones para otras patologías (307). No podemos afirmar si esta correlación es la causa o consecuencia de la calcificación de la válvula ya que nuestras mediciones se realizaron con EAo ya establecida, pero, aun así, el resultado respalda la importancia de tener en cuenta dianas moleculares inflamatorias para el tratamiento de la CAVD.

Se prosiguió el estudio mediante el análisis de posibles biomarcadores proteicos en suero. En la actualidad no se utiliza en la práctica médica diaria ningún biomarcador en sangre periférica para el diagnóstico de CAVD. Se sabe que los niveles de troponina y NTproBNP son indicadores de gravedad en pacientes con EAo, reflejando el impacto de la enfermedad valvular en el mal funcionamiento ventricular (308). Sería útil disponer de algún parámetro que nos permitiera, añadido a pruebas de imagen, discernir si un individuo comienza con CAVD, si su progresión va a ser veloz, evaluar su perfil de riesgo, etc. Los marcadores en sangre periférica son una potencial vía para un seguimiento más adecuado de los pacientes con EAo. Lurins *et al.* demostraron en una cohorte de 102 pacientes como los niveles de quemerina (adipoquina inmunomoduladora) se encontraban más elevados en personas con EAo leve o moderada, pudiendo resultar un biomarcador temprano. Asimismo, observaron como el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) se encontraba elevado respecto a controles en todos los rangos de gravedad de EAo (309). Hemos comentado previamente como la CAVD se encuentra lejos de ser un mero “desgaste”, considerado hoy en día un proceso activo. Los estudios emergentes sugieren que las VIC son propensas, bajo determinadas circunstancias, a



sufrir cambios fenotípicos que promueven, a su vez, la calcificación tisular. Se ven involucrados al menos tres elementos clave: la pérdida de señales inhibitoras que dirigen a las células a vías oxidativas y proosteogénicas, la formación de núcleos de hidroxiapatita y la diferenciación osteocondrocítica. Estos procesos no son graduales, sino probablemente simultáneos (310). Por eso, en nuestro estudio se pretendió el estudio en sangre periférica de pacientes de algunas proteínas relacionadas con dichos procesos. OPG es un receptor de la superfamilia de receptores TNF, relacionado estrechamente con la vía RANK/RANKL implicada en la remodelación ósea, modula la diferenciación y activación de los osteoclastos, influyendo así en el equilibrio entre la formación y la resorción ósea. OPG se une a RANKL para inhibir competitivamente la interacción con su receptor, lo que se traduce en una acción protectora ósea. La evidencia sugiere que OPG se asocia con el desarrollo de enfermedad arterial periférica, aterosclerosis coronaria y cerebrovascular, por lo que esta vía molecular ha ganado mucho interés (311) (312). Los niveles de OPG en suero muestran consistentemente un aumento en pacientes con afecciones cardiovasculares, incluida la calcificación vascular (313), diabetes mellitus (314), e insuficiencia cardíaca (315). Esto también se ha demostrado en dos pequeños estudios de EAo, observando que los niveles elevados de OPG en suero se asocian con una peor supervivencia en el seguimiento a medio plazo, no observando correlación con el grado de EAo (316) (317). Por otro lado, IL-8, mediador proinflamatorio, también se ha relacionado con procesos de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (318), aunque ha sido menos estudiado en CAVD. En el subgrupo analizado, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre EAo y controles ni para niveles de OPG ni para IL-8. Debemos esperar a que otros estudios en curso descubran marcadores inflamatorios útiles en pacientes con EAo.



La parte genética de nuestro estudio también incluyó el análisis de la asociación de otros dos polimorfismos que ya habían sido asociados a la EAo. Es el caso del polimorfismo rs6702619 relacionado con el gen *PALMD*, que se ha asociado a CAVD en dos GWAS realizados en los últimos años (319) (320) y también se asoció en el nuestro. Primero se había demostrado la asociación genética y más recientemente se implicó a la proteína en el proceso patológico en relación con la protección de las células endoteliales valvulares contra el estrés mecánico. Además, se demostró que el polimorfismo rs6702619 está ubicado en un potenciador de acción (*enhancer*) distante del gen *PALMD*, afectando a la regulación al alza del gen y, consecuentemente, promoviendo la fibrosis, que es un proceso patológico implicado en la CAVD (321). Una diferencia destacable entre nuestro estudio y el GWAS, además del tamaño poblacional, es la mayor edad media de nuestro grupo de estenosis (71 vs. 63 años). Esto podría restar valor al papel de la genética en el desarrollo de la estenosis en el grupo de mayor edad.

No hubo asociación de CAVD con el polimorfismo rs10455872 en el gen *LPA* en nuestra población, pero replicamos la asociación con la enfermedad arterial coronaria. Este gen codifica la apolipoproteína (a), que es un componente de la lipoproteína (a) (322). Los niveles plasmáticos elevados de lipoproteína(a) son un factor de riesgo bien conocido para la enfermedad cardiovascular y también están determinados genéticamente. De hecho, se ha demostrado una asociación causal entre los niveles elevados de lipoproteína(a) y un mayor riesgo de infarto de miocardio o enfermedad arterial coronaria, así como su relación con la EAo (323) (324), convirtiéndose, en la actualidad, en una diana terapéutica prometedora (170). Varios GWAS han replicado bien una asociación entre este polimorfismo en *LPA* y la EAo (320) (325) (326). Sin embargo, en algunas de las subpoblaciones incluidas en el metaanálisis de Helgadottir *et al.* no hubo asociación significativa, concretamente en la población de Suecia (Estocolmo) y la de



EE.UU. (Michigan) (320). En particular, esas dos poblaciones son las que tienen muchos menos participantes, lo que destaca la importancia del tamaño de la muestra para obtener resultados estadísticamente significativos, especialmente para efectos pequeños. Este puede ser el caso de nuestra población, aunque no podemos descartar que estos diferentes resultados puedan deberse a diferentes criterios a la hora de seleccionar las poblaciones, que pueden incluir o excluir individuos con VAB, con IAo o con enfermedad coronaria. Además, los criterios de selección dentro del grupo con EAo pueden también diferir, lo que puede llevar a diferentes hallazgos.

Dado el curso progresivo y prolongado de la enfermedad calcificada aórtica (con una amplia fase asintomática), la investigación de su susceptibilidad genética es un determinante fundamental de la enfermedad, y esta podría evaluarse a través de varias variantes genéticas comunes, cada una de las cuales conduce a un ligero aumento del riesgo de enfermedad. Se requieren más estudios que repliquen las asociaciones de variantes asociadas adicionales descubiertas para completar el panorama genético de esta enfermedad.

Finalmente, en una pequeña cohorte de individuos se evaluó el estado inmunológico e inflamatorio mediante citometría de flujo de células circulantes. Si bien existen trabajos que evalúan como células inmunitarias y citoquinas proinflamatorias relacionadas juegan un papel en la patogénesis de la enfermedad valvular, este campo de conocimiento se encuentra en exploración (230). Los monocitos son uno de los componentes más importantes del sistema inmune innato. Durante la respuesta inmune, los monocitos migran desde la sangre hasta los tejidos en respuesta a señales de daño tisular. Una vez allí, es donde se desarrollan en diferentes tipos de macrófagos, producen citocinas inflamatorias y promueven la respuesta defensiva. Se conocen tres poblaciones de monocitos circulantes según la expresión de CD14 y CD16 con diferencias tanto en



expresión génica como en fenotipo y función (327). Los monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) exhiben un fenotipo proinflamatorio a través de su mayor expresión de receptores de quimiocinas, capacidad para secretar mediadores y capacidad para migrar rápido al tejido donde diferenciarse en células dendríticas capaces de unir respuestas inmunes innatas y adaptativas; los no-clásicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) están involucrados en fagocitosis, adhesión mediada por complemento y respuestas antivirales; y, los llamados intermedios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) expresan niveles más altos de moléculas relacionadas con la presentación de antígenos y regulación de apoptosis, y cuando son activados promueven una intensa respuesta inflamatoria (328). Los monocitos clásicos comprenden el grupo más grande de los tres subconjuntos (80–85%), mientras que los monocitos CD16<sup>+</sup> representan aproximadamente 10–20% de todos los monocitos. Los monocitos desempeñan un papel clave en la formación y maduración temprana de las placas de ateroma, atraídos hacia la pared arterial por quimiocinas como la CCL2 secretada por células endoteliales activadas; van a captar lípidos dentro del espacio subendotelial para diferenciarse en células espumosas y continuar expandiendo la respuesta inflamatoria local (329). La composición y ontogenia de células derivadas de monocitos ha sido estudiada en placas ateroscleróticas de modelos animales (ratones), pero con grandes limitaciones en su traducción a humanos. Hasta la fecha, los estudios epidemiológicos que investigan la correlación entre monocitos circulantes y aparición de eventos cardiovasculares o gravedad de la aterosclerosis mediante citometría de flujo han arrojado resultados contradictorios (328). En patología valvular, los trabajos que evalúan este tema son escasos. Hewing *et al.* analizaron por primera vez poblaciones de monocitos circulantes en un estudio observacional de 175 individuos (100 EAo y 75 controles) (330). Los pacientes con EAo, de forma independiente a otras variables, exhibieron niveles significativamente más altos de monocitos intermedios circulantes, mientras que los





niveles de monocitos clásicos y no clásicos circulantes no difirieron en comparación con los controles. En nuestro estudio piloto también encontramos diferencias estadísticamente significativas en el recuento absoluto de estos monocitos intermedios, siendo mayor en pacientes con EAo-VAT. Son necesarios más estudios para seguir dando significación fisiopatológica y clínica a estos resultados.

Dentro del análisis inmunológico e inflamatorio también estudiamos poblaciones linfocitarias. Se conoce desde hace años la presencia de linfocitos T en el tejido de válvulas aórticas calcificadas (331). Las células T necesitan varias fases para su completa activación y ganancia de funciones efectoras. Se originan a partir de progenitores derivados de las células madre hematopoyéticas pluripotentes para posteriormente migrar al timo (órgano donde tiene lugar su maduración). La primera señal de diferenciación es la unión del receptor TCR asociado a CD4 y CD8 con los complejos de histocompatibilidad tipo II o tipo I, respectivamente. Más tarde, otra señal requerida es la interacción con el receptor CD28. La unión de CD28 (presente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) con su ligando produce señales estimuladoras que activan a las células T. Sin embargo, se ha comprobado como cuando el linfocito T está en continua activación antigénica o está en un medio rico en TNF- $\alpha$  (agente proinflamatorio), la expresión de CD28 se reduce o pierde (332). Las células que carecen de CD28 son menos susceptibles de control por parte de linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, producen altos niveles de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y expresan receptores relacionados con células NK, lo que las convierte en impulsoras de inflamación. Las células Th CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> están acrecentadas en enfermedades crónicas inflamatorias (333). La acumulación de estas células se asocia a inmunosenescencia. Este subgrupo linfocitario ha sido estudiado en individuos con enfermedad coronaria aterosclerótica, mostrando una elevada proporción de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en estos pacientes (334) (335). En el área de CAVD prácticamente no hay



trabajos. Winchester *et al.* encontraron en CAVD mayor número de linfocitos T  $CD8^+CD28^{null}$  en tejido y sangre circulante (336). Estudiamos esta población celular en nuestra cohorte y hallamos diferencias significativas en la población de linfocitos Th inmunosenescentes ( $CD4^+CD28^{null}$ ), siendo mayor en el grupo con EAo frente a válvula sana, sin diferencias entre VAT y VAB. Por tanto, la inmunosenescencia parece ser un proceso relevante en pacientes con EAo.

