

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Claves moleculares del aneurisma aórtico torácico: del
desarrollo silente a la identificación de marcadores
diagnósticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ariadna Martín Blázquez

DIRIGIDA POR

Gloria Álvarez Llamas
Marta Martín Lorenzo

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

CLAVES MOLECULARES DEL ANEURISMA AÓRTICO TORÁCICO: DEL
DESARROLLO SILENTE A LA IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DIAGNÓSTICOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

ARIADNA MARTÍN BLÁZQUEZ

DIRECTORAS

Dra. GLORIA ÁLVAREZ LLAMAS

Dra. MARTA MARTÍN LORENZO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina



**Claves moleculares del aneurisma aórtico torácico: del
desarrollo silente a la identificación de marcadores
diagnósticos**

Ariadna Martín Blázquez

Directoras

Dra. Gloria Álvarez Llamas y Dra. Marta Martín Lorenzo

A mis padres,
A mi hermano,
A Samuel

Labor omnia vincit

AGRADECIMIENTOS

Quizá Don Quijote lo definiría como una gran pelea frente a molinos gigantes o, bajo este mismo emblema, todo podría ser una realidad esperpéntica donde, querido Max Estrella, aquí todo depende del espejo en el que lo mires. Otros podrían cantarlo como se cantaban aquellas batallas del mío Cid. Cinco horas con Mario no son suficientes para disertación de tal calibre...

Creo que no hay nada más altruista que aquellas personas que te regalan parte de su conocimiento para que lo hagas tuyo. Ese conocimiento, generado de la propia experiencia de cada uno, es el regalo más generoso que uno puede recibir. Por eso, con todo el respeto, cariño y admiración, gracias a todas aquellas personas que han dedicado y dedican su tiempo a compartir pequeños pedazos de su sabiduría conmigo. Me hacéis ser mejor.

Esta tesis doctoral nunca hubiera sido posible sin la confianza y la oportunidad de mis directoras de tesis: Gloria y Marta. Gracias. Han sido muchos años de experimentos, dolores de cabeza, discusiones científicas y trabajo duro, pero, sin duda, me quedo con todo el trabajo conseguido, con todos aquellos momentos en los que hemos saltado de felicidad, celebrado los logros y disfrutado de las alegrías.

Me gustaría agradecer al Servicio de Cirugía Cardíaca de la FJD el proporcionarnos las muestras que han hecho posible este trabajo. Gonzalo, Alicia y Ángeles: gracias, porque sin vuestro esfuerzo y dedicación esto no habría sido posible. Y, por supuesto, gracias a todos los pacientes que, de forma tan generosa y solidaria, contribuyen de manera incalculable al avance de la ciencia. Gracias.

Por todos tus consejos, tus palabras de consuelo, esa manera de ver la vida, por confiar siempre en mí... Has sido una parte muy importante durante todos estos años. Gracias, Van.

Ni qué decir tiene que esto jamás hubiera sido lo mismo sin ese compañero que todo lo da, que siempre que necesitas ayuda deja de hacer sus cosas para ayudarte a conseguir las tuyas, que en los días de desesperación es el primero en regalarte una historia, un momento o darte una mano amiga; siempre pendiente, siempre dispuesto, siempre atento. Sergio, eres el mejor compañero que he podido tener y un amigo para siempre.

Niña, como un destello de luz y alegría llegaste a mi vida. Qué barbaridad. Qué fortuna la mía la de encontrarte en este camino. No puedo más que agradecerte que seas la mejor compañera que he podido tener, Rocío. Por estar siempre ahí, por confiar en mí, por hacer del día a día un trabajo en equipo constante, por entendernos, respetarnos, acompañarnos, escucharnos, reírnos y aconsejarnos. Eres un regalo de amiga.

Cuántas risas esparcidas por ahí, cuántas gotas de sudor que sabían a alegría, cuántos momentos de ayuda y compañía, amiga. Gracias, Lucía. Eres la pequeña más grande.

Óscar, cual tsunami cada día, parece que hemos sorteado la ola. Gracias por cada momento que nos has regalado.

Quién nos iba a decir que al final acabaríamos reconociendo que algo bien nos llevamos, Emilio. Ha sido un lujo compartir contigo discusiones, pensamientos, aventuras, alguna que otra cabezonería y verte triunfar como el gran científico que eres. Gracias.

Gracias Alma y Arancha, por hacer de mi entrada al laboratorio algo tan sencillo y por enseñarme el camino.

Gracias a todos y cada uno de mis compañeros y amigos de la FJD con los que tantas horas de pasillos, conversaciones y momentos he compartido: Lucía, Marta, Jose, Toño, Sara, Zahara, Dani, MJ, Sandra, Irene, Isa, Lucía, Antonio, Isma, Luis, Nerea, Manu... Sois personas gigantes, gracias por toda vuestra compañía, toda vuestra ayuda y apoyo siempre.

Julia, gracias por saber siempre darme consuelo, por tus ánimos inagotables, por tu capacidad para escucharme y apoyarme en los días malos; por compartir juntas tantos momentos. Eres la que hace posible que todo siga en pie cada mañana, la que siempre está para ayudar en lo que haga falta; eres un regalo para todos. Gracias, siempre.

Gracias a todos los compañeros de la Unidad de Histopatología del CNIO, por abrirme las puertas de su laboratorio, ayudarme y tratarme como a una más sin dudarlo ni un instante.

Y cual torbellino de energía madrugadora, no puedo avanzar en estas letras sin darte la gracias, Juan Antonio. Es tu mezcla de personalidad e inteligencia la que hace que seas una persona tan especial y no he podido ser más afortunada al poder compartir parte de este camino contigo. Gracias por todo tu tiempo, todas tus enseñanzas, tus palabras, tu confianza y tu siempre disponibilidad y apoyo. Alessia, eres, para mí, uno de los mayores ejemplos de resistencia. Gracias por abrirme las puertas desde el primer momento, por tu generosidad y por cada una de nuestras palabras. Tranquilo Rafa, que la montaña rusa de emociones predoctorales se acaba y quizás ahora podríamos empezar a hablar sin condicionales. Eres un científico brillante y estoy segura de que vas a triunfar donde vayas. Gracias.

Marisa, ya no sé ni cuántos días estuvimos mano a mano detrás de un microscopio en la búsqueda de unas mitocondrias que se nos resistían... No tengo palabras de agradecimiento suficientes que darte por todo tu trabajo, toda tu ayuda, toda tu disposición y todos nuestros momentos de trabajo y búsqueda incesante. Gracias.

Y en el principio de toda esta historia..., "Dale limosna, mujer, que no hay en la vida nada, como la pena de ser, ciego en Granada". Pepe, fuiste mi maestro en mis primeros años como científica, cuando era un libro con hojas en blanco en el que escribir. Me enseñaste todo lo que sabías y confiaste en mí para trabajar juntos, día a día. Creo que nunca podré agradecerte lo suficiente todo lo que me hiciste crecer, todo lo que peleaste por mí y todo lo que me enseñaste para poder llegar a estar donde estoy ahora. Gracias. Y de Granada a Almería y de Almería a Granada... Qué suerte que otra de las personas que me han hecho llegar hasta donde estoy hoy hayas sido tú, Caridad. Tu amistad, tu bondad, tus enseñanzas, tu disposición siempre para ayudarme..., son uno de los mayores regalos que llevo conmigo. Gracias.

Gracias a toda la Fundación MEDINA por darme la oportunidad de dar mis primeros pasos y, en especial, gracias a Patri, Jocepi, Rachel, Yoel, Clara y Berna por su amistad y su alegría de vivir.

Y si de principios van estas frases, qué principio más bonito el que nació entre las cuatro paredes de aquella clase. Primer día de universidad, nada era como te habías imaginado, todo era un misterio, de una inmensidad inconmensurable, pero allí estaban: mis amigas. Dicen que los amigos de la universidad son para siempre y no puedo estar más de acuerdo. Cuántos ratos de felicidad me has regalado, Lorena; cuánta sabiduría, bondad y alegría hay en ti, Pinitis; qué calma y templanza, qué capacidad para dar paz y rebosar amistad a partes iguales, Pauchi; y qué fantasía de complementariedad, de amistad a raudales, de audios de una cantidad de minutos incontables, de sinceridad y de compañía; qué manera de estar siempre ahí, de saber las palabras justas que decir; qué manera de ser la mejor amiga, Cris. Qué suerte la mía al teneros como amigas. Gracias.

Y ya no hablo de bioquímica (o sí), hablo de la vida. Qué bonita la vida cuando te regala una amistad como la que tenemos esos que nos hacemos llamar los más uno y los que son el punto de origen. Qué maravilla cómo, de repente, el origen se ha convertido en un camino increíble de amistad, en la que dar la mano y apoyarnos los unos a los otros es algo tan natural como la vida misma. Esos amigos que se van de vacaciones juntos, crecen viendo cómo la vida se va llenando de recuerdos, alegrándose siempre por los logros conseguidos y consolando y dando palabras de aliento en los no tan buenos momentos; esos amigos que compiten como herramienta para darle magia a la vida,

pero que si de amistad se refiere..., no hay competición posible. Gracias por hacer de este grupo un grupo sin igual; por cada manera de ser que nos complementa a todos uno a uno.

Como un lema que ha venido para quedarse, como ese aire puro que respiramos cada verano cuando hace su aparición estelar San Roque: no importa lo perdidos que estemos, porque siempre seremos amigos. Gracias por ser oasis en el momento justo, por todas las confesiones, por todas las aventuras vividas, por todas las canciones cantadas, por todos los kilómetros bailados, por todas y cada una de las veces que siempre decimos: tenemos que vernos más, porque los paseos en bici y las estrellas en el cielo no son los mismo si no son con vosotros en Salmoral. Crecer con vosotros es tan gratificante como lo es la grandeza de todos y cada uno. Sois increíbles, amigos.

Diana, aquellas pistas de tenis nos unieron para siempre, porque no importa lo que pase ni el tiempo que pase; eres la definición de amistad. Gracias por estar siempre, por tus palabras de ánimo y de amistad, por tu manera de hacer las cosas especiales. Gracias.

Gracias a mi familia, que siempre está ahí, que me hacen sentir siempre tan querida, tan arropada y tan afortunada... Gracias; gracias por cada momento juntos, por cada enseñanza, por estar siempre.

Nunca entendería la vida si no tuviese a mi lado a mi hermano. Oficialmente, es mi hermano pequeño, pero de pequeño no tiene nada. Javier, eres el mejor hermano que podría tener. Tu inteligencia a raudales, tu disponibilidad para estar siempre, tu generosidad, tu gracia innata, esa manera en la que eres amigo de tus amigos, nuestras aventuras de hermanos incansables..., son solo algunas cosas que te hacen ser tan especial. Gracias por escucharme aun cuando no tienes ni idea de lo que te estoy contando, por ayudarme siempre, por acompañarme sin ni siquiera saber a dónde muchas veces, por preocuparte por mí y darme siempre tu apoyo. Estoy muy orgullosa de ti.

Gracias, papá y mamá. Gracias por educarnos en los valores del esfuerzo, del trabajo bien hecho, de la pelea constante para conseguirlo, pero siempre tratando de ser lo más felices posible sin dejar de ser una buena persona. Gracias por hacer el camino fácil y proporcionarme siempre esa felicidad, por estar incondicionalmente en cada momento, por quererme tan bien y hacerme tan grande, aun cuando ni yo me lo creo; por ser el ejemplo de amor y de superación más grande del que puedo aprender. Papá, gracias por tu humor, tu ironía y tu manera de querer; gracias por dejar que me hiciese del Atlético de Madrid, a pesar de todas tus advertencias; por hacernos crecer con la disciplina, la solidaridad y la generosidad como bandera. Mamá, tu ejemplo de bondad y fortaleza no tiene límites. Tu capacidad de resiliencia, de preocuparte siempre por los demás sin pedir nada a cambio o tu capacidad para hacer el camino fácil es algo que nunca dejará de fascinarme. Gracias por cada lección de valentía, de amor incondicional, de superación, de trabajo duro... Creo que nunca podría encontrar las palabras suficientes para agradeceros por todo lo que hacéis por nosotros.

Esto también es para mis abuelos, que sé que su sitio está aquí en la primera fila. Gracias por hacerme la niña más feliz.

Y, por último, gracias a ti, Samuel. Creo que nunca podré explicarte toda la admiración, orgullo y amor que siento por ti. Gracias por sostenerme en los peores días y celebrar juntos los mejores; por ser siempre el que me da paz y me pide guerra para ser mejor; por impulsarme cuando más lo necesito; por ser capaz de sacarme la mejor risa, que puede ser revolucionaria... Gracias por escucharme y hacer de ello una prueba de resiliencia y valentía; por acompañarme y por respetarme. Gracias por tu inteligencia inspiradora; por hacer que quiera ser mejor cada día. Gracias por ser la mejor persona con la que tengo el honor de compartir mi vida; por quererme como me quieres. Que los mejores momentos sean los que, juntos, estén por llegar. Te quiero.

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE.....	19
RESUMEN	25
SUMMARY	29
ABREVIATURAS	33
INTRODUCCIÓN.....	47
1. Estructura de la pared arterial.....	49
2. La aorta.....	51
3. El aneurisma aórtico torácico (AAT)	52
3.1. Clasificación.....	53
3.2. Mecanismos y fisiopatología.....	54
3.4. Diagnóstico, prevención y tratamiento.....	59
HIPÓTESIS.....	63
OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1. Selección de pacientes y obtención de muestras	73
2. Análisis diferencial de las células musculares lisas vasculares (CMLVs) de aorta en el AAT asociado a VAT y VAB y traslación a biopsia líquida	74
2.1. Cultivos primarios de CMLVs de aorta.....	74
2.1.1. Obtención de cultivos celulares primarios.....	74
2.1.2. Caracterización de CMLVs mediante inmunofluorescencia.....	74
2.2. Proteómica cuantitativa con marcaje isobárico y espectrometría de masas no dirigida.....	75
2.2.1. Extracción proteica, digestión y marcaje de péptidos.....	75
2.2.2. Análisis por espectrometría de masas.....	76
2.2.3. Identificación de péptidos.....	76
2.2.4. Análisis cuantitativo de péptidos y proteínas	77
2.2.5. Biología de sistemas.....	77
2.2.6. Análisis estadístico.....	77
2.2.7. Mapeo de proteínas en la estructura celular	77
2.3. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	78
2.4. Daño oxidativo del ADN celular.....	79
2.5. Perfil del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	79
3. Análisis de la funcionalidad mitocondrial en el AAT asociado a VAT y VAB.....	81
3.1. Enriquecimiento de mitocondrias de tejido aórtico.....	81
3.1.1. Obtención de fracciones mitocondriales enriquecidas.....	81
3.1.2. Evaluación de la pureza mitocondrial.....	81
3.1.2.1. Western blot.....	81
3.1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión	82
3.2. Proteómica cuantitativa con marcaje isobárico y espectrometría de masas no dirigida.....	82

3.3. Caracterización morfológica de las mitocondrias.....	83
3.4. Número de copias de ADN mitocondrial.....	83
3.4.1. Extracción de ADN	83
3.4.2. Cuantificación y pureza del material genético	83
3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real	83
3.5. Potencial de membrana mitocondrial.....	84
3.6. Generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno.....	84
3.7. Respiración mitocondrial	85
4. Análisis del uso diferencial de la glucosa en el AAT asociado a VAT y VAB	87
4.1. Metabolómica cuantitativa no dirigida mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)	87
4.1.2. Extracción de metabolitos.....	87
4.1.3. Análisis por espectrometría de masas.....	87
4.1.4. Procesamiento de datos.....	88
4.1.5. Identificación de metabolitos y confirmación por MS/MS	88
4.2. Metabolómica cuantitativa dirigida mediante LC-MS/MS en modo de monitorización de reacción seleccionada (SRM).....	88
4.2.1. Extracción de metabolitos.....	88
4.2.2. Sintonización de estándares comerciales.....	89
4.2.3. Análisis por SRM-LC-MS/MS.....	89
4.3. Análisis de la expresión génica.....	91
4.3.1. Extracción de ARN.....	91
4.3.2. Cuantificación y pureza del material genético	91
4.3.3. Retrotranscripción: síntesis de ADN complementario	91
4.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real	91
4.4. Actividad enzimática.....	92
4.5. Cuantificación subcelular de glucógeno	92
4.6. Ensayos de productos finales de reacción: Lactato y NADP ⁺ /NADPH.....	92
4.7. Histología de tejidos mediante tinción con Alcian Blue	92
5. Análisis estadísticos.....	95
RESULTADOS.....	97
A) ANÁLISIS DIFERENCIAL DE LAS CMLVs DE AORTA EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB Y TRASLACIÓN A BIOPSIA LÍQUIDA	99
1. Las CMLVs presentan un fenotipo diferencial en el AAT asociado a VAB.....	101
2. La maquinaria del ADN muestra alteraciones en el AAT asociado a VAB.....	102
3. El estrés oxidativo es característico del AAT asociado a VAB	105
4. El ADN de las CMLVs de VAB presenta daño oxidativo.....	107
5. El ciclo celular está detenido en el AAT asociado a VAB	108
6. Los cambios observados en las proteínas de las CMLVs de aortas de pacientes con AAT son transferibles al plasma como herramienta diagnóstica.....	111
B) ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB .	115
1. Las mitocondrias de tejido aórtico de pacientes con AAT asociado a VAT y VAB tienen comprometidas de forma diferencial la cadena respiratoria, la biogénesis, la estructura y el metabolismo mitocondrial.....	116
2. Las mitocondrias del AAT asociado a VAT y VAB muestran características morfológicas diferenciales.....	120
3. La funcionalidad de las mitocondrias muestra patrones diferenciales en el desarrollo del aneurisma asociado a VAT y VAB.....	122

C) ANÁLISIS DEL USO DIFERENCIAL DE LA GLUCOSA EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB ...	125
1. Los pacientes con AAT asociado a VAT y VAB presentan huellas metabólicas plasmáticas diferenciales.....	125
2. Los marcadores plasmáticos del AAT asociado a VAB y VAT tienen capacidad diagnóstica	131
3. El metabolismo de la glucosa es distinto en pacientes con AAT asociado a VAT y VAB	134
3.1. Metabolismo del glucógeno.....	134
3.2. Glucólisis	136
3.3. Ruta de las pentosas fosfato	137
3.4. Ruta biosintética de las hexosaminas	137
DISCUSIÓN	139
1. Las CMLVs en el desarrollo del AAT asociado a VAT y VAB.....	141
1.1. Efecto del flujo diferencial en la aorta de pacientes con AAT asociado a VAB	141
1.2. Fenotipo de estrés, homeostasis proteica y señalización celular en el AAT asociado a VAB.....	141
1.3. Estrés oxidativo, daño en el ADN, arresto del ciclo y muerte celular en el AAT asociado a VAB.....	142
1.4. El plasma refleja las variaciones proteicas identificadas en las CMLVs y evidencia un diagnóstico diferencial de los pacientes con AAT.....	143
1.5. Perspectivas clínicas de los pacientes con VAB.....	145
2. El papel de la mitocondria en el desarrollo del AAT asociado a VAT y VAB.....	147
2.1. Reprogramación metabólica y adaptación estructural.....	147
2.2. Remodelado morfológico mitocondrial y localización respecto al núcleo celular	149
2.3. Disfunción mitocondrial y mecanismos compensatorios mitocondriales.....	150
3. Perfil metabólico diferencial en el AAT asociado a VAT y VAB.....	153
3.1. Las acilcarnitinas en pacientes con VAT y los lisofosfolípidos en pacientes con VAB definen las huellas metabólicas plasmáticas del AAT	153
3.2. Uso de la glucosa a través de la vía biosintética de las hexosaminas en el aneurisma aórtico torácico asociado a VAT	154
3.3. Uso de la glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato y la vía biosintética de las hexosaminas en pacientes con aneurisma aórtico torácico y VAB	155
4. Mecanismos subyacentes al AAT asociado a VAT y VAB y posibles dianas terapéuticas ..	158
4.1. Aneurisma aórtico torácico asociado a VAT	158
4.2. Aneurisma aórtico torácico asociado a VAB	161
CONCLUSIONES	167
LIMITACIONES.....	171
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	175
BIBLIOGRAFÍA.....	179
ANEXOS.....	201
PUBLICACIONES Y CONGRESOS	205
FINANCIACIÓN	211

RESUMEN

El aneurisma aórtico torácico (AAT) es una dilatación progresiva de la aorta torácica, silenciosa y asintomática, con consecuencias fatales si se rompe o se disecciona. La gran mayoría de los AAT son idiopáticos. Sin embargo, existe una mayor incidencia en presencia de una válvula aórtica bicúspide (VAB), en vez de la válvula habitual, la válvula tricúspide (VAT), por causas desconocidas. La detección del AAT suele ser fortuita y su diagnóstico y estimación del riesgo solo son posibles mediante técnicas de imagen clínica. Sin embargo, el diámetro de la aorta no es suficiente para predecir la disección o ruptura y prevenir un desenlace fatal. En la actualidad, no hay marcadores diagnósticos o pronósticos disponibles y el tratamiento consiste principalmente en cirugía profiláctica. Esta falta de marcadores y tratamientos farmacológicos eficaces se debe, en parte, al conocimiento limitado de los mecanismos patogénicos subyacentes al AAT.