También analizamos la ratio CD4/CD8. Esta ratio se está perfilando como un marcador evolutivo de muchas enfermedades. Se sabe que el número de linfocitos B no varía significativamente con la edad, mientras que dicha ratio suele disminuir con el paso del tiempo. El envejecimiento del sistema vascular juega un papel central en el desarrollo de eventos cardiovasculares mayores y mortalidad. La desregulación de las poblaciones linfocitarias con cambios en sus respuestas e interacciones celulares se ha visto relacionada con un estado inflamatorio crónico (337). Este hecho parece relacionarse con disfunción endotelial que contribuye a la aparición de enfermedades vasculares (nefropatía diabética, retinopatía, enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares, etc.) (338). En este contexto, la pared vascular aórtica también puede verse afectada, con desarrollo de alteraciones en su matriz extracelular. Nuestros resultados sugieren un perfil inmunitario de senescencia (relación inversa entre la ratio CD4/CD8 y el diámetro aórtico).

Por otro lado, analizamos la población de linfocitos T angiogénicos (Tang) ( $CD3^+CD31^+CXCR4^+$ ). A pesar de que en la CAVD se produce neoangiogénesis en la válvula, no detectamos diferencias significativas ni en el porcentaje ni en el número absoluto de este tipo de linfocitos. Estas células son reguladoras de factores angiogénicos, movilizandando células formadoras de colonias endoteliales y siendo importantes en la reparación del daño vascular. Han sido estudiadas en enfermedad autoinmunes como



lupus sistémico o artritis reumatoide, observando que sus niveles guardan correlación inversa con factores de riesgo cardiovascular asociados a estas enfermedades, y que la disminución de células Tang se asocia a un mayor grado de actividad de estas enfermedades autoinmunes (273) (339). También se ha comprobado que estas células descienden en pacientes con diabetes mellitus, enfermedad asociada a daño endotelial y riesgo cardiovascular (340). Por tanto, este tipo celular es un marcador novedoso que se ha descrito en reparación endotelial y homeostasis vascular pero que todavía no había sido estudiado en patología valvular. El estudio del perfil de poblaciones de células linfocitarias en pacientes con CAVD podría aportar una mayor comprensión del papel del sistema inmunitario en su patogénesis y con suerte, en el futuro, ayudar a desarrollar futuras estrategias de tratamiento.

En términos generales, la profundización en el conocimiento de la patogénesis de la CAVD abre las puertas a un diagnóstico precoz y un tratamiento fisiopatológico dentro de una medicina más personalizada, con el objetivo de evitar o retrasar la necesidad de intervención (recambio valvular) y reducir la morbimortalidad asociada y el riesgo cardiovascular. Son necesarios más estudios científicos en esta dirección.

## Limitaciones y fortalezas del estudio.

Existen algunas limitaciones en el estudio y en la interpretación de los datos que consideramos necesario comentar, así como aspectos positivos que quisiéramos resaltar.

Los participantes se reclutaron en tres periodos diferentes de tiempo, aunando los casos posteriormente para este estudio. Por ende, caben posibles sesgos de selección. No obstante, las cohortes 2 y 3 se constituyeron prospectivamente con casos consecutivos de individuos sometidos, en sendos períodos, a cirugía cardíaca. De una proporción del



global no tenemos todos los detalles ecocardiográficos respecto a la cuantificación de la gravedad de la EAo, ni de las medidas aórticas, debido a que son estudios más antiguos. Tampoco se dispone de la puntuación de calcio por TC que pudiera haber sido realizada en el proceso asistencial de los pacientes, y que hubiese resultado de interés para comparar con los datos histológicos y los obtenidos de microCT.

Aunque el seguimiento del subgrupo de VAB se analizó retrospectivamente, el reclutamiento de los casos y la indicación quirúrgica se realizaron prospectivamente. En la literatura existen escasas series de seguimiento a largo plazo de pacientes con VAB intervenidos. Nuestros datos aportan luz en esta laguna de conocimiento. Poseer datos sobre el seguimiento a largo plazo de pacientes con VAT y su comparativa hubiese fortalecido el estudio. Si bien la serie de casos de VAB no es pequeña, son necesarios mayores tamaños muestrales para ampliar los estudios genéticos y de biomarcadores, así como de caracterización de los pacientes, factores de riesgo y/o pronósticos. Por ello, derivado de este trabajo se propone realizar un registro común de pacientes con VAB en nuestra comunidad/área sanitaria. La aortopatía bicúspide sigue siendo un desafío con dudas por resolver. Iniciativas de grupos de trabajo multicéntricos representan un ejemplo de colaboración y trabajo en equipo para seguir investigando en este campo de conocimiento, cuyos datos y resultados redundarán en beneficios clínicos para los individuos afectados.

El número de participantes con válvula aórtica normofuncionante es bajo y, por tanto, como grupo control para el estudio de la EAo se incluyeron principalmente pacientes con IAo sin calcificación valvular. Los mecanismos de IAo suelen ser diferentes a la degeneración de la válvula calcificada. Una proporción de pacientes del grupo de casos también presentaba IAo, pero solo en grado leve; mientras que en el grupo control la IAo era más significativa (moderada a grave) y carecían de EAo. No obstante, hasta



donde llega nuestro conocimiento, no se ha encontrado asociación entre estos polimorfismos y la IAo y, por tanto, este hecho posiblemente no interfiera en la asociación con CAVD. Por otro lado, el número de muestras de tejido de pacientes con IAo analizado mediante microCT fue bajo, si bien, los niveles de calcio fueron muy consistentes y dirigidos hacia un valor nulo, ya que se espera que todos ellos estén libres de calcio.

El tamaño muestral del estudio de células circulantes fue bajo, permitiendo realizar solo una aproximación al estado inflamatorio e inmunológico de los diferentes subgrupos. Existen muy pocos estudios de este carácter hasta la fecha. Nuestros resultados abren la puerta e invitan a, en el futuro, establecer estudios más grandes en población con valvulopatía aórtica degenerativa.

Por último, factores de confusión no medidos podrían afectar a las diferentes asociaciones entre polimorfismos, niveles proteicos y/o células circulantes y la presencia de EAo y/o VAB.



## **Conclusiones**

---







1. La condición bicúspide continúa diagnosticándose en etapas avanzadas, con un intervalo corto de tiempo desde el diagnóstico hasta la necesidad de una cirugía cardíaca. De forma similar a otras series, los individuos con válvula aórtica bicúspide presentan mayor proporción de varones y menor número de comorbilidades que los individuos con válvula aórtica tricúspide. El motivo principal de intervención es la disfunción valvular, principalmente, estenosis aórtica secundaria a la progresiva calcificación. Todo ello invita a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que retrasen la degeneración valvular.
2. La elevada prevalencia de dilatación de aorta asociada a la valvulopatía bicúspide contribuye a reforzar el término aortopatía bicúspide. Si bien la necesidad de cirugía de aorta aislada es baja, la tasa de cirugía combinada, válvulo-aórtica, no es despreciable, debido a presencia de dilatación significativa en el momento quirúrgico. La prevalencia de disección de aorta en el seguimiento es baja, menor que de endocarditis infecciosa.
3. Aquellos individuos con válvula aórtica bicúspide que precisan de una primera intervención quirúrgica cardíaca continúan presentando en el seguimiento una alta morbilidad. La vigilancia y monitorización periódica con pruebas médicas es actualmente fundamental para reducir las posibles complicaciones. Es necesario ahondar en posibles biomarcadores o susceptibilidad genética que mejoren el diagnóstico y estratifiquen el pronóstico en grupos de riesgo.
4. El genotipo CC del polimorfismo rs1800795 del gen *IL6* se vio asociado significativamente a menor dilatación de aorta en pacientes con válvula aórtica bicúspide. La identificación de individuos con predisposición genética para el desarrollo de dilatación de aorta es fundamental para optimizar el seguimiento médico de los pacientes.
5. Los genotipos GG para el polimorfismo rs6702619 del gen *PALMD* y CC del polimorfismo rs1800795 del gen *IL6* se asociaron significativamente en el análisis multivariante a la presencia de estenosis aórtica calcificada en personas con válvula aórtica tricúspide. Esto no se apreció en aquellos con válvula aórtica



bicúspide, lo que apoyaría la existencia de una patogenia distinta en ambos tipos de válvula.

6. En individuos con válvula aórtica tricúspide, el genotipo CC del polimorfismo rs1800795 del gen *IL6*, además de asociarse con estenosis aórtica calcificada, se asoció con niveles más altos de IL-6 circulante. Se identifica, por tanto, un locus de riesgo de estenosis aórtica, predisponiendo su presencia a una mayor susceptibilidad a procesos de inflamación y mineralización tisular.
7. Tras la evaluación de niveles en sangre periférica de potenciales biomarcadores, como son OPG e IL-8, no se encontró correlación con calcificación aórtica. Este proceso activo y progresivo implica un gran número de moléculas cuya identificación como biomarcadores en sangre periférica que permitan mejorar el diagnóstico, seguimiento y/o pronóstico de los individuos es una meta potencial y valiosa.
8. El patrón inmunológico e inflamatorio en pacientes con estenosis aórtica se caracterizó por un recuento absoluto más bajo de monocitos intermedios en válvula aórtica bicúspide. Diferencias en poblaciones monocitarias y, por tanto, en sus efectos a nivel tisular podrían, en parte, explicar diferencias en la patogenia de la calcificación de la válvula bicúspide.
9. La inmunosenescencia parece un proceso relevante en dos situaciones: por un lado, en estenosis aórtica calcificada (de forma independiente a la morfología de la válvula) determinada como niveles más altos de linfocitos T colaboradores inmunosenescentes; y, por otro lado, cuando existe dilatación de aorta, determinada como una baja ratio CD4/CD8. Una mejor comprensión del papel del sistema inmunitario ayudará al desarrollo de futuras estrategias para el control de esta enfermedad.