El objetivo de esta tesis doctoral es estudiar los mecanismos operantes en el desarrollo del AAT a través de un enfoque multidisciplinar y analizar los mecanismos comunes y diferenciales entre los pacientes que presentan dilatación aórtica asociada a VAT o VAB. En particular, hemos analizado las células musculares lisas vasculares como componente celular principal de la capa media arterial, la mitocondria como unidad funcional energética y el metabolismo aórtico y su reflejo en un fluido biológico como el plasma.

Los resultados obtenidos han mostrado que el aneurisma asociado a VAT se caracteriza por presentar un eje predominantemente inflamatorio-degenerativo. La desviación del metabolismo de la glucosa hacia la vía biosintética de las hexosaminas promueve la acumulación de glicosaminoglicanos en la media aórtica que, aunque inicialmente tiene una función protectora, acaba incrementando el estrés intramural y contribuyendo a la fragilidad de la pared aórtica. En paralelo, se evidencia una glucólisis activa, reflejada en el aumento de lactato, que sostiene la producción de ATP. Las mitocondrias de pacientes con VAT-AAT presentan una disfunción compensada mediante el aumento del número de mitocondrias y la reprogramación hacia la β -oxidación de ácidos grasos; todo ello destinado a mantener el rendimiento energético pese a la disfunción subyacente. Esta flexibilidad metabólica preserva la viabilidad celular a corto plazo, pero a largo plazo favorece rigidez, inflamación y degeneración de la pared aórtica. Esto se manifiesta con un aumento de acilcarnitinas plasmáticas y de las proteínas BGN y CCDC80 tanto en las células musculares lisas vasculares como en plasma. La miristoilcarnitina y la proteína FAP se proponen como marcadores de diagnóstico y progresión del AAT en estos pacientes.

El aneurisma asociado a VAB se caracteriza por presentar estrés en el retículo endoplásmico y un entorno de estrés oxidativo exacerbado, que induce daño en el ADN y una detención del ciclo celular en la fase S, lo que favorece la apoptosis y pérdida de las células musculares lisas vasculares. Estos procesos confluyen en un envejecimiento prematuro de la pared aórtica. Las mitocondrias de estos pacientes muestran una adaptación estructural y funcional con el objetivo de sostener la producción de ATP en condiciones de estrés, pero que culmina en disfunción mitocondrial. La producción de NADPH a través de la utilización de glucosa mediante la ruta de las pentosas fosfato y la interacción de la ruta biosintética de las hexosaminas con el metabolismo de la glutamina apuntan a un intento de sostener la biosíntesis de lípidos y nucleótidos y contrarrestar parcialmente el estrés oxidativo. Sin embargo, estas adaptaciones, inicialmente protectoras, favorecen finalmente la apoptosis de las células musculares, dando lugar a una pared más frágil y envejecida con un patrón de remodelado insuficiente frente a la agresión oxidativa. Esto se manifiesta con un aumento de lisoglicerofosfolípidos (LPCs y LPEs) en el plasma y en la alteración de las proteínas C1QTNF5

y LAMA2 en las células musculares y el plasma. La proteína C1QTNF5 se propone como marcador de diagnóstico y seguimiento del AAT en estos pacientes.

Los datos integrados en esta tesis doctoral, obtenidos de los análisis ómicos y funcionales de tejido aórtico, células musculares lisas vasculares, mitocondrias y plasma humanos, muestran que, aunque ambos subtipos de aneurisma comparten un núcleo patogénico, las trayectorias moleculares y metabólicas que dan lugar al desarrollo del AAT difieren en función del tipo valvular asociado. Esto pone de manifiesto la necesidad de un diagnóstico diferencial y de enfoques terapéuticos personalizados para los pacientes con AAT asociado a VAT o VAB, que deben, por tanto, tratarse como dos entidades clínicas diferentes.

Mientras que en los pacientes VAT-AAT se proponen estrategias dirigidas a reducir la acumulación de glicosaminoglicanos, modular la inflamación y optimizar la función mitocondrial, en los pacientes con VAB-AAT cobran especial relevancia las terapias antioxidantes y las dirigidas a romper el círculo especies reactivas de oxígeno-estrés del retículo endoplásmico -daño en el ADN.

SUMMARY

Thoracic aortic aneurysm (TAA) is a progressive dilatation of the thoracic aorta, silent and asymptomatic, with fatal consequences if it ruptures or dissects. The vast majority of TAAs are idiopathic. However, there is a higher incidence in the presence of a bicuspid aortic valve (BAV) rather than the usual tricuspid valve (TAV), for unknown reasons. TAA detection is usually incidental, and its diagnosis and risk assessment are only possible using clinical imaging techniques. However, the diameter of the aorta is not sufficient to predict dissection or rupture and prevent a fatal outcome. Currently, there are no diagnostic or prognostic markers available, and treatment consists mainly of prophylactic surgery. This lack of markers and effective pharmacological treatments is due, in part, to the limited knowledge of the pathogenic mechanisms underlying TAA.

The objective of this doctoral thesis is to study the mechanisms involved in the development of TAA through a multidisciplinary approach and analyzing the common and differential mechanisms between patients with aortic dilatation associated with TAV or BAV. We have analyzed vascular smooth muscle cells as the main cellular component of the arterial media layer, mitochondria as the functional energy unit, and aortic metabolism, and its reflection in a biological fluid such as plasma.

The results obtained have shown that TAV-associated aneurysms are characterized by a predominantly inflammatory-degenerative axis. The shift of glucose metabolism towards the hexosamine biosynthetic pathway promotes the accumulation of glycosaminoglycans in the aortic media, which, although initially having a protective function, ultimately increases intramural stress and contributes to the fragility of the aortic wall. At the same time, active glycolysis is evident, reflected in increased lactate, which sustains ATP production. The mitochondria of TAV-TAA patients exhibit dysfunction compensated by an increase in the number of mitochondria and reprogramming toward fatty acid β -oxidation, all aimed at maintaining energy output despite the underlying dysfunction. This metabolic flexibility preserves short-term cell viability, but in the long term it promotes stiffness, inflammation, and degeneration of the aortic wall. This manifests as an increase in plasma acylcarnitines and proteins BGN and CCDC80 in both vascular smooth muscle cells and plasma. Myristoylcarnitine and FAP protein are proposed as markers for the diagnosis and progression of TAA in these patients.

Aneurysms associated with BAV are characterized by stress in the endoplasmic reticulum and an exacerbated oxidative stress environment, which induces DNA damage and cell cycle arrest in the S phase, promoting apoptosis and loss of vascular smooth muscle cells. These processes converge in premature aging of the aortic wall. The mitochondria of these patients show structural and functional adaptation aimed at sustaining ATP production under stressful conditions, but this ultimately leads to mitochondrial dysfunction. The production of NADPH through the utilization of glucose via the pentose phosphate pathway and the interaction of the hexosamine biosynthetic pathway with glutamine metabolism point to an attempt to sustain lipid and nucleotide biosynthesis and partially counteract oxidative stress. However, these initially protective adaptations ultimately promote muscle cell apoptosis, resulting in a more fragile and aged wall with an insufficient remodeling pattern in the face of oxidative stress. This manifests as an increase in lysoglycerophospholipids (LPCs and LPEs) in plasma and alterations in proteins C1QTNF5 and LAMA2 in muscle cells and plasma. The C1QTNF5 protein is proposed as diagnosis and monitoring marker of TAA in these patients.

The integrated data in this thesis, obtained from omics and functional analyses of human aortic tissue, vascular smooth muscle cells, mitochondria, and plasma, show that although both

aneurysm subtypes share a pathogenic core, the molecular and metabolic pathways that lead to the development of TAA differ depending on the associated valve type. This highlights the need for differential diagnosis and personalized therapeutic approaches for patients with TAA associated to TAV or BAV, which should be therefore treated as two different clinical entities.

While strategies aimed at reducing glycosaminoglycan accumulation, modulating inflammation, and optimizing mitochondrial function are proposed for TAV-TAA patients, antioxidant therapies and those aimed at breaking the reactive oxygen species-endoplasmic reticulum stress-DNA damage cycle are particularly relevant for BAV-TAA patients.

ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
aa	Aminoácido(s)
AAA	Aneurisma(s) aórtico(s) abdominal(es)
AAT	Aneurisma(s) aórtico(s) torácico(s)
ACLY	ATP-citrato sintasa (<i>ATP-citrate synthase</i>)
ACN	Acetonitrilo
ACO1	Aconitasa 1 (<i>Aconitase 1</i>)
ACO2	Aconitasa 2 (<i>Aconitase 2</i>)
ADAMTS	Metaloproteinasas con dominio desintegrina y motivos de trombospondina (<i>Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i>)
ADAMTSL3	Proteína 3 similar a ADAMTS (<i>ADAMTS-like protein 3</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenosín difosfato
ANAPC1	Subunidad 1 del complejo promotor de la anafase (<i>Anaphase-promoting complex subunit 1</i>)
APOD	Apolipoproteína D (<i>Apolipoprotein D</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATM	Serina-proteína quinasa ATM (<i>Serine-protein kinase ATM</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
ATP5F1B	Subunidad beta de la ATP sintasa (<i>ATP synthase F(1) complex subunit beta</i>)
ATP5MC1	Subunidad c1 de membrana de la ATP sintasa (<i>ATP synthase F(0) complex subunit C1</i>)
ATP5MG	Subunidad g de membrana de la ATP sintasa (<i>ATP synthase F(0) complex subunit g</i>)
ATP5PB	Subunidad b de la ATP sintasa (<i>ATP synthase peripheral stalk subunit b</i>)
ATP5PD	Subunidad d de la ATP sintasa (<i>ATP synthase peripheral stalk subunit d</i>)
ATP5PF	Subunidad F6 del tallo periférico de la ATP sintasa (<i>ATP synthase peripheral stalk subunit F6</i>)

ATR	Serina-proteína quinasa ATR (<i>Serine-protein kinase ATR</i>)
AUC	Área bajo la curva (<i>Area under the curve</i>)
BAX	Proteína asociada a Bcl-2 X (<i>Apoptosis regulator BAX</i>)
BGN	Biglicano (<i>Biglycan</i>)
BI1	Inhibidor de Bax 1 (<i>Bax inhibitor 1</i>)
BRD2	Proteína que contiene un bromodominio 2 (<i>Bromodomain-containing protein 2</i>)
BRD8	Proteína que contiene un bromodominio 8 (<i>Bromodomain-containing protein 8</i>)
BRD9	Proteína que contiene un bromodominio 9 (<i>Bromodomain-containing protein 9</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
C	Control
C1QTNF5	Proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral C1q del complemento 5 (<i>Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5</i>)
CAR	Carnitina
CAR 14:0	Miristoilcarnitina
CAR 2:0	Acetilcarnitina
CAR 5:1;02	Glutarilcarnitina
CAT	Catalasa
CCDC80	Proteína que contiene dominio de hélice enrollada 80 (<i>Coiled-coil domain-containing protein 80</i>)
CEs	Células endoteliales
CHD	Cromodominio helicasa de unión al ADN (<i>Chromodomain helicase DNA-binding</i>)
CI	Intervalo de confianza (<i>Confidence interval</i>)
CMLVs	Células musculares lisas vasculares
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CO₂	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-O-metiltransferasa (<i>Catechol-O-methyltransferase</i>)
COX15	Proteína homóloga COX15 de ensamblaje de la citocromo c oxidasa (<i>Heme A synthase COX15</i>)
COX7C	Subunidad 7C de la citocromo c oxidasa (<i>Cytochrome c oxidase subunit 7C</i>)

cps	Cantidad de eventos detectados por segundo (<i>Counts per second</i>)
CRYAB	Cadena B de alfa-cristalina (<i>Alpha-crystallin B chain</i>)
Ct	Valor de ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DDA	Adquisición dependiente de datos (<i>Data dependent acquisition</i>)
DHODH	Dihidroorotato deshidrogenasa (quinona) (<i>Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)</i>)
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMEM-F12	Medio Eagle F12 modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium F12</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAJB14	Miembro 14 de la subfamilia B homóloga a DnaJ (<i>DnaJ homolog subfamily B member 14</i>)
DNAJB6	Miembro 6 de la subfamilia B homóloga a DnaJ (<i>DnaJ homolog subfamily B member 6</i>)
DNAJC3	Miembro 3 de la subfamilia C homóloga a DnaJ (<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>)
DPO	ADN polimerasa (<i>DNA polymerase</i>)
DPX	Mezcla de ftalato de dibutilo, poliestireno y xileno (<i>Dibutylphthalate polystyrene xylene</i>)
DSL	Dislipidemia
EA	Estenosis aórtica
ECAR	Tasa de acidificación extracelular (<i>Extracellular acidification rate</i>)
EGF	Factor de crecimiento endotelial (<i>Endothelial growth factor</i>)
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ERP29	Proteína del retículo endoplásmico 29 (<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>)
FAP	Endopeptidasa de prolina FAP (<i>Prolyl endopeptidase FAP</i>)
FASP	Método de digestión en filtro (<i>Filter-Aided Sample Preparation</i>)
FBN1	Fibrilina 1
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)

FCCP	Carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona (<i>Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>)
FDR	Tasa de falsos descubrimientos (<i>False discovery rate</i>)
FEVI	Fracción de eyección ventricular izquierda
FFPE	Fijado en formalina e incluido en parafina (<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>)
FJD	Fundación Jiménez Díaz
FOSL1	Antígeno relacionado con Fos 1 (<i>Fos-related antigen 1</i>)
FOSL2	Antígeno relacionado con Fos 2 (<i>Fos-related antigen 2</i>)
FRIH	Cadena pesada de ferritina (<i>Ferritin heavy chain</i>)
FRIL	Cadena ligera de ferritina (<i>Ferritin light chain</i>)
FSC-A	Dispersión frontal (<i>Forward scatter area</i>)
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAK	Quinasa asociada a ciclina G (<i>Cyclin-G-associated kinase</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GAR	Anticuerpo secundario de cabra específico frente a conejo (<i>Goat anti-rabbit</i>)
GFPT2	Glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (<i>Glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase 2</i>)
GIA	Algoritmo Genérico de Integración (<i>Generic integration algorithm</i>)
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1 (<i>Glucagon-like peptide-1</i>)
GLS	Glutaminasa
GNA12	Subunidad alfa-12 de la proteína G (<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12</i>)
GNAI1	Subunidad alfa-1 de la proteína G inhibidora (<i>Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1</i>)
GNB1	Subunidad beta-1 de la proteína G (<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1</i>)
GNB4	Subunidad beta-4 de la proteína G (<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4</i>)
GOT2	Aspartato aminotransferasa (<i>Aspartate aminotransferase</i>)
GRPEL1	Proteína mitocondrial similar a GrpE (<i>GrpE-like mitochondrial protein 1</i>)

GSTM2	Glutación S-transferasa Mu 2 (<i>Glutathione S-transferase Mu 2</i>)
GSTO1	Glutación S-transferasa omega-1 (<i>Glutathione S-transferase omega-1</i>)
GYS1	Glucógeno sintasa 1 (<i>Glycogen synthase</i>)
H⁺	Protón
H₂O	Agua
HBP	Ruta biosintética de las hexosaminas (<i>Hexosamine biosinthetic pathway</i>)
HCl	Ácido clorhídrico
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica (<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HIST1H2AD	Histona H2A, miembro de la familia 1H2AD (<i>Histone H2A type 1-D</i>)
HIST1H2BM	Histona H2B, miembro de la familia 1H2BM (<i>Histone H2B type 1-M</i>)
HIST2H3A	Histona H3, miembro de la familia 2H3A (<i>Histone H3 type 2-A</i>)
HIST3H3	Histona H3, miembro de la familia 3H3 (<i>Histone H3.3</i>)
HK	Hexoquinasa (<i>Hexokinase</i>)
HMDB	Base de datos del metaboloma humano (<i>Human metabolome database</i>)
HPA	Atlas de proteínas humanas (<i>Human Protein Atlas</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HRAS	Homólogo del oncogén viral del sarcoma de Harvey en rata: GTPasa HRas (<i>GTPase HRas</i>)
HSD17B4	Enzima multifuncional peroxisómica tipo 2 (17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 4) (<i>Peroxisomal multifunctional enzyme type 2</i>)
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa (<i>Heat shock protein 70</i>)
HSPA12A	Proteína de choque térmico de 70 kDa 12A (<i>Heat shock 70 kDa protein 12A</i>)
HSPA1B	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1B (<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>)
HSPA1L	Proteína similar a la proteína de choque térmico de 70 kDa 1 (<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>)
HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1 (<i>Heat shock protein beta-1</i>)
HSPB8	Proteína de choque térmico beta-8 (<i>Heat shock protein beta-8</i>)
HSPD1	Proteína de choque térmico de 60 kDa (<i>60 kDa heat shock protein</i>)
HTA	Hipertensión

IA	Insuficiencia aórtica
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1 (<i>Intracellular adhesion molecule 1</i>)
IMC	Índice de masa corporal
ISCIII	Instituto de Salud Carlos III
JUND	Factor de transcripción JunD (<i>Transcription factor JunD</i>)
LAMA2	Subunidad alfa 2 de la laminina (<i>Laminin subunit alpha-2</i>)
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPA	Ácido lisofosfatídico (<i>Lysophosphatidic acid</i>)
LPC	Lisofosfatidilcolina (<i>Lysophosphatidylcholine</i>)
LPE	Lisofosfatidiletanolamina (<i>Lysophosphatidylethanolamine</i>)
M	Fracción mitocondrial
m/z	Relación masa/carga
MCM	Mantenimiento de minicromosomas (<i>Mini-chromosome maintenance</i>)
MCM2	Complejo de mantenimiento de minicromosomas 2 (<i>DNA replication licensing factor MCM2</i>)
MCM3	Complejo de mantenimiento de minicromosomas 3 (<i>DNA replication licensing factor MCM3</i>)
MCM4	Complejo de mantenimiento de minicromosomas 4 (<i>DNA replication licensing factor MCM4</i>)
MCM5	Complejo de mantenimiento de minicromosomas 5 (<i>DNA replication licensing factor MCM5</i>)
MEC	Matriz extracelular
MeOH	Metanol
MMP2	Metaloproteínasa de matriz 2 (<i>72 kDa type IV collagenase</i>)
MMPs	Metaloproteínasas de matriz (<i>Matrix metalloproteinases</i>)
MMR	Reparación de desajustes (<i>Mismatch repair</i>)
MMUT	Metilmalonil-CoA mutasa (<i>Methylmalonyl-CoA mutase</i>)
MRPL12	Proteína ribosomal L12 de la subunidad 39S (<i>Large ribosomal subunit protein bL12m</i>)
MRPL14	Proteína ribosomal L14 de la subunidad 39S (<i>Large ribosomal subunit protein uL14m</i>)

MRPL28	Proteína ribosomal L28 de la subunidad 39S (<i>Large ribosomal subunit protein bL28m</i>)
MRPL33	Proteína ribosomal L33 de la subunidad 39S (<i>Large ribosomal subunit protein bL33m</i>)
MRPL37	Proteína ribosomal L37 de la subunidad 39S (<i>Large ribosomal subunit protein mL37</i>)
MRPS15	Proteína ribosomal S15 de la subunidad 28S (<i>Small ribosomal subunit protein uS15m</i>)
MRPS27	Proteína ribosomal S27 de la subunidad 28S (<i>Small ribosomal subunit protein mS27</i>)
MS	Masas
MS/MS	Masas/masas
MSH2	Proteína Msh2 de reparación de desajustes del ADN (<i>DNA mismatch repair protein Msh2</i>)
MSH3	Proteína Msh3 de reparación de desajustes del ADN (<i>DNA mismatch repair protein Msh3</i>)
MSH6	Proteína Msh6 de reparación de desajustes del ADN (<i>DNA mismatch repair protein Msh6</i>)
mtDAMPs	Patrones moleculares asociados a daño mitocondrial (<i>Mitochondrial damage-associated molecular patterns</i>)
Na₂HPO₄·2H₂O	Fosfato disódico dihidratado
NaCl	Cloruro sódico
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NaH₂PO₂·H₂O	Hipofosfito de sodio monohidratado
NaH₂PO₄	Fosfato monosódico
NaOH	Hidróxido sódico
NCAPD2	Subunidad D2 del complejo de condensina-1 (<i>Condensin complex subunit 1</i>)
NCAPG	Subunidad G del complejo de condensina-1 (<i>Condensin complex subunit 3</i>)
NCAPH	Subunidad H del complejo de condensina-1 (<i>Condensin complex subunit 2</i>)
NDUFA2	Subunidad 2 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2</i>)

NDUFA6	Subunidad 6 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6</i>)
NDUFA7	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] subcomplejo alfa subunidad 7 (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7</i>)
NDUFA9	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] subcomplejo alfa subunidad 9 (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9</i>)
NDUFAF2	Factor de ensamblaje 2 del complejo I de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2</i>)
NDUFB11	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] subcomplejo beta subunidad 11 (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11</i>)
NDUFB6	Subunidad 6 del subcomplejo beta de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6</i>)
NDUFS3	Proteína hierro-azufre 3 de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3</i>)
NDUFS5	Proteína hierro-azufre 5 de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5</i>)
NDUFS7	Proteína hierro-azufre 7 de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7</i>)
NDUFS8	Proteína hierro-azufre 8 de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona] (<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8</i>)
NFκB	Factor nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
N°	Número
noM	Fracción no mitocondrial
nP	Número de péptidos identificados
O₂⁻	Superóxido
OCR	Tasa de consumo de oxígeno (<i>Oxygen consumption rate</i>)
OPA1	Proteína similar a dinamina de 120 kDa (Dynamin-like GTPase OPA1)
ORC	Complejo de reconocimiento de origen (<i>Origin recognition complex</i>)
P/E	Penicilina/estreptomicina
p53	Proteína supresora tumoral p53 (<i>Cellular tumor antigen p53</i>)
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PC	Fosfatidilcolina (<i>Phosphatidylcholine</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal component analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)