## **Bibliografía**

---





1. Dolk H, Loane M, Garne E, European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation*. 2011;123(8):841-9.
2. Pérez-Lescure Picarzo J, Mosquera González M, Latasa Zamalloa P, Crespo Marcos D. [Incidence and evolution of congenital heart disease in Spain from 2003 until 2012]. *An Pediatr*. 2018;89(5):294-301.
3. Michelena HI, Della Corte A, Evangelista A, Maleszewski JJ, Edwards WD, Roman MJ, et al. International consensus statement on nomenclature and classification of the congenital bicuspid aortic valve and its aortopathy, for clinical, surgical, interventional and research purposes. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2021;60(3):448-76.
4. Tutar E, Ekici F, Atalay S, Nacar N. The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. *Am Heart J*. 2005;150(3):513-5.
5. Tessler I, Goudot G, Albuissou J, Reshef N, Zwass DR, Carmi S, et al. Is Bicuspid Aortic Valve Morphology Genetically Determined? A Family-Based Study. *Am J Cardiol*. 2022;163:85-90.
6. Baumgartner H, De Backer J, Babu-Narayan SV, Budts W, Chessa M, Diller GP, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease. *Eur Heart J*. 2021;42(6):563-645.
7. Borger MA, Fedak PWM, Stephens EH, Gleason TG, Girdauskas E, Ikonomidis JS, et al. The American Association for Thoracic Surgery consensus guidelines on bicuspid aortic valve-related aortopathy: Executive summary. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018;156(2):473-80.
8. Michelena HI, Della Corte A, Prakash SK, Milewicz DM, Evangelista A, Enriquez-Sarano M. Bicuspid aortic valve aortopathy in adults: Incidence, etiology, and clinical significance. *Int J Cardiol*. 2015;201:400-7.
9. Ward C. Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart Br Card Soc*. 2000;83(1):81-5.
10. Pedersen MW, Groth KA, Mortensen KH, Brodersen J, Gravholt CH, Andersen NH. Clinical and pathophysiological aspects of bicuspid aortic valve disease. *Cardiol Young*. 2019;29(1):1-10.
11. Tessler I, Leshno M, Shmueli A, Shpitzen S, Durst R, Gilon D. Cost-effectiveness analysis of screening for first-degree relatives of patients with bicuspid aortic valve. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2021;7(5):447-57.
12. Galian-Gay L, Carro Hevia A, Teixido-Turà G, Rodríguez Palomares J, Gutiérrez-Moreno L, Maldonado G, et al. Familial clustering of bicuspid aortic valve and its relationship with aortic dilation in first-degree relatives. *Heart Br Card Soc*. 2019;105(8):603-8.
13. Martin PS, Kloesel B, Norris RA, Lindsay M, Milan D, Body SC. Embryonic Development of the Bicuspid Aortic Valve. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2015;2(4):248-72.
14. Thomas Sadler. Langman. Embriología Médica. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2019.
15. Henderson DJ, Eley L, Turner JE, Chaudhry B. Development of the Human Arterial Valves: Understanding Bicuspid Aortic Valve. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:802930.
16. Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell*. 2006;126(6):1037-48.
17. Bajolle F, Zaffran S, Bonnet D. Genetics and embryological mechanisms of congenital heart diseases. *Arch Cardiovasc Dis*. 2009;102(1):59-63.
18. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 2003;5(6):877-89.
19. Ren J, Miao D, Li Y, Gao R. Spotlight on Isl1: A Key Player in Cardiovascular Development and Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:793605.
20. Anderson RH, Webb S, Brown NA, Lamers W, Moorman A. Development of the heart: (3) Formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart*. 2003;89(9):1110-8.
21. Soto-Navarrete MT, López-Unzu MÁ, Durán AC, Fernández B. Embryonic development of bicuspid aortic valves. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020;63(4):407-18.



22. Milgrom-Hoffman M, Harrelson Z, Ferrara N, Zelzer E, Evans SM, Tzahor E. The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors. *Dev Camb Engl*. 2011;138(21):4777-87.
23. Harris IS, Black BL. Development of the endocardium. *Pediatr Cardiol*. 2010;31(3):391-9.
24. Keyte A, Hutson MR. The neural crest in cardiac congenital anomalies. *Differ Res Biol Divers*. 2012;84(1):25-40.
25. Niessen K, Karsan A. Notch signaling in cardiac development. *Circ Res*. 2008;102(10):1169-81.
26. Turnpenny PD, Ellard S. Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis, and management. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2012;20(3):251-7.
27. Loukas M, Bilinsky E, Bilinsky S, Blaak C, Tubbs RS, Anderson RH. The anatomy of the aortic root. *Clin Anat N Y N*. 2014;27(5):748-56.
28. Ho SY. Structure and anatomy of the aortic root. *Eur J Echocardiogr J Work Group Echocardiogr Eur Soc Cardiol*. 2009;10(1):i3-10.
29. Paiocchi VL, Faletra FF, Ferrari E, Schlossbauer SA, Leo LA, Maisano F. Multimodality Imaging of the Anatomy of the Aortic Root. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(5):51.
30. Grande KJ, Cochran RP, Reinhall PG, Kunzelman KS. Stress variations in the human aortic root and valve: the role of anatomic asymmetry. *Ann Biomed Eng*. 1998;26(4):534-45.
31. Schäfers HJ, Bierbach B, Aicher D. A new approach to the assessment of aortic cusp geometry. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(2):436-8.
32. Berdajs D, Lajos P, Turina M. The anatomy of the aortic root. *Cardiovasc Surg Lond Engl*. 2002;10(4):320-7.
33. Wenzel JP, Petersen E, Nikorowitsch J, Senftinger J, Sinning C, Theissen M, et al. Transthoracic echocardiographic reference values of the aortic root: results from the Hamburg City Health Study. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2021;37(12):3513-24.
34. Patel HN, Miyoshi T, Addetia K, Citro R, Daimon M, Gutierrez Fajardo P, et al. Normal Values of Aortic Root Size According to Age, Sex, and Race: Results of the World Alliance of Societies of Echocardiography Study. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2022;35(3):267-74.
35. Elefteriades JA, Mukherjee SK, Mojjibian H. Discrepancies in Measurement of the Thoracic Aorta: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(2):201-17.
36. Park JY, Foley TA, Bonnicksen CR, Maurer MJ, Goergen KM, Nkomo VT, et al. Transthoracic Echocardiography versus Computed Tomography for Ascending Aortic Measurements in Patients with Bicuspid Aortic Valve. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2017;30(7):625-35.
37. Bossone E, Yuriditsky E, Desale S, Ferrara F, Vríz O, Asch FM. Normal Values and Differences in Ascending Aortic Diameter in a Healthy Population of Adults as Measured by the Pediatric versus Adult American Society of Echocardiography Guidelines. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2016;29(2):166-72.
38. Saura D, Dulgheru R, Caballero L, Bernard A, Kou S, Gonjilashvili N, et al. Two-dimensional transthoracic echocardiographic normal reference ranges for proximal aorta dimensions: results from the EACVI NORRE study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2017;18(2):167-79.
39. Charles D O'Malley & J B de C M Saunders. Leonardo da Vinci on the Human Body: the anatomical, physiological and embryological drawings of Leonardo da Vinci. 1ed. New York. H Wolff Company. 1952.
40. Paget J. On the Congenital Malformations of the Heart. *Edinb Med Surg J*. 1831;36(109):263-309.
41. Peacock, T.B. (1858) On Malformations of the Human Heart. John Churchill, London.
42. Osler W. The bicuspid condition of the aortic valves. *Trans Assoc Am Physicians* 1886; 1: 185-92.
43. Abbott ME. Congenital cardiac disease. In: Osler W, editor. *Modern medicine: Its Theory and Practice*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1927.
44. Gale AN, McKusick VA, Hutchins GM, Gott VL. Familial congenital bicuspid aortic valve: secondary calcific aortic stenosis and aortic aneurysm. *Chest*. 1977;72(5):668-70.
45. Nanda NC, Gramiak R, Manning J, Mahoney EB, Lipchik EO, DeWeese JA. Echocardiographic



- recognition of the congenital bicuspid aortic valve. *Circulation*. 1974;49(5):870-5.
46. Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(25):2789-800.
  47. Roberts WC. The congenitally bicuspid aortic valve. A study of 85 autopsy cases. *Am J Cardiol*. 1970;26(1):72-83.
  48. Jilaihawi H, Chen M, Webb J, Himbert D, Ruiz CE, Rodés-Cabau J, et al. A Bicuspid Aortic Valve Imaging Classification for the TAVR Era. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2016;9(10):1145-58.
  49. Kang JW, Song HG, Yang DH, Baek S, Kim DH, Song JM, et al. Association between bicuspid aortic valve phenotype and patterns of valvular dysfunction and bicuspid aortopathy: comprehensive evaluation using MDCT and echocardiography. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013;6(2):150-61.
  50. Murphy IG, Collins J, Powell A, Markl M, McCarthy P, Malaisrie SC, et al. Comprehensive 4-stage categorization of bicuspid aortic valve leaflet morphology by cardiac MRI in 386 patients. *Int J Cardiovasc Imaging*. agosto de 2017;33(8):1213-21.
  51. Sievers HH, Schmidtke C. A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens. *J Thorac Cardiovasc Surg*. mayo de 2007;133(5):1226-33.
  52. Junco-Vicente A, Rodríguez I, Solache-Berrocal G, Cigarrán H, Martín M. Bicuspid aortic valve: what should I know? Updated review of its clinical and pathophysiological aspects. *Arch Cardiol Mex*. 2020;90(4):520-8.
  53. Yang LT, Enriquez-Sarano M, Michelena HI. The bicuspid aortic valve raphe: an evolving structure. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2020;21(5):590.
  54. Michelena HI, Prakash SK, Della Corte A, Bissell MM, Anavekar N, Mathieu P, et al. Bicuspid aortic valve: identifying knowledge gaps and rising to the challenge from the International Bicuspid Aortic Valve Consortium (BAVCon). *Circulation*. 2014;129(25):2691-704.
  55. Fernandes SM, Sanders SP, Khairy P, Jenkins KJ, Gauvreau K, Lang P, et al. Morphology of bicuspid aortic valve in children and adolescents. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(8):1648-51.
  56. Yang LT, Pellikka PA, Enriquez-Sarano M, Maalouf JF, Scott CG, Michelena HI. Stage B Aortic Regurgitation in Bicuspid Aortic Valve: New Observations on Progression Rate and Predictors. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020;13(6):1442-5.
  57. Kong WKF, Regeer MV, Poh KK, Yip JW, van Rosendaal PJ, Yeo TC, et al. Inter-ethnic differences in valve morphology, valvular dysfunction, and aortopathy between Asian and European patients with bicuspid aortic valve. *Eur Heart J*. 2018;39(15):1308-13.
  58. de Kerchove L, Mastrobuoni S, Froede L, Tamer S, Boodhwani M, van Dyck M, et al. Variability of repairable bicuspid aortic valve phenotypes: towards an anatomical and repair-oriented classification. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2019;ezz033.
  59. Arnaoutakis GJ, Sultan I, Siki M, Bavaria JE. Bicuspid aortic valve repair: systematic review on long-term outcomes. *Ann Cardiothorac Surg*. 2019;8(3):302-12.
  60. Sperling JS S, Lubat, E L. Forme fruste or «Incomplete» bicuspid aortic valves with very small raphe: The prevalence of bicuspid valve and its significance may be underestimated. *Int J Cardiol*. 2015; 184 :1-5.
  61. Michelena HI, Yang LT, Enriquez-Sarano M, Pochettino A. The elusive «forme fruste» bicuspid aortic valve: 3D transoesophageal echocardiography to the rescue. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2020;21(10):1169.
  62. Guala A, Rodriguez-Palomares J, Galian-Gay L, Teixido-Tura G, Johnson KM, Wieben O, et al. Partial Aortic Valve Leaflet Fusion Is Related to Deleterious Alteration of Proximal Aorta Hemodynamics. *Circulation*. 2019;139(23):2707-9.
  63. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 1 2002;39(12):1890-900.
  64. Nistri S, Basso C, Marzari C, Mormino P, Thiene G. Frequency of bicuspid aortic valve in young male conscripts by echocardiogram. *Am J Cardiol*. 2005;96(5):718-21.
  65. Lim MS, Strange G, Playford D, Stewart S, Celermajer DS. Characteristics of Bicuspid Aortic Valve Disease and Stenosis: The National Echo Database of Australia. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(17):e020785.