PDHB	Componente E1 de la piruvato deshidrogenasa, subunidad beta (<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>)
PDRG1	Proteína 1 regulada por p53 y daños en el ADN (<i>p53 and DNA damage-regulated protein 1</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PE-A	Área de la señal de fluorescencia de ficoeritrina (<i>Phycoerythrin area</i>)
PFK	6-fosfofructoquinasa (<i>6-phosphofructokinase</i>)
PK	Piruvato kinasa
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (<i>Partial least squares discriminant analysis</i>)
PMS1	Homólogo 1 de la proteína PMS1 (<i>PMS1 protein homolog 1</i>)
PPARα	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>)
ppm	Partes por millón
PPP	Ruta de las pentosas fosfato (<i>Pentose phosphate pathway</i>)
PRDX5	Peroxirredoxina-5 (<i>Peroxiredoxin-5</i>)
PYGM	Fosforilasa del glucógeno muscular (<i>Muscle glycogen phosphorylase</i>)
QC	Control de calidad (<i>Quality control</i>)
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real (<i>Quantitative PCR</i>)
RAC1	Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras (<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)
RAC2	Sustrato 2 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras (<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2</i>)
RAC3	Sustrato 3 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras (<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3</i>)
RAM	Anticuerpo secundario de conejo específico frente a ratón (<i>Rabbit anti-mouse</i>)
RAP1A	Proteína relacionada con Ras tipo Rap-1A (<i>Ras-related protein Rap-1A</i>)
RAP1B	Proteína relacionada con Ras tipo Rap-1B (<i>Ras-related protein Rap-1B</i>)
RCR	Índice de control respiratorio (<i>Respiratory control ratio</i>)
RE	Retículo endoplásmico
RFC	Factor de replicación C (<i>Replication factor C</i>)
RFC1	Subunidad 1 del factor de replicación C (<i>Replication factor C subunit 1</i>)

RFC2	Subunidad 2 del factor de replicación C (<i>Replication factor C subunit 2</i>)
RFC3	Subunidad 3 del factor de replicación C (<i>Replication factor C subunit 3</i>)
RFC4	Subunidad 4 del factor de replicación C (<i>Replication factor C subunit 4</i>)
RFC5	Subunidad 5 del factor de replicación C (<i>Replication factor C subunit 5</i>)
RHOQ	Miembro Q de la familia homóloga de Ras (<i>Rho-related GTP-binding protein RhoQ</i>)
RM	Resonancia magnética
RN	Ribósido de nicotinamida
ROC	Curva operativa del receptor (<i>Receiver operating characteristic curve</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
ROUT	Regresión robusta y eliminación de valores atípicos (<i>Robust regression and outlier removal</i>)
RPLC	Cromatografía líquida en fase reversa (<i>Reverse phase liquid chromatography</i>)
RT	Tiempo de retención (<i>Retention time</i>)
SBT	Triángulo de biología de sistemas (<i>Systems biology triangle</i>)
SDHA	Subunidad flavoproteína de la succinato deshidrogenasa [ubiquinona] (<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit</i>)
SDHB	Succinato deshidrogenasa [ubiquinona] subunidad hierro-azufre (<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SERPINE2	Nexina derivada de la glía (<i>Glia-derived nexin</i>)
SFXN3	Sideroflexina-3 (<i>Sideroflexin-3</i>)
SGLT2	Cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (<i>Sodium-glucose co-transporter 2</i>)
SICCS	Sistema de Información en Cirugía Cardiovascular Sorin
SM22α	Proteína 22 alfa del músculo liso (<i>Smooth muscle protein 22 alpha</i>)
SMC2	Proteína de mantenimiento estructural de cromosomas 2 (<i>Structural maintenance of chromosomes protein 2</i>)
SMC4	Proteína de mantenimiento estructural de cromosomas 4 (<i>Structural maintenance of chromosomes protein 4</i>)
SRM	Modo de monitorización de reacción seleccionada (<i>Selected reaction monitoring</i>)
SRM-LC-MS/MS	Modo de monitorización de reacción seleccionada mediante LC-MS/MS

SSC-A	Dispersión lateral (<i>Side scatter area</i>)
SUCLG2	Succinil-CoA ligasa [formadora de GDP], subunidad beta (<i>Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta</i>)
TC	Tomografía computerizada
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina (<i>Tris 2-carboxyethyl phosphine</i>)
TEAB	Bicarbonato de trietilamonio (<i>Triethylammonium bicarbonate</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TFAM	Factor de transcripción A (Transcription factor A)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
THBS3	Trombospondina 3 (<i>Thrombospondin-3</i>)
TIMM44	Translocasa de la membrana interna mitocondrial 44 (<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44</i>)
TIMP2	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 (<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i>)
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (<i>Tissue inhibitors of metalloproteasas</i>)
TMT	Etiquetado en tándem (<i>Tandem mass tagging</i>)
TOMM20	Translocasa de la membrana externa mitocondrial 20 (<i>Translocase of the outer mitochondrial membrane</i>)
TOMM5	Translocasa de la membrana externa mitocondrial 5 (<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog</i>)
TRAPPC11	Subunidad 11 del complejo de partículas proteicas de tráfico (<i>Trafficking protein particle complex subunit 11</i>)
TRAPPC5	Subunidad 5 del complejo de partículas proteicas de tráfico (<i>Trafficking protein particle complex subunit 5</i>)
TRME	Tetrametilrodamina etil éster perclorato
TTLL12	Proteína similar a la tubulina tirosina ligasa 12 (<i>Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12</i>)
TXNRD1	Tiorredoxina reductasa 1 (<i>Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic</i>)
UAP1	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1
UDP	Uridina difosfato glucosa
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetilglucosamina
UGP2	UDP-glucosa pirofosforilasa 2
UQCR2C	Subunidad 2 del complejo citocromo b-c1 (Complejo III subunidad 2) (<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial (Complex III subunit 2)</i>)

VAB	Válvula aórtica bicúspide
VAT	Válvula aórtica tricúspide
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1 (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje (<i>Voltage-dependent anion channel</i>)
WSPP	Ponderación de espectros, péptidos y proteínas (<i>Weighted spectrum, peptide and protein</i>)
α-SMA	Alfa actina de músculo liso (<i>Alpha-smooth muscle actin</i>)
$\Delta\Psi_m$	Variación del potencial de membrana

INTRODUCCIÓN

1. Estructura de la pared arterial

Las arterias son vasos sanguíneos que constituyen un componente esencial del sistema cardiovascular cuya función principal consiste en transportar sangre oxigenada desde el corazón hacia los tejidos y órganos del cuerpo, con excepción de las arterias pulmonares, que conducen sangre desoxigenada. Además, regulan los cambios de presión y el flujo sanguíneo gracias a su naturaleza contráctil y a las propiedades mecánicas que le confiere su pared: elasticidad, rigidez a la tracción y compresibilidad, siendo, por tanto, esenciales para mantener el tono vascular.

Desde un punto de vista funcional y clínico, las arterias se clasifican en tres tipos:

- Elásticas, también conocidas como arterias de conducción, incluyen grandes vasos, como la aorta y sus principales ramas, y se encargan del mantenimiento de una presión continua y estable en la circulación sistémica.
- Musculares, o arterias de distribución, comprenden vasos de calibre intermedio, los cuales permiten una distribución precisa del flujo sanguíneo según las demandas metabólicas de cada tejido.
- Arteriolas, representan las ramas terminales del sistema arterial y actúan como vasos de resistencia.

La pared arterial está compuesta por tres capas concéntricas e independientes que componen una estructura organizada que garantiza la integridad y funcionalidad de los vasos (Figura 1):

- Capa íntima o interna. Es la capa más cercana al lumen del vaso; la que está en contacto con el flujo sanguíneo. Está compuesta por una monocapa de células endoteliales (CEs) y por el espacio subendotelial. Las CEs revisten la superficie interna del vaso y se encuentran interconectadas y adheridas a una lámina elástica interna, que las separa de la capa media. Esta lámina elástica interna es una membrana de matriz extracelular (MEC) compuesta principalmente por laminina, colágeno IV, fibronectina, perlecano y proteoglicanos de heparán sulfato^{1,2}. Actúa como barrera semipermeable, regulando el intercambio de moléculas entre la sangre y la pared aórtica, protege a la capa media de agresiones mecánicas y físicas, regula el tono vascular y mantiene la homeostasis hemodinámica.
- Capa media. Es la capa central y está delimitada por dos capas de lámina elástica, la interna y la externa. Es predominantemente muscular y elástica y es la túnica más gruesa de la pared aórtica. Se compone mayoritariamente de varias capas de células musculares lisas vasculares (CMLVs) y de MEC. Las CMLVs desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la estructura y las funciones de la aorta, mientras que la MEC proporciona soporte bioquímico y estructural y coordina la contractilidad de las CMLVs y las tensiones elásticas en respuesta a las tensiones mecánicas del flujo sanguíneo³.

Las CMLVs sintetizan tropoelastina que, posteriormente, da lugar a la elastina madura, la cual se ensambla en fibras elásticas⁴. Estas fibras elásticas y las CMLVs se fijan mediante adhesiones focales dando lugar a las unidades contráctiles o laminares, que proporcionan a la aorta sus propiedades biomecánicas únicas⁵⁻⁷. Además, dichas unidades están reforzadas por fibrilina, integrinas y colágeno, mayoritariamente los tipos I y III, los cuales se asocian estrechamente con las fibras elásticas y contribuyen a la rigidez y resistencia de la pared aórtica^{8,9}.

La MEC es el componente no celular de la pared aórtica. Proporciona soporte estructural y regula la función celular y la remodelación vascular a través de factores de crecimiento y la liberación de citocinas. Está compuesta principalmente por proteoglicanos, glicoproteínas,

glicosaminoglicanos (GAGs), elastina y colágeno. Su composición está finamente regulada por las CMLVs, que son una fuente importante de enzimas proteolíticas y sus inhibidores, como las metaloproteinasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés), los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs, por sus siglas en inglés), la familia ADAMTS (metaloproteinasas con dominio desintegrina y motivos de trombospondina, por sus siglas en inglés), las proteasas serina/cisteína o la α -2-macroglobulina¹⁰.