66. Sillesen AS, Vøgg O, Pihl C, Raja AA, Sundberg K, Vedel C, et al. Prevalence of Bicuspid Aortic Valve and Associated Aortopathy in Newborns in Copenhagen, Denmark. *JAMA*. 2021;325(6):561-7.
67. Mucumbitsi J, Bulwer B, Mutesa L, Ndahindwa V, Semakula M, Rusingiza E, et al. Prevalence of rheumatic valvular heart disease in Rwandan school children: echocardiographic evaluation using the World Heart Federation criteria. *Cardiovasc J Afr*. 2017;28(5):285-92.
68. Rwebembera J, Manyilira W, Zhu ZW, Nabbaale J, Namuyonga J, Ssinabulya I, et al. Prevalence and characteristics of primary left-sided valve disease in a cohort of 15,000 patients undergoing echocardiography studies in a tertiary hospital in Uganda. *BMC Cardiovasc Disord*. 2018;18(1):82.
69. Kaplan EL, Bulwer B, Adams D. Low Incidence of Congenital Bicuspid Aortic Valve in Sub-Saharan African Children. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2017;30(9):932-3.
70. Hunter LD, Lloyd GW, Monaghan MJ, Pecoraro AJK, Doubell AF, Herbst PG. Congenital bicuspid aortic valve: Differential prevalence across different South African population groups. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk*. 2020;110(8):13035.
71. Khan W, Milsevic M, Salciccioli L, Lazar J. Low prevalence of bicuspid aortic valve in African Americans. *Am Heart J*. 2008;156(3):e25.
72. Domínguez-Díaz ÁE, Cerrud-Sánchez CE, Alva-Espinosa C, David-Gómez F, Yáñez-Gutierrez L, López-Gallegos D. Aorta bivalva. Frecuencia y lesiones asociadas. Estudio prospectivo en 2,750 ecocardiogramas consecutivos. *Rev Mex Cardiol*. 2013;24(4):184-8.
73. Chew NWS, Phua K, Ngiam JN, Cheong C, Kong G, Ng JLM, et al. Inter-Ethnic Differences in Valvular Dysfunction, Aortopathy, and Progression of Disease of an Asian Bicuspid Aortic Valve Population. *Heart Lung Circ*. 2021;S1443-9506(21)01344-5.
74. Kong WKF, Regeer MV, Ng ACT, McCormack L, Poh KK, Yeo TC, et al. Sex Differences in Phenotypes of Bicuspid Aortic Valve and Aortopathy: Insights From a Large Multicenter, International Registry. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(3):e005155.
75. Masri A, Svensson LG, Griffin BP, Desai MY. Contemporary natural history of bicuspid aortic valve disease: a systematic review. *Heart Br Card Soc*. 2017;103(17):1323-30.
76. Matura LA, Ho VB, Rosing DR, Bondy CA. Aortic dilatation and dissection in Turner syndrome. *Circulation*. 9 de octubre de 2007;116(15):1663-70.
77. Kong WKF, Bax JJ, Michelena HI, Delgado V. Sex differences in bicuspid aortic valve disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020;63(4):452-6.
78. Michelena HI, Suri RM, Katan O, Eleid MF, Clavel MA, Maurer MJ, et al. Sex Differences and Survival in Adults With Bicuspid Aortic Valves: Verification in 3 Contemporary Echocardiographic Cohorts. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(10):e004211.
79. Brown ML, Burkhart HM, Connolly HM, Dearani JA, Cetta F, Li Z, et al. Coarctation of the aorta: lifelong surveillance is mandatory following surgical repair. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(11):1020-5.
80. Oliver JM, Alonso-Gonzalez R, Gonzalez AE, Gallego P, Sanchez-Recalde A, Cuesta E, et al. Risk of aortic root or ascending aorta complications in patients with bicuspid aortic valve with and without coarctation of the aorta. *Am J Cardiol*. 2009;104(7):1001-6.
81. Niaz T, Poterucha JT, Olson TM, Johnson JN, Craviari C, Nienaber T, et al. Characteristic Morphologies of the Bicuspid Aortic Valve in Patients with Genetic Syndromes. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2018;31(2):194-200.
82. Silberbach M, Roos-Hesselink JW, Andersen NH, Braverman AC, Brown N, Collins RT, et al. Cardiovascular Health in Turner Syndrome: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Genomic Precis Med*. octubre de 2018;11(10):e000048.
83. Fuchs MM, Attenhofer Jost C, Babovic-Vuksanovic D, Connolly HM, Egbe A. Long-Term Outcomes in Patients With Turner Syndrome: A 68-Year Follow-Up. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(11):e011501.
84. Michelena HI, Desjardins VA, Avierinos JF, Russo A, Nkomo VT, Sundt TM, et al. Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community. *Circulation*. 2008;117(21):2776-84.





85. Tzemos N, Therrien J, Yip J, Thanassoulis G, Tremblay S, Jamorski MT, et al. Outcomes in adults with bicuspid aortic valves. *JAMA*. 2008;300(11):1317-25.
86. Lewin MB, Otto CM. The bicuspid aortic valve: adverse outcomes from infancy to old age. *Circulation*. 2005;111(7):832-4.
87. Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* 2005;111(7):920-5.
88. Kong WKF, Delgado V, Poh KK, Regeer MV, Ng ACT, McCormack L, et al. Prognostic Implications of Raphe in Bicuspid Aortic Valve Anatomy. *JAMA Cardiol*. 2017;2(3):285-92.
89. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*. 2022;43(7):561-632.
90. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Gentile F, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2021;143(5):e35-71.
91. Rodríguez-Palomares JF, Dux-Santoy L, Guala A, Galian-Gay L, Evangelista A. Mechanisms of Aortic Dilatation in Patients With Bicuspid Aortic Valve: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2023;82(5):448-64.
92. Hebson C, Iannucci G. Bicuspid Aortopathy and Sports Clearance. *Am J Cardiol*. 2021;147:147-8.
93. Della Corte A, Michelena HI, Citarella A, Votta E, Piatti F, Lo Presti F, et al. Risk Stratification in Bicuspid Aortic Valve Aortopathy: Emerging Evidence and Future Perspectives. *Curr Probl Cardiol*. 2021;46(3):100428.
94. Fedak PWM, Barker AJ, Verma S. Year in review: bicuspid aortopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2016;31(2):132-8.
95. Masri A, Kalahasti V, Alkharabsheh S, Svensson LG, Sabik JF, Roselli EE, et al. Characteristics and long-term outcomes of contemporary patients with bicuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;151(6):1650-1659.e1.
96. Gurvitz M, Chang RK, Drant S, Allada V. Frequency of aortic root dilation in children with a bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol*. 2004;94(10):1337-40.
97. Della Corte A, Bancone C, Dialetto G, Covino FE, Manduca S, Montibello MV, et al. The ascending aorta with bicuspid aortic valve: a phenotypic classification with potential prognostic significance. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2014;46(2):240-7; discussion 247.
98. Girdauskas E, Disha K, Rouman M, Espinoza A, Borger MA, Kuntze T. Aortic events after isolated aortic valve replacement for bicuspid aortic valve root phenotype: echocardiographic follow-up study. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2015;48(4):e71-76.
99. Pagé M, Mongeon FP, Stevens LM, Soulière V, Khairy P, El-Hamamsy I. Aortic dilation rates in patients with bicuspid aortic valve: correlations with cusp fusion phenotype. *J Heart Valve Dis*. 2014;23(4):450-7.
100. Sievers HH, Stierle U, Hachmann RMS, Charitos EI. New insights in the association between bicuspid aortic valve phenotype, aortic configuration and valve haemodynamics. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2016;49(2):439-46.
101. Barker AJ, Markl M, Bürk J, Lorenz R, Bock J, Bauer S, et al. Bicuspid aortic valve is associated with altered wall shear stress in the ascending aorta. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2012;5(4):457-66.
102. Rodríguez-Palomares JF, Dux-Santoy L, Guala A, Kale R, Maldonado G, Teixidó-Turà G, et al. Aortic flow patterns and wall shear stress maps by 4D-flow cardiovascular magnetic resonance in the assessment of aortic dilatation in bicuspid aortic valve disease. *J Cardiovasc Magn Reson Off J Soc Cardiovasc Magn Reson*. 2018;20(1):28.
103. Evangelista A, Gallego P, Calvo-Iglesias F, Bermejo J, Robledo-Carmona J, Sánchez V, et al. Anatomical and clinical predictors of valve dysfunction and aortic dilation in bicuspid aortic valve disease. *Heart Br Card Soc*. 2018;104(7):566-73.
104. Wojnarski CM, Roselli EE, Idrees JJ, Zhu Y, Carnes TA, Lowry AM, et al. Machine-learning phenotypic classification of bicuspid aortopathy.