- **Capa adventicia o externa:** Es la capa más externa de la pared aórtica y se comunica con el sistema nervioso y el vasa vasorum; el suministro sanguíneo externo que también proporciona interacción con el sistema inmune. Su función principal es la de proporcionar soporte estructural y resistencia física, ya que soporta más de la mitad de la carga mecánica para proteger la pared aórtica de la sobredistensión^{11,12}. Está formada por una red de tejido conectivo rico en colágeno sobre la que se distribuyen células madre, fibroblastos, pericitos, vasos linfáticos, células inflamatorias y adipocitos, principalmente. Varios tipos de células madre que residen en la capa adventicia, adyacentes a la capa media, tienen la capacidad de diferenciarse a CEs, CMLVs, osteoblastos, condrocitos, adipocitos y macrófagos para mantener la homeostasis de la pared aórtica en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos¹³⁻¹⁵.

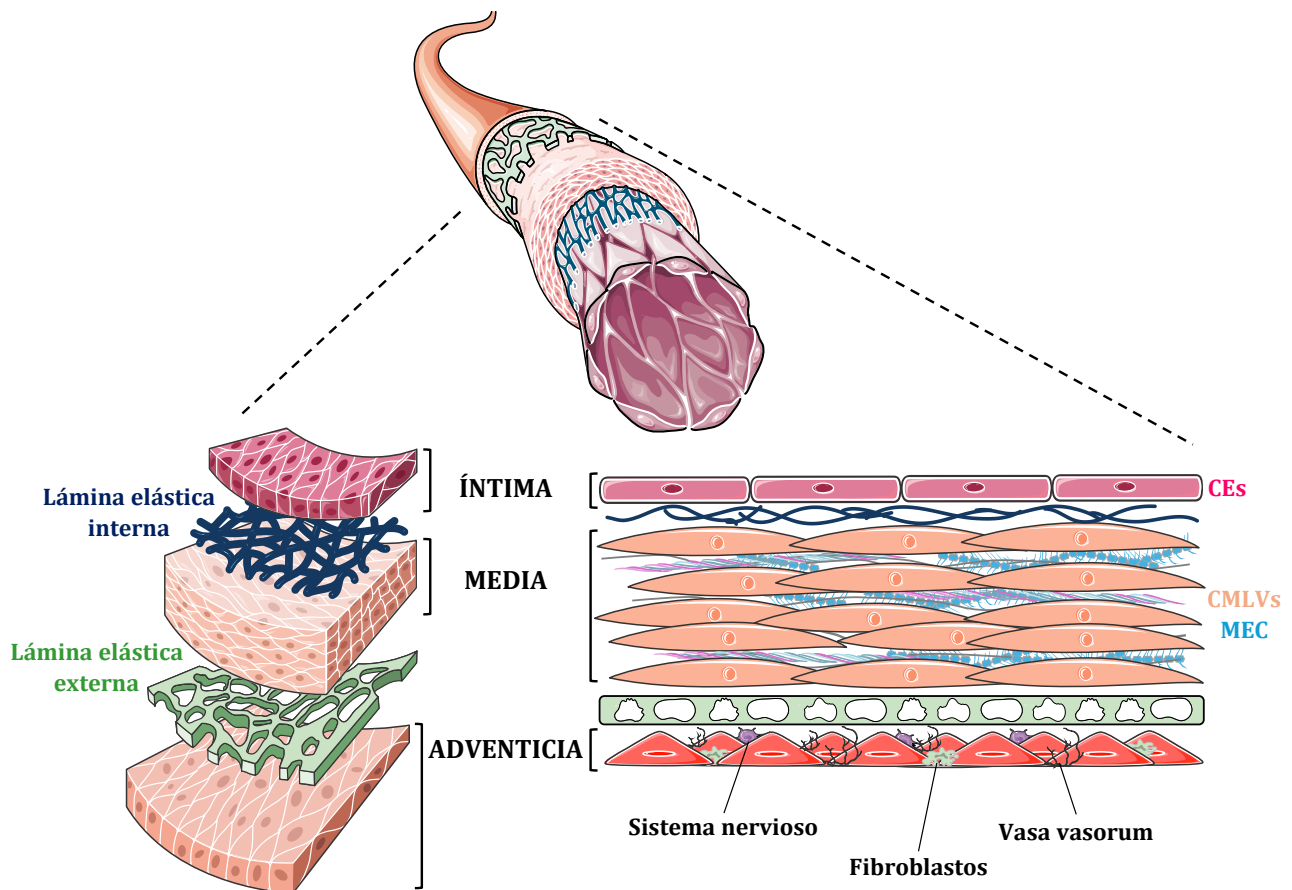


Figura 1. Capas y estructura de la pared arterial. La pared de las arterias está constituida por tres capas concéntricas: la íntima, formada por CEs; la media, formada por CMLVs y MEC; y la adventicia, constituida por tejido conjuntivo, vasa vasorum, sistema nervioso y fibroblastos, entre otras células.

2. La aorta

La aorta es la arteria más grande del cuerpo y está compuesta principalmente por una gruesa capa media de células musculares lisas dispuestas entre múltiples láminas elásticas concéntricas, lo que le confiere la capacidad de vasoconstricción y vasodilatación. Se origina en el ventrículo izquierdo del corazón, se ramifica y termina en su punto de bifurcación en la pelvis. De esta forma, actúa como conducto principal de la sangre, conectando el corazón con las arterias principales, como las coronarias, carótidas, subclavias, renales y mesentéricas, lo que garantiza el flujo sanguíneo a todos los órganos vitales del cuerpo. Sin embargo, no solo es un conducto para la sangre, sino que, debido a su naturaleza autónoma y a sus funciones vitales específicas, ha sido clasificada como un órgano¹⁶. Por ello, la aorta ha de estudiarse integrando su origen embriológico, la composición de su pared y las funciones asociadas a los distintos segmentos aórticos.

Desde una perspectiva estructural y funcional, la aorta se divide en tres grandes segmentos, con diferente origen embriológico y diferente composición (Figura 2):

- Aorta torácica ascendente: Es el primer tramo de la aorta; asciende desde la base del ventrículo izquierdo hasta el inicio del arco o cayado aórtico. Deriva embriológicamente de la cresta neural y se compone de una pared rica en fibras elásticas y colágeno, diseñada para soportar y amortiguar la presión pulsátil generada por la contracción cardíaca¹⁷. Su túnica media contiene una alta proporción de láminas elásticas concéntricas intercaladas con células musculares lisas, formando las unidades contráctiles que permiten la expansión rítmica de la pared y su posterior retracción, un fenómeno clave para el mantenimiento del flujo sanguíneo continuo. La aorta torácica ascendente, al ser la zona más próxima al corazón, soporta la presión más alta y las mayores tensiones de la pared, pues está sometida a más de 30 millones de ciclos de presión al año¹⁸. Esto hace que tenga que actuar como una estructura biomecánica robusta, cargando y descargando el volumen cardíaco de manera eficiente y fiable a lo largo de toda la vida.
- Arco o cayado aórtico: Representa la transición entre la porción ascendente y la descendente, con una forma de curvatura en forma de u invertida, que da origen a tres ramificaciones importantes: el tronco braquiocefálico, la arteria carótida y la subclavia. Su desarrollo embrionario, como en el caso de la aorta ascendente, tiene lugar a partir de las células de la cresta neural. A nivel tisular, mantiene una arquitectura elástica, pero también muestra cambios graduales en la composición de la MEC: mientras que conserva abundante elastina, aumenta progresivamente la proporción de colágeno tipo I y III, proteoglicanos, como versicán y decorina, y glicoproteínas, como fibronectina y laminina, reflejo de su papel como zona de bifurcación y ramificación vascular¹⁹.
- Aorta descendente: Se inicia desde el arco aórtico y desciende a lo largo del tronco hasta las arterias ilíacas. Se desarrolla a partir del mesodermo, cambiando por tanto de origen embrionario respecto a la aorta ascendente y el arco aórtico. A su vez, se divide en:
 - o Aorta torácica descendente, la cual se extiende desde el cayado aórtico hasta el diafragma. Presenta un patrón elástico con una gradual disminución de la densidad de fibras elásticas y un aumento en la proporción de músculo liso vascular, reflejando su papel regulador del tono vascular¹⁹.

- **Aorta abdominal:** Representa el tramo terminal del vaso y va desde el diafragma hasta la ramificación de las arterias ilíacas. Está caracterizada por una menor proporción de fibras elásticas y una mayor rigidez relativa. Esto se asocia a una menor exposición a presiones pulsátiles, pero mayores demandas mecánicas longitudinales. El endotelio de la aorta abdominal presenta patrones de expresión génica y señales inflamatorias distintivos, lo que la hace más susceptible a procesos de remodelación vascular, calcificación y cambios degenerativos²⁰.

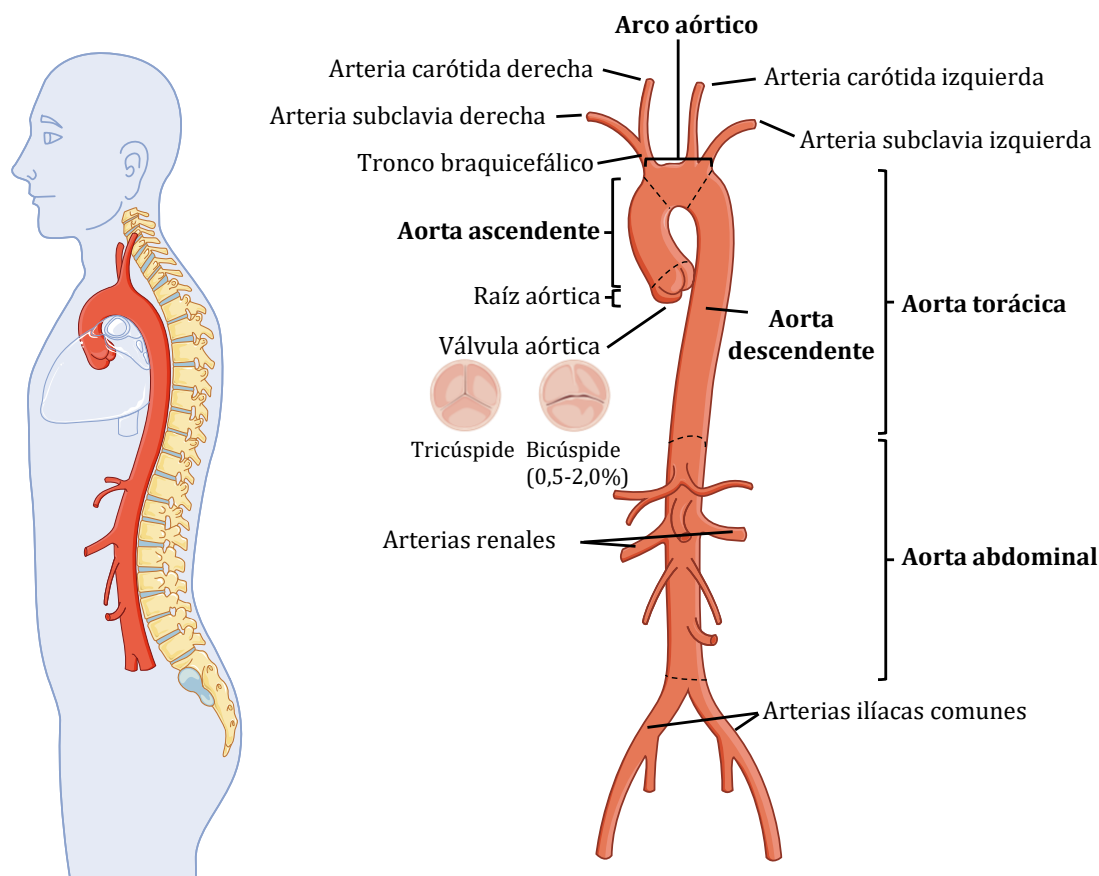


Figura 2. Localización y segmentos de la aorta. La aorta se origina en el ventrículo izquierdo del corazón y termina en su bifurcación en las arterias ilíacas comunes. Está formada por tres regiones: la aorta torácica ascendente, el arco o cayado aórtico y la aorta descendente, que se subdivide en torácica y abdominal.