- J Thorac Cardiovasc Surg. 2018;155(2):461-469.e4.
105. Detaint D, Michelena HI, Nkomo VT, Vahanian A, Jondeau G, Sarano ME. Aortic dilatation patterns and rates in adults with bicuspid aortic valves: a comparative study with Marfan syndrome and degenerative aortopathy. *Heart Br Card Soc.* 2014;100(2):126-34.
  106. Della Corte A, Bancone C, Buonocore M, Dialetto G, Covino FE, Manduca S, et al. Pattern of ascending aortic dimensions predicts the growth rate of the aorta in patients with bicuspid aortic valve. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2013;6(12):1301-10.
  107. Davies RR, Kaple RK, Mandapati D, Gallo A, Botta DM, Elefteriades JA, et al. Natural history of ascending aortic aneurysms in the setting of an unreplaced bicuspid aortic valve. *Ann Thorac Surg.* 2007;83(4):1338-44.
  108. Michelena HI, Khanna AD, Mahoney D, Margaryan E, Topilsky Y, Suri RM, et al. Incidence of aortic complications in patients with bicuspid aortic valves. *JAMA.* 2011;306(10):1104-12.
  109. Roberts CS, Roberts WC. Dissection of the aorta associated with congenital malformation of the aortic valve. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17(3):712-6.
  110. Mills P, Leech G, Davies M, Leathan A. The natural history of a non-stenotic bicuspid aortic valve. *Br Heart J.* 1978;40(9):951-7.
  111. Januzzi JL, Isselbacher EM, Fattori R, Cooper JV, Smith DE, Fang J, et al. Characterizing the young patient with aortic dissection: results from the International Registry of Aortic Dissection (IRAD). *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(4):665-9.
  112. Itagaki S, Chikwe JP, Chiang YP, Egorova NN, Adams DH. Long-Term Risk for Aortic Complications After Aortic Valve Replacement in Patients With Bicuspid Aortic Valve Versus Marfan Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(22):2363-9.
  113. Keane MG, Wieggers SE, Plappert T, Pochettino A, Bavaria JE, Sutton MG. Bicuspid aortic valves are associated with aortic dilatation out of proportion to coexistent valvular lesions. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III35-39.
  114. Michelena HI, Katan O, Suri RM, Baddour LM, Enriquez-Sarano M. Incidence of Infective Endocarditis in Patients With Bicuspid Aortic Valves in the Community. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(1):122-3.
  115. Delgado V, Ajmone Marsan N, de Waha S, Bonaros N, Brida M, Burri H, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of endocarditis. *Eur Heart J.* 2023;44(39):3948-4042.
  116. Rodríguez-Palomares JF, Teixidó-Tura G, Galuppo V, Cuéllar H, Laynez A, Gutiérrez L, et al. Multimodality Assessment of Ascending Aortic Diameters: Comparison of Different Measurement Methods. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr.* 2016;29(9):819-826.e4.
  117. Ocak I, Lacomis JM, Deible CR, Pealer K, Parag Y, Knollmann F. The aortic root: comparison of measurements from ECG-gated CT angiography with transthoracic echocardiography. *J Thorac Imaging.* 2009;24(3):223-6.
  118. McKellar SH, Michelena HI, Li Z, Schaff HV, Sundt TM. Long-term risk of aortic events following aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol.* 2010;106(11):1626-33.
  119. Amoretti F, Cerillo AG, Mariani M, Stefano P. A simple method to visualize the bicuspid aortic valve pathology by cardiac computed tomography. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2020;14(2):195-8.
  120. Galian-Gay L, Rodríguez-Palomares J, Guala A, Michelena HI, Evangelista A. Multimodality imaging in bicuspid aortic valve. *Prog Cardiovasc Dis.* 2020;63(4):442-51.
  121. Francone M, Budde RPJ, Bremerich J, Dacher JN, Loewe C, Wolf F, et al. CT and MR imaging prior to transcatheter aortic valve implantation: standardisation of scanning protocols, measurements and reporting-a consensus document by the European Society of Cardiovascular Radiology (ESCR). *Eur Radiol.* 2020;30(5):2627-50.
  122. Evangelista Masip A, Galian-Gay L, Guala A, Lopez-Sainz A, Teixido-Turà G, Ruiz Muñoz A, et al. Unraveling Bicuspid Aortic Valve Enigmas by Multimodality Imaging: Clinical Implications. *J Clin Med.* 2022;11(2):456.
  123. Everett RJ, Tastet L, Clavel MA, Chin CWL, Capoulade R, Vassiliou VS, et al. Progression of Hypertrophy and Myocardial Fibrosis in Aortic Stenosis: A Multicenter Cardiac Magnetic Resonance Study. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2018;11(6):e007451.



124. Balčiūnaitė G, Besusparis J, Palionis D, Žurauskas E, Skorniakov V, Janušauskas V, et al. Exploring myocardial fibrosis in severe aortic stenosis: echo, CMR and histology data from FIB-AS study. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2022; 38(7):1555–68.
125. Garcia J, Barker AJ, Murphy I, Jarvis K, Schnell S, Collins JD, et al. Four-dimensional flow magnetic resonance imaging-based characterization of aortic morphometry and haemodynamics: impact of age, aortic diameter, and valve morphology. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016;17(8):877-84.
126. Mahadevia R, Barker AJ, Schnell S, Entezari P, Kansal P, Fedak PWM, et al. Bicuspid aortic cusp fusion morphology alters aortic three-dimensional outflow patterns, wall shear stress, and expression of aortopathy. *Circulation*. 2014;129(6):673-82.
127. Fatehi Hassanabad A, Garcia J, Verma S, White JA, Fedak PWM. Utilizing wall shear stress as a clinical biomarker for bicuspid valve-associated aortopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2019;34(2):124-31.
128. Grewal N, Gittenberger-de Groot AC. Wall Shear Stress Directional Abnormalities in BAV Aortas: Toward a New Hemodynamic Predictor of Aortopathy? *Front Physiol*. 2019;10:225.
129. Soulat G, Scott MB, Allen BD, Avery R, Bonow RO, Malaisrie SC, et al. Association of Regional Wall Shear Stress and Progressive Ascending Aorta Dilation in Bicuspid Aortic Valve. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2022;15(1):33-42.
130. Guala A, Dux-Santoy L, Teixido-Tura G, Ruiz-Muñoz A, Galian-Gay L, Servato ML, et al. Wall Shear Stress Predicts Aortic Dilation in Patients With Bicuspid Aortic Valve. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2022;15(1):46-56.
131. Salerno M, Chandrashekar Y. CMR 4D-Flow Wall Shear Stress and Aortic Dilation in Bicuspid Aortic Valve. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2022;15(1):177-9.
132. Crawford EE, McCarthy PM, Malaisrie SC, Puthumana JJ, Robinson JD, Markl M, et al. Applications of a Specialty Bicuspid Aortic Valve Program: Clinical Continuity and Translational Collaboration. *J Clin Med*. 2020;9(5):1354.
133. Bons LR, Geenen LW, van den Hoven AT, Dik WA, van den Bosch AE, Duijnhouwer AL, et al. Blood biomarkers in patients with bicuspid aortic valve disease. *J Cardiol*. 2020;76(3):287-94.
134. Lo Presti F, Guzzardi DG, Bancone C, Fedak PWM, Della Corte A. The science of BAV aortopathy. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020;63(4):465-74.
135. Steadman CD, Ray S, Ng LL, McCann GP. Natriuretic peptides in common valvular heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(19):2034-48.
136. Ikonomidis JS, Ruddy JM, Benton SM, Arroyo J, Brinsa TA, Stroud RE, et al. Aortic dilatation with bicuspid aortic valves: cusp fusion correlates to matrix metalloproteinases and inhibitors. *Ann Thorac Surg*. 2012;93(2):457-63.
137. Wang Y, Wu B, Dong L, Wang C, Wang X, Shu X. Circulating matrix metalloproteinase patterns in association with aortic dilatation in bicuspid aortic valve patients with isolated severe aortic stenosis. *Heart Vessels*. 2016;31(2):189-97.
138. Drapisz S, Góralczyk T, Jamka-Miszalski T, Olszowska M, Undas A. Nonstenotic bicuspid aortic valve is associated with elevated plasma asymmetric dimethylarginine. *J Cardiovasc Med Hagerstown Md*. 2013;14(6):446-52.
139. Gavriiliuk ND, Druzhkova TA, Irtyuga OB, Zhloba AA, Subbotina TF, Uspenskiy VE, et al. Asymmetric Dimethylarginine in Patients with Ascending Aortic Aneurysms. *Aorta Stamford Conn*. 2016;4(6):219-25.
140. Rueda-Martínez C, Lamas O, Carrasco-Chinchilla F, Robledo-Carmona J, Porras C, Sánchez-Espín G, et al. Increased blood levels of transforming growth factor  $\beta$  in patients with aortic dilatation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2017;25(4):571-4.
141. Forte A, Bancone C, Cobellis G, Buonocore M, Santarpino G, Fischlein TJM, et al. A Possible Early Biomarker for Bicuspid Aortopathy: Circulating Transforming Growth Factor  $\beta$ -1 to Soluble Endoglin Ratio. *Circ Res*. 2017;120(11):1800-11.
142. Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA, et al. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(5):H1329-1335.
143. Şimşek EÇ, Yakar Tülüce S, Tülüce K, Emren SV, Çuhadar S, Nazlı C. The relationship between serum apelin levels and aortic dilatation



- in bicuspid aortic valve patients. *Congenit Heart Dis.* 2019;14(2):256-63.
144. Adewuyi JO, Patel R, Abbasciano R, McCann GP, Murphy G, Woźniak MJ, et al. A systematic review of micro-RNAs in aortic stenosis and cardiac fibrosis. *Clin Transl Sci.* 2022;15(8):1809-17.
  145. Schneider U, Feldner SK, Hofmann C, Schöpe J, Wagenpfeil S, Giebels C, et al. Two decades of experience with root remodeling and valve repair for bicuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017;153(4):S65-71.
  146. Abeln KB, Giebels C, Ehrlich T, Federspiel JM, Schäfers HJ. Which Aortic Valve Can Be Surgically Reconstructed? *Curr Cardiol Rep.* 2021;23(8):108.
  147. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, et al. Transcatheter Aortic-Valve Implantation for Aortic Stenosis in Patients Who Cannot Undergo Surgery. *N Engl J Med.* 2010;363(17):1597-607.
  148. Leon MB, Smith CR, Mack MJ, Makkar RR, Svensson LG, Kodali SK, et al. Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2016;374(17):1609-20.
  149. Mylotte D, Lefevre T, Søndergaard L, Watanabe Y, Modine T, Dvir D, et al. Transcatheter aortic valve replacement in bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(22):2330-9.
  150. Blanke P, Weir-McCall JR, Achenbach S, Delgado V, Hausleiter J, Jilaihawi H, et al. Computed Tomography Imaging in the Context of Transcatheter Aortic Valve Implantation (TAVI)/Transcatheter Aortic Valve Replacement (TAVR): An Expert Consensus Document of the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019;12(1):1-24.
  151. Forrest JK, Kaple RK, Ramlawi B, Gleason TG, Meduri CU, Yakubov SJ, et al. Transcatheter Aortic Valve Replacement in Bicuspid Versus Tricuspid Aortic Valves From the STS/ACC TVT Registry. *JACC Cardiovasc Interv.* 2020;13(15):1749-59.
  152. Ueshima D, Nai Fovino L, Brener SJ, Fabris T, Scotti A, Barioli A, et al. Transcatheter aortic valve replacement for bicuspid aortic valve stenosis with first- and new-generation bioprostheses: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2020;298:76-82.
  153. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, Bossone E, Bartolomeo RD, Eggebrecht H, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2014;35(41):2873-926.
  154. Ma B, Te D. Management of the valve and ascending aorta in adults with bicuspid aortic valve disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;17(2).
  155. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, Bersin RM, Carr VF, Casey DE, et al. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. *Circulation.* 2010;121(13):e266-369.
  156. Sherrah AG, Andvik S, van der Linde D, Davies L, Bannon PG, Padang R, et al. Nonsyndromic Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection: Outcomes With Marfan Syndrome Versus Bicuspid Aortic Valve Aneurysm. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(6):618-26.
  157. Borger MA, Preston M, Ivanov J, Fedak PWM, Davierwala P, Armstrong S, et al. Should the ascending aorta be replaced more frequently in patients with bicuspid aortic valve disease? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;128(5):677-83.
  158. Eleid MF, Forde I, Edwards WD, Maleszewski JJ, Suri RM, Schaff HV, et al. Type A aortic dissection in patients with bicuspid aortic valves: clinical and pathological comparison with tricuspid aortic valves. *Heart Br Card Soc.* 2013;99(22):1668-74.
  159. Coady MA, Rizzo JA, Hammond GL, Kopf GS, Elefteriades JA. Surgical intervention criteria for thoracic aortic aneurysms: a study of growth rates and complications. *Ann Thorac Surg.* 1999;67(6):1922-6; discussion 1953-1958.



160. Davies RR, Goldstein LJ, Coady MA, Tittle SL, Rizzo JA, Kopf GS, et al. Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(1):17-27; discussion 27-28.
161. Pape LA, Tsai TT, Isselbacher EM, Oh JK, O'gara PT, Evangelista A, et al. Aortic diameter  $\geq$  5.5 cm is not a good predictor of type A aortic dissection: observations from the International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD). *Circulation.* 2007;116(10):1120-7.
162. Adriaans BP, Wildberger JE, Westenberg JJM, Lamb HJ, Schalla S. Predictive imaging for thoracic aortic dissection and rupture: moving beyond diameters. *Eur Radiol.* 2019;29(12):6396-404.
163. Harky A, Bashir M, Antoniou A, Francis N, Alhamsan L, Uppal R. Size and dissection: what is the relation? *Indian J Thorac Cardiovasc Surg.* 2019;35(Suppl 2):72-8.
164. Danyi P, Elefteriades JA, Jovin IS. Medical therapy of thoracic aortic aneurysms: are we there yet? *Circulation.* 2011;124(13):1469-76.
165. Ziganshin BA, Mukherjee SK, Elefteriades JA. Atenolol versus Losartan in Marfan's Syndrome. *N Engl J Med.* 2015;372(10):977-8.
166. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1343-56.
167. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J, ASTRONOMER Investigators. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation.* 2010;121(2):306-14.
168. Loomba RS, Arora R. Statin therapy and aortic stenosis: a systematic review of the effects of statin therapy on aortic stenosis. *Am J Ther.* 2010;17(4):e110-114.
169. Reyes-Soffer G, Ginsberg HN, Berglund L, Duell PB, Heffron SP, Kamstrup PR, et al. Lipoprotein(a): A Genetically Determined, Causal, and Prevalent Risk Factor for Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2022;42(1):e48-60.
170. O'Donoghue ML, Rosenson RS, Gencer B, López JAG, Lepor NE, Baum SJ, et al. Small Interfering RNA to Reduce Lipoprotein(a) in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2022;387(20):1855-1864.
171. Emanuel R, Withers R, O'Brien K, Ross P, Feizi O. Congenitally bicuspid aortic valves. Clinicogenetic study of 41 families. *Br Heart J.* 1978;40(12):1402-7.
172. Huntington K, Hunter AG, Chan KL. A prospective study to assess the frequency of familial clustering of congenital bicuspid aortic valve. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(7):1809-12.
173. Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, Shooner K, Benson DW. Bicuspid aortic valve is heritable. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(1):138-43.
174. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 2005;437(7056):270-4.
175. Luna-Zurita L, Prados B, Grego-Bessa J, Luxán G, del Monte G, Benguría A, et al. Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J Clin Invest.* 2010;120(10):3493-507.
176. Acharya A, Hans CP, Koenig SN, Nichols HA, Galindo CL, Garner HR, et al. Inhibitory role of Notch1 in calcific aortic valve disease. *PloS One.* 2011;6(11):e27743.
177. Debiec R, Hamby SE, Jones PD, Coolman S, Asiani M, Kharodia S, et al. Novel loss of function mutation in NOTCH1 in a family with bicuspid aortic valve, ventricular septal defect, thoracic aortic aneurysm, and aortic valve stenosis. *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(10):e1437.
178. Li RG, Xu YJ, Wang J, Liu XY, Yuan F, Huang RT, et al. GATA4 Loss-of-Function Mutation and the Congenitally Bicuspid Aortic Valve. *Am J Cardiol.* 2018;121(4):469-74.
179. Alonso-Montes C, Martín M, Martínez-Arias L, Coto E, Naves-Díaz M, Morís C, et al. Variants in cardiac GATA genes associated with bicuspid aortic valve. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(12):e13027.
180. Shi LM, Tao JW, Qiu XB, Wang J, Yuan F, Xu L, et al. GATA5 loss-of-function mutations associated with congenital bicuspid aortic valve. *Int J Mol Med.* 2014;33(5):1219-26.



181. Bonachea EM, Chang SW, Zender G, LaHaye S, Fitzgerald-Butt S, McBride KL, et al. Rare GATA5 sequence variants identified in individuals with bicuspid aortic valve. *Pediatr Res.* 2014;76(2):211-6.
182. Xu YJ, Di RM, Qiao Q, Li XM, Huang RT, Xue S, et al. GATA6 loss-of-function mutation contributes to congenital bicuspid aortic valve. *Gene.* 2018;663:115-20.
183. Jiang WF, Xu YJ, Zhao CM, Wang XH, Qiu XB, Liu X, et al. A novel TBX5 mutation predisposes to familial cardiac septal defects and atrial fibrillation as well as bicuspid aortic valve. *Genet Mol Biol.* 2020;43(4):e20200142.
184. Luyckx I, MacCarrick G, Kempers M, Meester J, Geryl C, Rombouts O, et al. Confirmation of the role of pathogenic SMAD6 variants in bicuspid aortic valve-related aortopathy. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2019;27(7):1044-53.
185. Gillis E, Kumar AA, Luyckx I, Preuss C, Cannaearts E, van de Beek G, et al. Candidate Gene Resequencing in a Large Bicuspid Aortic Valve-Associated Thoracic Aortic Aneurysm Cohort: SMAD6 as an Important Contributor. *Front Physiol.* 2017;8:400.
186. Attanasio M, Lapini I, Evangelisti L, Lucarini L, Giusti B, Porciani M, et al. FBN1 mutation screening of patients with Marfan syndrome and related disorders: detection of 46 novel FBN1 mutations. *Clin Genet* 2008;74(1):39-46.
187. Gould RA, Aziz H, Woods CE, Seman-Senderos MA, Sparks E, Preuss C, et al. ROBO4 variants predispose individuals to bicuspid aortic valve and thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2019;51(1):42-50.
188. Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, et al. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet.* 2007;39(12):1488-93.
189. Tortora G, Wischmeijer A, Berretta P, Alfonsi J, Di Marco L, Barbieri A, et al. Search for genetic factors in bicuspid aortic valve disease: ACTA2 mutations do not play a major role. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017;25(5):813-7.
190. Longobardo L, Caretj ML, Pizzino G, Bitto A, Piccione MC, Zucco M, et al. Impairment of elastic properties of the aorta in bicuspid aortic valve: relationship between biomolecular and aortic strain patterns. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2018;19(8):879-87.
191. Whitcomb J, Gharibeh L, Nemer M. From embryogenesis to adulthood: Critical role for GATA factors in heart development and function. *IUBMB Life.* 2020;72(1):53-67.
192. Pepe G, Nistri S, Giusti B, Sticchi E, Attanasio M, Porciani C, et al. Identification of fibrillin 1 gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Med Genet.* 2014;15:23.
193. Perrucci GL, Rurali E, Gowran A, Pini A, Antona C, Chiesa R, et al. Vascular smooth muscle cells in Marfan syndrome aneurysm: the broken bricks in the aortic wall. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017;74(2):267-77.
194. Costantino S, Libby P, Kishore R, Tardif JC, El-Osta A, Paneni F. Epigenetics and precision medicine in cardiovascular patients: from basic concepts to the clinical arena. *Eur Heart J.* 2018;39(47):4150-8.
195. Wang K, Li Y, Qiang T, Chen J, Wang X. Role of epigenetic regulation in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res.* 2021;170:105743.
196. Pan S, Lai H, Shen Y, Breeze C, Beck S, Hong T, et al. DNA methylome analysis reveals distinct epigenetic patterns of ascending aortic dissection and bicuspid aortic valve. *Cardiovasc Res.* 2017;113(6):692-704.
197. Gutierrez J, Davis BA, Nevenon KA, Ward S, Carbone L, Maslen CL. DNA Methylation Analysis of Turner Syndrome BAV. *Front Genet.* 2022;13:872750.
198. Gomez D, Coyet A, Ollivier V, Jeunemaitre X, Jondeau G, Michel JB, et al. Epigenetic control of vascular smooth muscle cells in Marfan and non-Marfan thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2011;89(2):446-56.
199. Forte A, Galderisi U, Cipollaro M, De Feo M, Della Corte A. Epigenetic regulation of TGF- $\beta$ 1 signalling in dilative aortopathy of the thoracic ascending aorta. *Clin Sci Lond Engl.* 2016;130(16):1389-405.
200. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
201. Mayr M, Zampetaki A, Willeit P, Willeit J, Kiechl S. MicroRNAs within the continuum of postgenomics biomarker discovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):206-14.



202. Balistreri CR, Forte M, Greco E, Paneni F, Cavarretta E, Frati G, et al. An overview of the molecular mechanisms underlying development and progression of bicuspid aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;132:146-53.
203. Vecoli C, Borghini A, Turchi S, Mercuri A, Andreassi MG. Genetic polymorphisms of miRNA machinery genes in bicuspid aortic valve and associated aortopathy. *Pers Med.* 2021;18(1):21-9.
204. Junco-Vicente A, Del Río-García Á, Martín M, Rodríguez I. Update in Biomolecular and Genetic Bases of Bicuspid Aortopathy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5694.
205. Yanagawa B, Lovren F, Pan Y, Garg V, Quan A, Tang G, et al. miRNA-141 is a novel regulator of BMP-2-mediated calcification in aortic stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;144(1):256-62.
206. Pulignani S, Borghini A, Foffa I, Vecoli C, Ait-Ali L, Andreassi MG. Functional characterization and circulating expression profile of dysregulated microRNAs in BAV-associated aortopathy. *Heart Vessels.* 2020;35(3):432-40.
207. Borghini A, Foffa I, Pulignani S, Vecoli C, Ait-Ali L, Andreassi MG. miRNome Profiling in Bicuspid Aortic Valve-Associated Aortopathy by Next-Generation Sequencing. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2498.
208. Martínez-Micaelo N, Beltrán-Debón R, Baiges I, Faiges M, Alegret JM. Specific circulating microRNA signature of bicuspid aortic valve disease. *J Transl Med.* 2017;15(1):76.
209. Maleki S, Cottrill KA, Poujade FA, Bhattachariya A, Bergman O, Gádin JR, et al. The mir-200 family regulates key pathogenic events in ascending aortas of individuals with bicuspid aortic valves. *J Intern Med.* 2019;285(1):102-14.
210. Nigam V, Sievers HH, Jensen BC, Sier HA, Simpson PC, Srivastava D, et al. Altered microRNAs in bicuspid aortic valve: a comparison between stenotic and insufficient valves. *J Heart Valve Dis.* 2010;19(4):459-65.
211. Naito S, Petersen J, Sequeira-Gross T, Neumann N, Duque Escobar J, Zeller T, et al. Bicuspid aortopathy - molecular involvement of microRNAs and MMP-TIMP. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem.* 2020;25(8):711-8.
212. Girdauskas E, Petersen J, Neumann N, Ungelenk M, Kurth I, Reichenspurner H, et al. MiR-145 expression and rare NOTCH1 variants in bicuspid aortic valve-associated aortopathy. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200205.
213. Wu J, Song HF, Li SH, Guo J, Tsang K, Tumiati L, et al. Progressive Aortic Dilation Is Regulated by miR-17-Associated miRNAs. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(25):2965-77.
214. Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson EG, et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol.* 2010;28(4):341-7.
215. Hinkel R, Penzkofer D, Zühlke S, Fischer A, Husada W, Xu QF, et al. Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation.* 2013;128(10):1066-75.
216. Carrion K, Dyo J, Patel V, Sasik R, Mohamed SA, Hardiman G, et al. The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and WNT/ $\beta$ -CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes. *PLoS One.* 2014;9(5):e96577.
217. Lim MSA, Portelli SS, Padang R, Bannon PG, Hambly BD, Jeremy RW, et al. Novel insights into bicuspid aortic valve (BAV) aortopathy: Long non-coding RNAs TUG1 and MIAT are differentially expressed in BAV ascending aortas. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2022;60:107433.
218. Naito S, Petersen J, Sequeira-Gross T, Zeller T, Reichenspurner H, Girdauskas E. Circulating microRNAs vs. aortic diameter in bicuspid aortic valve aortopathy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2022;30(8):947-53.
219. Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, et al. Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. *Circulation.* 2020;141(21):1670-80.
220. 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):1002-12.
221. New SEP, Aikawa E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circ Res.* 2011;108(11):1381-91.