3. El aneurisma aórtico torácico (AAT)

El entorno molecular y biomecánico de la pared aórtica se controla y estabiliza mediante la compleja interacción entre las CMLVs y la MEC. Alteraciones en este proceso homeostático dan lugar a procesos patológicos conocidos como aortopatías torácicas, entre los que se encuentra el aneurisma. El aneurisma aórtico es la segunda enfermedad de la aorta más frecuente después de la aterosclerosis²¹. Se define como una dilatación anómala del vaso con un aumento de, al menos, el 50% del diámetro aórtico con respecto al diámetro original. Sin embargo, este límite debe tomarse con precaución, ya que pueden producirse eventos adversos antes de que la aorta alcance 1,5 veces su tamaño^{22,23}, en parte porque esta dilatación a menudo es debida al debilitamiento progresivo de la pared arterial²⁴.

Debido a los diferentes orígenes embrionarios que presentan las distintas zonas de la aorta, así como a la distinta composición de la pared aórtica, descritos anteriormente, los mecanismos de formación del aneurisma y los factores de riesgo para su progresión y complicaciones son diferentes en las diferentes zonas. Por ello, es necesario considerar y estudiar por separado los aneurismas de la aorta torácica (AAT) y de la aorta abdominal (AAA), considerándolos como dos patologías independientes²⁵⁻²⁷.

El AAT es una dilatación progresiva de la aorta a la altura del tórax. Presenta una incidencia de 6-13/100.000 personas al año, con afectación de la aorta ascendente en el 50% de los casos y con consecuencias fatales si se rompe o se disecciona²⁸. Los registros médicos muestran que el 21% de los pacientes que sufren una disección y el 59% de los que presentan rotura mueren antes de poder recibir atención médica. Además, hasta el 30% de los pacientes operados de urgencia no sobreviven²⁹. El AAT es más frecuente en hombres que en mujeres (proporción 4:1); sin embargo, la tasa de crecimiento de la aorta es mayor en mujeres ($0,13 \pm 0,30$ mm al año) que en hombres ($0,07 \pm 0,50$ mm al año)³⁰ y, por lo tanto, las mujeres tienen un mayor riesgo de sufrir un evento fatal³¹. El AAT cursa mayoritariamente de manera silenciosa y asintomática, aunque los casos más avanzados pueden presentar dolor torácico, dolor de espalda o síntomas relacionados con la compresión de los órganos²¹.

En esta tesis doctoral, nos centramos en el aneurisma aórtico torácico que tiene lugar en la aorta ascendente.

3.1. Clasificación

El AAT puede clasificarse, de acuerdo con criterios genéticos, en dos grandes grupos: síndromico o no síndromico^{32,33}:

El AAT síndromico engloba un grupo de afecciones de origen genético que implican la afectación en la aorta y otros sistemas orgánicos. Los más comunes son los síndromes de Marfan, Ehlers-Danlos y Loeys-Dietz. El síndrome de Marfan se caracteriza por presentar mutaciones en el gen de la fibrilina 1 (*FBN1*), lo que compromete la formación de las fibras elásticas del tejido conectivo y provoca una alteración en el secuestro del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), lo que da lugar a un remodelado patológico de la MEC. El síndrome de Ehlers-Danlos está caracterizado por mutaciones en el gen del colágeno tipo III (*COL3A1*) que causan una fragilidad extrema del colágeno y una rotura arterial precoz. El síndrome de Loeys-Dietz presenta mutaciones en los genes que codifican los receptores del TGF- β (*TGFBR1* y *TGFBR2*) y en *SMAD2*, *SMAD3*, *TGFB2* y *TGFB3*, lo que provoca una alteración en la señalización del TGF- β y, con ello, una desorganización de las fibras elásticas y un remodelado aberrante de la MEC, con una pared arterial muy propensa al desarrollo de AAT³⁴. Los casos síndromicos suelen presentarse a una edad más temprana y con aortopatías más agresivas, lo que hace que sean más fáciles de identificar dada su naturaleza sintomática.

El AAT no síndromico se refiere a una afección que se limita a la aorta, sin otras anomalías sistémicas. Representa entre el 80 y el 95% de todos los casos de AAT^{35,36}. Los casos de AAT no síndromico se pueden subdividir a su vez en familiares y en esporádicos o idiopáticos. Los familiares, también conocidos como hereditarios, representan aproximadamente un 20% de todos los casos de AAT no síndromico. Se han asociado hasta 70 genes con el AAT hereditario, pero son once de ellos los que, hasta la fecha, se relacionan clínicamente de forma definitiva con este tipo de AAT. Estos genes se pueden subdividir en cuatro grupos principales: los que

codifican componentes de la MEC (*FBN1, COL3A1*), relacionados con las CMLVs (*MYH11, ACTA2, MYLK, PRKG1*), los que pertenecen a la vía de señalización del TFG- β (*TGFBR1, TGFBR2, TGFB2, SMAD3*) y otras proteínas, como *LOX*³⁷. A pesar de ello, estos genes de riesgo asociados al AAT no explican la totalidad de los casos^{24,38}. Por su parte, los AAT esporádicos o idiopáticos no tienen genes asociados y son asintomáticos. Se dan en la gran mayoría de los pacientes que sufren un AAT; concretamente, en un 80% de los casos no sindrómicos, lo que representa entre el 60 y el 80% de los casos de AAT.

En esta tesis doctoral, nos hemos centrado en el AAT no sindrómico y esporádico de la aorta ascendente.

3.2. Mecanismos y fisiopatología

En la aorta ascendente, el estrés biomecánico, especialmente la tensión de cizallamiento, definida como la fuerza tangencial que ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared arterial, es clave en la fisiopatología del AAT. Fallos en la respuesta a este estrés biomecánico de las capas de la pared aórtica llevan a la aparición de eventos aórticos agudos, los cuales se producen cuando la tensión de la pared supera la resistencia máxima a la rotura. En este sentido, cuando se produce la expansión del diámetro aórtico en el desarrollo del AAT, aumenta la tensión de la pared y con ello el riesgo de rotura. Estudios biomecánicos recientes han demostrado que un aumento en la tensión de cizallamiento se asocia con una degradación de la pared aórtica, con disminución del contenido de elastina y reducción del número de CMLVs, que lleva a la degeneración de la capa media y a una disminución de la resistencia mecánica de la pared^{39,40}. Además, la distribución de esta tensión de cizallamiento no es uniforme, ya que las curvas externas de la aorta presentan valores más altos, junto con una pared más delgada y rígida, lo que coincide con las zonas de mayor vulnerabilidad estructural⁴¹. Otra característica biomecánica relevante es la rigidez aórtica, indicador de la facilidad con la que la pared aórtica se distiende con la presión aplicada. Pruebas biomecánicas *ex vivo* de aortas dilatadas demuestran que el aumento de la rigidez parece ser atribuible a un mayor contenido de colágeno y un menor contenido de elastina, que puede ser evidente mucho antes de que los diámetros aórticos comiencen a aumentar⁴². En pacientes cuya aorta es intrínsecamente débil o se remodela de forma anómala, como en el AAT, el aumento de la presión arterial, la resistencia vascular sistémica y la rigidez aórtica son perjudiciales y deben considerarse. A nivel de mecanotransducción, el estrés mecánico también induce alteraciones moleculares cruciales, como la sobreexpresión de trombospondina-1, que contribuyen a la disrupción de las unidades contráctiles de elastina y a la desorganización del citoesqueleto en las CMLVs⁴³; o el incremento de las MMPs y sus inhibidores, que favorece un remodelado aórtico adverso facilitando la formación del AAT en la aorta ascendente⁴⁴.

Sin embargo, el AAT no es resultado únicamente de la hemodinámica, sino que es una enfermedad heterogénea y multifactorial resultado de una alteración de la homeostasis aórtica que afecta a las tres capas arteriales, siendo la capa media la principal protagonista.

Las CMLVs, principales células de la capa media, muestran una notable plasticidad fenotípica, lo que les permite responder a los estímulos ambientales y al estrés mecánico cambiando de fenotipo contráctil a sintetizador. Estas células se mantienen quiescentes o contráctiles cuando están sanas, pero cambian a un fenotipo proliferativo, sintético y migratorio en el desarrollo del AAT, secretando MMPs y TIMPs y regulando así el recambio de la MEC, esencial para el mantenimiento de la homeostasis. A su vez, esta MEC también modula la proliferación, adhesión

y migración de las CMLVs. En esta línea, se ha descrito una alteración de los niveles de MMPs y sus inhibidores durante el desarrollo del aneurisma, lo que provoca rigidez aórtica⁴⁵.

Durante el desarrollo del AAT, la interacción entre las CMLVs, responsables de la contracción y complacencia mecánica de la pared vascular, y la MEC, que permite la adaptación a las fuerzas mecánicas externas que actúan sobre la pared del vaso, da lugar a una red de procesos interconectados en la arteria que provocan desorganización y debilitamiento estructural de la pared aórtica, donde la dilatación progresiva impone un estrés mecánico cada vez mayor a la pared del vaso⁴⁶.

Otro aspecto clave en la homeostasis de la pared vascular es la plasticidad metabólica de las CMLVs, que está íntimamente relacionada con su fenotipo. En condiciones fisiológicas, las CMLVs presentan un metabolismo dependiente de la fosforilación oxidativa mitocondrial para generar ATP de manera eficiente, lo que les permite mantener la función contráctil, el tono vascular y la integridad estructural del vaso. Sin embargo, cuando las CMLVs cambian a un fenotipo sintético, como sucede en el desarrollo del AAT, experimentan una reprogramación metabólica hacia un menor uso de la fosforilación oxidativa en beneficio de un aumento de la glucólisis y de la producción de lactato, lo que contribuye al aumento de la migración y proliferación celular y a la síntesis de componentes de la MEC⁴⁷.