222. Holliday CJ, Ankeny RF, Jo H, Nerem RM. Discovery of shear- and side-specific mRNAs and miRNAs in human aortic valvular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(3):H856-867.
223. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*. 2005;96(7):792-9.
224. Sun L, Chandra S, Sucosky P. Ex vivo evidence for the contribution of hemodynamic shear stress abnormalities to the early pathogenesis of calcific bicuspid aortic valve disease. *PLoS One*. 2012;7(10):e48843.
225. Bosse K, Hans CP, Zhao N, Koenig SN, Huang N, Guggilam A, et al. Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;60:27-35.
226. Sung DC, Bowen CJ, Vaidya KA, Zhou J, Chapurin N, Recknagel A, et al. Cadherin-11 Overexpression Induces Extracellular Matrix Remodeling and Calcification in Mature Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(8):1627-37.
227. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(3):630-4.
228. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(10):843-50.
229. Richards J, El-Hamamsy I, Chen S, Sarang Z, Sarathchandra P, Yacoub MH, et al. Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling. *Am J Pathol*. 2013;182(5):1922-31.
230. Manno G, Bentivegna R, Morreale P, Nobile D, Santangelo A, Novo S, et al. Chronic inflammation: A key role in degeneration of bicuspid aortic valve. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;130:59-64.
231. Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T, Kroon J, Jenkins WSA, Doris MK, et al. Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(17):2150-62.
232. Mahmut A, Boulanger MC, El Hussein D, Fournier D, Bouchareb R, Després JP, et al. Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(5):460-9.
233. Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A, Jo H, Yoganathan AP. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(2):254-60.
234. Mohty D, Pibarot P, Després JP, Côté C, Arsenault B, Cartier A, et al. Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(1):187-93.
235. Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease. *J Immunol Res*. 2015;2015:851945.
236. Yang X, Fullerton DA, Su X, Ao L, Cleveland JC, Meng X. Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(6):491-500.
237. Zhan Q, Song R, Zeng Q, Yao Q, Ao L, Xu D, et al. Activation of TLR3 Induces Osteogenic Responses in Human Aortic Valve Interstitial Cells through the NF- $\kappa$ B and ERK1/2 Pathways. *Int J Biol Sci*. 2015;11(4):482-93.
238. Niepmann ST, Willemsen N, Boucher AS, Stei M, Goody P, Zietzer A, et al. Toll-like receptor-3 contributes to the development of aortic valve stenosis. *Basic Res Cardiol*. 2023;118(1):6.
239. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*. 2004;18(1):99-115.
240. Clément M, Basatemur G, Masters L, Baker L, Bruneval P, Iwawaki T, et al. Necrotic Cell Sensor Clec4e Promotes a Proatherogenic Macrophage Phenotype Through Activation of the Unfolded Protein Response. *Circulation*. 2016;134(14):1039-51.





241. New SEP, Aikawa E. Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2011;75(6):1305-13.
242. Akahori H, Tsujino T, Masuyama T, Ishihara M. Mechanisms of aortic stenosis. *J Cardiol.* 2018;71(3):215-20.
243. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, et al. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(4):885-900.
244. El Hussein D, Boulanger MC, Fournier D, Mahmut A, Bossé Y, Pibarot P, et al. High Expression of the Pi-Transporter SLC20A1/Pit1 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization through Regulation of Akt-1. *PLoS ONE.* 2013;8(1):e53393.
245. Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol.* 2014;30(9):982-93.
246. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kiliç R, et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* 2005;14(2):80-7.
247. Perrotta I, Sciangula A, Aquila S, Mazzulla S. Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Calcified Human Aortic Valves: A Histopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2016;24(2):128-37.
248. Matilla L, Roncal C, Ibarrola J, Arrieta V, García-Peña A, Fernández-Celis A, et al. A Role for MMP-10 (Matrix Metalloproteinase-10) in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(5):1370-82.
249. El Hussein D, Boulanger MC, Mahmut A, Bouchareb R, Laflamme MH, Fournier D, et al. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;72:146-56.
250. Peeters FECM, Meex SJR, Dweck MR, Aikawa E, Crijns HJGM, Schurgers LJ, et al. Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart. *Eur Heart J.* 2018;39(28):2618-24.
251. Côté N, El Hussein D, Pépin A, Goulet-Olarte S, Ducharme V, Bouchard-Cannon P, et al. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(5):1191-202.
252. Moschetta D, Di Maria E, Valerio V, Massaiu I, Bozzi M, Songia P, et al. Purinergic Receptor P2Y2 Stimulation Averts Aortic Valve Interstitial Cell Calcification and Myofibroblastic Activation. *Biomedicines.* 2022;10(2):457.
253. Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(6):828-34.
254. Hofmann JJ, Briot A, Enciso J, Zovein AC, Ren S, Zhang ZW, et al. Endothelial deletion of murine Jag1 leads to valve calcification and congenital heart defects associated with Alagille syndrome. *Dev Camb Engl.* 2012;139(23):4449-60.
255. White MP, Theodoris CV, Liu L, Collins WJ, Blue KW, Lee JH, et al. NOTCH1 regulates matrix gla protein and calcification gene networks in human valve endothelium. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;84:13-23.
256. Schurgers LJ, Uitto J, Reutelingsperger CP. Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends Mol Med.* 2013;19(4):217-26.
257. Kostina A, Shishkova A, Ignatieva E, Irtyuga O, Bogdanova M, Levchuk K, et al. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;114:211-9.
258. Dharmarajan S, Speer MY, Pierce K, Lally J, Leaf EM, Lin ME, et al. Role of Runx2 in Calcific Aortic Valve Disease in Mouse Models. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:687210.
259. Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC), European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J.* 2012;33(19):2451-96.
260. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021-104.
261. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013



- ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S1-45.
262. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(Suppl 1):S62-9.
263. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-12.
264. Stevens PE, Levin A, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*. 2013;158(11):825-30.
265. Zoghbi WA, Adams D, Bonow RO, Enriquez-Sarano M, Foster E, Grayburn PA, et al. Recommendations for Noninvasive Evaluation of Native Valvular Regurgitation: A Report from the American Society of Echocardiography Developed in Collaboration with the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2017;30(4):303-71.
266. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Edvardsen T, Goldstein S, et al. Recommendations on the Echocardiographic Assessment of Aortic Valve Stenosis: A Focused Update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2017;30(4):372-92.
267. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2015;28(1):1-39.e14.
268. Definición, etiología, factores de riesgo y fenotipos de la EPOC. Grupo de trabajo de GesEPOC. *Arch Bronconeumol*. 2017;53:5-11.
269. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2013;28(1):2-17.
270. Warren BA, Yong JL. Calcification of the aortic valve: its progression and grading. *Pathology (Phila)*. 1997;29(4):360-8.
271. García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. McGraw-Hill; 1993.
272. Rodríguez-Carrio J, Carrillo-López N, Ulloa C, Martín-Carro B, Rodríguez-Suárez C, Naves-Díaz M, et al. Novel Immune Cell Subsets Exhibit Different Associations With Vascular Outcomes in Chronic Kidney Disease Patients—Identifying Potential Biomarkers. *Front Med*. 2021;8:618286.
273. Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Ballina-García FJ, Suárez A. Angiogenic T cells are decreased in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(5):921-7.
274. Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Ballina-García FJ, Suárez A. TNF $\alpha$  polymorphism as marker of immunosenescence for rheumatoid arthritis patients. *Exp Gerontol*. 2015;61:123-9.
275. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing (2021).
276. Solache-Berrocal G, Barral-Varela AM, Areces-Rodríguez S, Junco-Vicente A, Vallina-Álvarez A, Corte-Torres MD, et al. Correlation of Micro-Computed Tomography Assessment of Valvular Mineralisation with Histopathological and Immunohistochemical Features of Calcific Aortic Valve Disease. *J Clin Med*. 2019;9(1):29.
277. Proteína Atlas [Internet]. [Citado 1 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000099260-PALMD/tissue>
278. Rai H, Colleran R, Cassese S, Joner M, Kastrati A, Byrne RA. Association of interleukin 6 -174 G/C polymorphism with coronary artery disease and circulating IL-6 levels: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2021;70(10-12):1075-87.
279. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019



- ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019;140(11):e596-646.
280. Yang LT, Ye Z, Wajih Ullah M, Maleszewski JJ, Scott CG, Padang R, et al. Bicuspid aortic valve: long-term morbidity and mortality. *Eur Heart J*. 2023;44(43):4549-62.
281. Aschauer J, Zilberszac R, Gleiss A, Colizzi C, Binder T, Bruno P, et al. Long-Term Outcome of Bicuspid Aortic Valve Disease. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2023;jead312.
282. Glaser N, Jackson V, Eriksson P, Sartipy U, Franco-Cereceda A. Relative survival after aortic valve surgery in patients with bicuspid aortic valves. *Heart Br Card Soc*. 2021;107(14):1167-72.
283. Holmgren A, Enger TB, Näslund U, Videm V, Valle S, Evjemo KJD, et al. Long-term results after aortic valve replacement for bicuspid or tricuspid valve morphology in a Swedish population. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2021;59(3):570-6.
284. Martinsson A, Nielsen SJ, Milojevic M, Redfors B, Omerovic E, Tønnessen T, et al. Life Expectancy After Surgical Aortic Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol*. 2021;78(22):2147-57.
285. Hernández-Vaquero D, Rodríguez-Caulo E, Vigil-Escalera C, Blanco-Herrera Ó, Berastegui E, Arias-Dachary J, et al. Life expectancy after aortic valve replacement in young patients. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed*. 2022;75(4):294-9.
286. Mai Z, Guan L, Mu Y. Association between bicuspid aortic valve phenotype and patterns of valvular dysfunction: A meta-analysis. *Clin Cardiol*. 2021;44(12):1683-91.
287. Verma S, Siu SC. Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *N Engl J Med*. 2014;370(20):1920-9.
288. Martín M, Junco-Vicente A, Rodríguez I. Bicuspid aortopathy in adolescents: Another piece of the puzzle. *Int J Cardiol*. 2021;333:94-5.
289. Hope MD, Hope TA, Crook SES, Ordovas KG, Urbania TH, Alley MT, et al. 4D flow CMR in assessment of valve-related ascending aortic disease. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4(7):781-7.
290. Guzzardi DG, Barker AJ, van Ooij P, Malaisrie SC, Puthumana JJ, Belke DD, et al. Valve-Related Hemodynamics Mediate Human Bicuspid Aortopathy: Insights From Wall Shear Stress Mapping. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(8):892-900.
291. Yan AT, Koh M, Chan KK, Guo H, Alter DA, Austin PC, et al. Association Between Cardiovascular Risk Factors and Aortic Stenosis: The CANHEART Aortic Stenosis Study. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(12):1523-32.
292. Owens DS, Katz R, Takasu J, Kronmal R, Budoff MJ, O'Brien KD. Incidence and progression of aortic valve calcium in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Cardiol*. 2010;105(5):701-8.
293. Thanassoulis G, Massaro JM, Cury R, Manders E, Benjamin EJ, Vasan RS, et al. Associations of long-term and early adult atherosclerosis risk factors with aortic and mitral valve calcium. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(22):2491-8.
294. Khurrami L, Møller JE, Lindholt JS, Urbonaviciene G, Steffensen FH, Lambrechtsen J, et al. Cross-sectional study of aortic valve calcification and cardiovascular risk factors in older Danish men. *Heart Br Card Soc*. 2021;107(19):1536-43.
295. Eveborn GW, Schirmer H, Lunde P, Heggelund G, Hansen JB, Rasmussen K. Assessment of risk factors for developing incident aortic stenosis: the Tromsø Study. *Eur J Epidemiol*. 2014;29(8):567-75.
296. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18138-44.
297. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:797-819.
298. Mahler GJ, Farrar EJ, Butcher JT. Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(1):121-30.
299. Pawade TA, Doris MK, Bing R, White AC, Forsyth L, Evans E, et al. Effect of Denosumab or Alendronic Acid on the Progression of Aortic Stenosis: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Circulation*. 2021;143(25):2418-27.



300. Diederichsen ACP, Lindholt JS, Möller S, Øvrehus KA, Auscher S, Lambrechtsen J, et al. Vitamin K2 and D in Patients With Aortic Valve Calcification: A Randomized Double-Blinded Clinical Trial. *Circulation*. 2022;145(18):1387-97.
301. REDNVIA Co., Ltd. An Adaptive Phase 2/3 Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized, Parallel, 3 Arm Study to Evaluate the Efficacy and Safety of DA-1229 (Evogliptin) in Patient's Calcific Aortic Valve Disease With Mild to Moderate Aortic Stenosis (EVOID-AS) [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2023 abr [citado 1 de diciembre de 2023]. Report No.: NCT05143177.
302. Cueff C, Serfaty JM, Cimadevilla C, Laissy JP, Himbert D, Tubach F, et al. Measurement of aortic valve calcification using multislice computed tomography: correlation with haemodynamic severity of aortic stenosis and clinical implication for patients with low ejection fraction. *Heart Br Card Soc*. 2011;97(9):721-6.
303. Niu W, Liu Y, Qi Y, Wu Z, Zhu D, Jin W. Association of interleukin-6 circulating levels with coronary artery disease: a meta-analysis implementing mendelian randomization approach. *Int J Cardiol*. 2012;157(2):243-52.
304. Podolec J, Baran J, Siedlinski M, Urbanczyk M, Krupinski M, Bartus K, et al. Serum rantes, transforming growth factor- $\beta$ 1 and interleukin-6 levels correlate with cardiac muscle fibrosis in patients with aortic valve stenosis. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2018;69(4).
305. Bossé Y, Miqdad A, Fournier D, Pépin A, Pibarot P, Mathieu P. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(5):489-98.
306. Coté N, Mahmut A, Bosse Y, Couture C, Pagé S, Trahan S, et al. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation*. 2013;36(3):573-81.
307. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnerio P, Humphries SE, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(1):255-9.
308. Sarkar A, Chowdhury S, Kumar A, Khan B, Chowdhury S, Gupta R, et al. Biomarkers as Prognostic Markers for Aortic Stenosis: A Review. *Am J Cardiol*. 2023;206:53-9.
309. Lurins J, Lurina D, Tretjakovs P, Mackevics V, Lejnicks A, Rapisarda V, et al. Increased serum chemerin level to predict early onset of aortic valve stenosis. *Biomed Rep*. 2018;8(1):31-6.
310. Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD-evidence for premature ageing? *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(11):661-70.
311. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004;109(18):2175-80.
312. Abedin M, Omland T, Ueland T, Khera A, Aukrust P, Murphy SA, et al. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am J Cardiol*. 2007;99(4):513-8.
313. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(12):1998-2003.
314. Aoki A, Murata M, Asano T, Ikoma A, Sasaki M, Saito T, Otani T, Jinbo S, Ikeda N, Kawakami M, Ishikawa SE. Association of serum osteoprotegerin with vascular calcification in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:11.
315. Ueland T, Dahl CP, Kjekshus J, Hulthe J, Böhm M, Mach F, et al. Osteoprotegerin predicts progression of chronic heart failure: results from CORONA. *Circ Heart Fail*. 2011;4(2):145-52.
316. Ueland T, Aukrust P, Dahl CP, Husebye T, Solberg OG, Tønnessen T, Aakhus S, Gullestad L. Osteoprotegerin levels predict mortality in patients with symptomatic aortic stenosis. *J Intern Med*. 2011;270(5):452-60.
317. Loudon BL, Ntatsaki E, Newsome S, Halliday B, Lota A, Ali A, et al. Osteoprotegerin and Myocardial Fibrosis in Patients with Aortic Stenosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):14550.
318. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2009;84(3):353-60.
319. Thériault S, Gaudreault N, Lamontagne M, Rosa M, Boulanger MC, Messika-Zeitoun D, et al. A transcriptome-wide association study identifies



- PALMD as a susceptibility gene for calcific aortic valve stenosis. *Nat Commun.* 2018;9(1):988.
320. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Stefansson OA, Tragante V, Thorolfsson RB, et al. Genome-wide analysis yields new loci associating with aortic valve stenosis. *Nat Commun.* 2018;9(1):987.
321. Chignon A, Rosa M, Boulanger MC, Argaud D, Devillers R, Bon-Baret V, et al. Enhancer-associated aortic valve stenosis risk locus 1p21.2 alters NFATC2 binding site and promotes fibrogenesis. *iScience.* 2021;24(3):102241.
322. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J.* 2010;31(23):2844-53.
323. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA.* 2009;301(22):2331-9.
324. Kronenberg F, Mora S, Stroes ESG, Ference BA, Arsenault BJ, Berglund L, et al. Lipoprotein(a) in atherosclerotic cardiovascular disease and aortic stenosis: a European Atherosclerosis Society consensus statement. *Eur Heart J.* 2022;43(39):3925-46.
325. Thériault S, Dina C, Messika-Zeitoun D, Le Scouarnec S, Capoulade R, Gaudreault N, et al. Genetic Association Analyses Highlight IL6, ALPL, and NAV1 As 3 New Susceptibility Genes Underlying Calcific Aortic Valve Stenosis. *Circ Genom Precis Med.* 2019;12(10):e002617.
326. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2013;368(6):503-12.
327. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80.
328. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2035.
329. Bäck M, Yurdagül A, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(7):389-406.
330. Hewing B, Au SC, Ludwig A, Ellerbroek R, van Dijk P, Hartmann L, Grubitzsch H, Giannini C, Laule M, Stangl V, Baumann G, Stangl K. Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes. *J Cardiovasc Transl Res.* 2017;10(1):27-34.
331. Wallby L, Janerot-Sjöberg B, Steffensen T, Broqvist M. T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart Br Card Soc.* 2002;88(4):348-51.
332. Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001;167(6):3231-8.
333. Dumitriu IE. The life (and death) of CD4+ CD28(null) T cells in inflammatory diseases. *Immunology.* 2015;146(2):185-93.
334. Dumitriu IE, Araguás ET, Baboonian C, Kaski JC. CD4+ CD28 null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. *Cardiovasc Res.* 2009;81(1):11-9.
335. Cao M, Ruan L, Huang Y, Wang J, Yan J, Sang Y, et al. Premature CD4+ T Cells Senescence Induced by Chronic Infection in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Aging Dis.* 2020;11(6):1471-80.
336. 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 Baltim Md 1950.* 2011;187(2):1006-14.
337. Garrido-Rodríguez V, Herrero-Fernández I, Castro MJ, Castillo A, Rosado-Sánchez I, Galvá MI, et al. Immunological features beyond CD4/CD8 ratio values in older individuals. *Aging.* 2021;13(10):13443-59.
338. Tylutka A, Morawin B, Wawrzyniak-Gramacka E, Wacka E, Nowicka W, Hiczkiewicz J, et al. Immunosenescence in Aging-Related Vascular Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13269.
339. López P, Rodríguez-Carrión J, Martínez-Zapico A, Caminal-Montero L, Suarez A. Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Leukoc Biol.* 2016;99(3):405-12.



340.de Boer SA, Reijrink M, Abdulahad WH, Hoekstra ES, Slart RHJA, Heerspink HJL, et al. Angiogenic T cells are decreased in people with type 2 diabetes mellitus and recruited by the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor Linagliptin: A

subanalysis from a randomized, placebo-controlled trial (RELEASE study). *Diabetes Obes Metab.* 2020;22(7):1220-5.

**Anexo**

---







## 1. Aprobación del Comité de Ética

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE SALUD

Dirección General de Calidad,  
Transformación y Gestión del  
Conocimiento

Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias

Hospital Universitario Central de Asturias

N-1, S3.19

Avda. de Roma, s/n

33011 Oviedo

Tfno: 9851079 27 (ext. 37927/38028),

ceim.asturias@asturias.org

Oviedo, 23 de junio de 2021

El Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Principado de Asturias, ha revisado el Proyecto (Tesis Doctoral) –cód CEImPA 2021.346, titulado "Estudio de PostGrado (Tesis Doctoral) de la Universidad de Oviedo: Fisiopatología de la estenosis en la válvula aórtica bicúspide: estudio sobre tejido y análisis genético y de biomarcadores en sangre periférica.". Investigador Principal Alejandro Junco Vicente, Hospital Universitario Central de Asturias.

El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado proyecto reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y en consecuencia emite su autorización.

Los Consentimientos informados deberán firmarse por duplicado (para dejar constancia de ello) y una copia deberá ser archivada con la documentación del estudio.

Le recuerdo que deberá guardarse la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este proyecto.

Fdo: PABLO ISIDRO MARRÓN  
Secretario del Comité de Ética de la Investigación  
del Principado de Asturias