A nivel molecular, aunque no se conocen detalladamente los procesos específicos, y menos aún los particulares de las diferentes formas de AAT en función del tipo valvular, sí se han investigado varios mecanismos generales conocidos implicados en la dilatación aórtica.

Se ha descrito que, para mantener la integridad de la pared en las lesiones aórticas, se produce una acumulación de GAGs y proteoglicanos en la túnica media como respuesta compensatoria⁴⁸. Sin embargo, su acumulación excesiva se vuelve contraproducente, provocando la fragmentación de las fibras elásticas⁴⁹. Además, los GAGs y los proteoglicanos tienen papeles esenciales en el mantenimiento de la MEC, influyendo en su hidratación, propiedades biomecánicas y mecanismos de señalización celular⁵⁰, de manera que su acumulación patológica en el AAT altera estas funciones, contribuyendo al deterioro estructural de la media aórtica. La degradación y acumulación de la MEC facilita aún más el desprendimiento de las CMLVs de las integrinas y promueve la migración celular, la apoptosis y la remodelación vascular^{36,51}. En el caso de los AAT, a través de un modelo matemático, se ha observado que debido a que estas moléculas tienen la capacidad de retener agua en los espacios interlamelares, incrementan la tensión de cizallamiento y favorecen la delaminación de las unidades laminares de la media, debilitando la pared arterial y favoreciendo el inicio de la disección⁵². En modelos murinos de dilatación aórtica, se ha observado una marcada acumulación de proteoglicanos, como agregán y versicán, producto de una síntesis aumentada y/o una degradación disminuida, que se asocia con una expresión reducida de ADAMTS5, lo que evidencia un desequilibrio que altera la mecánica y las propiedades viscoelásticas de la pared aórtica^{49,53}.

El estrés oxidativo, resultado de un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y los sistemas antioxidantes endógenos, es un proceso clave en el desarrollo de las enfermedades vasculares y, por lo tanto, del AAT. Aunque no está del todo claro cuáles son los mecanismos actuales de generación de ROS y cómo este afecta a la biología de las CMVLs, se han encontrado niveles altos de marcadores de estrés oxidativo y disfunción endotelial en pacientes con AAT, evidenciando una clara relación entre ROS y la degeneración vascular⁵⁴. En la capa media de la pared aórtica, existen menores niveles de superóxido dismutasa extracelular, agente antioxidante, y una mayor peroxidación lipídica, lo que sugiere

un daño estructural como consecuencia de una capacidad antioxidante reducida. A nivel celular, el estrés oxidativo es otro de los factores que promueve el mencionado cambio fenotípico patológico de las CMLVs, favoreciendo el perfil celular sintético mediante la acumulación de ROS y la sobreexpresión de distintos factores de crecimiento, lo que está asociado con un remodelado patológico de la MEC en el AAT de la aorta ascendente^{55,56}. Todo ello induce la pérdida de integridad estructural, con degradación del colágeno y elastina, apoptosis celular y remodelado de la matriz, proporcionando un entorno proclive a la dilatación aneurismática en la aorta ascendente⁵⁷.

Unas de las principales protagonistas en la generación de ROS son las mitocondrias. Estos orgánulos son fundamentales para la producción de ATP, pero también generan ROS como subproducto de la cadena respiratoria. Las mitocondrias se adaptan rápidamente a los factores de estrés alterando su morfología mediante la fisión y la fusión, optimizando las funciones bioenergéticas y regulando la autorrenovación a través de la biogénesis o la degradación mediante la autofagia para mantener la homeostasis celular⁵⁸. Sin embargo, cuando se dañan y no son capaces de adaptarse adecuadamente a las necesidades celulares, aumenta la generación de ROS y se altera la biogénesis mitocondrial y el número de copias del ADN mitocondrial (ADNmt), generando un ciclo de retroalimentación que exacerba el estrés oxidativo en la pared aórtica y favorece la activación de rutas inflamatorias y la muerte de las CMLVs⁵⁹. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la disfunción mitocondrial no solo contribuye al aumento del estrés oxidativo, sino que se propone como un actor fundamental en la pérdida de integridad estructural del vaso y en la progresión del AAT. De hecho, la disfunción mitocondrial se ha descrito como uno de los mecanismos responsables de los AAT sindrómicos⁶⁰.

La túnica adventicia también participa en la evolución del AAT al promover el desarrollo de neovasos⁶¹ y la migración y transformación de los fibroblastos⁶² hacia la capa media. Se ha observado que estos neovasos tienen uniones endoteliales defectuosas y carecen de células murales, lo que sugiere una disminución de las interacciones de las células endoteliales en dichos neovasos y, por consiguiente, una alta permeabilidad, lo que conduce a la acumulación de proteínas plasmáticas en la pared aneurismática alterando la homeostasis proteica^{63,64}. Además de los defectos en la neovasculatura, se ha demostrado que el vasa vasorum se ve alterado en muestras de AAT ascendentes humanas, como lo demuestran su tamaño aberrante, su abundancia, densidad y el grosor de su pared⁶⁵. En cuanto a la migración de los fibroblastos hacia la capa media, se trata de un mecanismo adaptativo inicial frente al desgaste de la pared aórtica, pero su activación sostenida y desregulada acaba afectando negativamente al remodelado vascular patológico, promoviendo aún más la degradación de la MEC mediante la producción de colágeno y MMPs y su transformación hacia un fenotipo similar al de las CMLVs, debilitando así la pared aórtica⁶⁶.

La activación, migración y diferenciación de los fibroblastos de la adventicia, así como la neovascularización, está en parte promovida por la señalización mediante el TGF- β , que es un regulador clave en la homeostasis vascular. Sin embargo, se ha visto que en el AAT hay una activación excesiva de este factor de crecimiento, lo que lleva a un aumento en la producción local de ROS, fibrosis adventicial y alteraciones en la arquitectura de la MEC, favoreciendo la pérdida de elasticidad y el debilitamiento de la pared aórtica⁶⁷. Además, también induce una respuesta inflamatoria con infiltración de células inmunes y mayor producción de proteoglicanos, contribuyendo al desarrollo y progresión del AAT⁶⁸. Otra de las vías de señalización importantes implicadas en el AAT es la vía del factor nuclear kappa B (NF κ B, por sus siglas en inglés), que regula al alza la expresión de moléculas de adhesión y desencadena la infiltración de macrófagos e inflamación en las capas adventicia y media⁶⁹ (Figura 3).

En conjunto, la progresión del AAT ascendente representa el resultado de una compleja interacción de procesos celulares, mecánicos y moleculares que comprometen la integridad estructural de la pared aórtica. Por ello, el AAT debe estudiarse a diferentes niveles moleculares, desde los orgánulos celulares hasta el plasma, con el fin de comprender los mecanismos subyacentes específicos, que no son solo esenciales para explicar la patogénesis del AAT, sino también para identificar posibles biomarcadores y dianas terapéuticas.

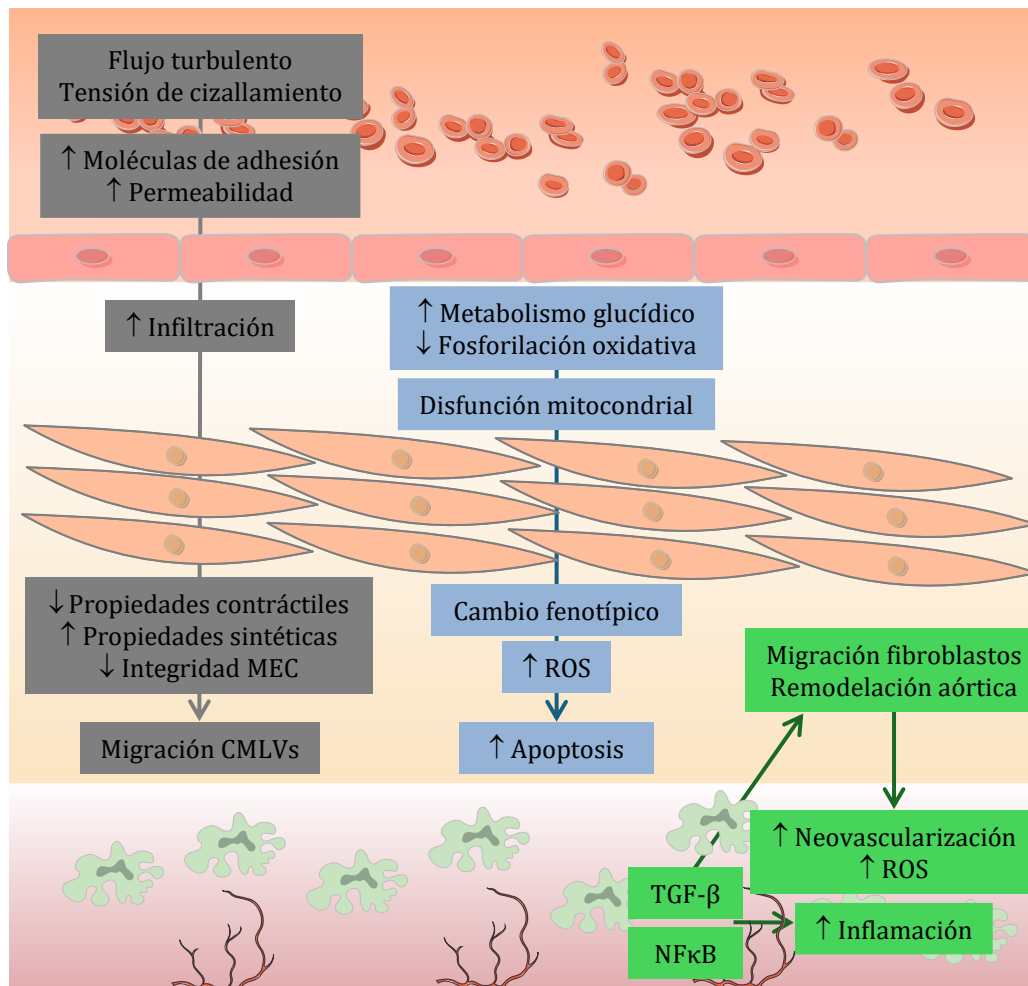


Figura 3. Principales cambios estructurales y celulares en el desarrollo del AAT. En gris, cambios mecánicos, permeabilidad y componentes inflamatorios; en azul, alteraciones en la capa media y las CMLVs; en verde, el papel de la adventicia, neovascularización y migración de los fibroblastos.

3.3. AAT y válvula aórtica bicúspide

Además de las afecciones genéticas y de factores adquiridos, como la hipertensión, el tabaquismo, la dislipidemia, la edad avanzada, las enfermedades infecciosas o los traumatismos físicos²¹, la presencia de una válvula aórtica bicúspide (VAB) en lugar de una válvula aórtica tricúspide (VAT) se considera un factor de riesgo independiente para el desarrollo del AAT⁷⁰.

Una válvula aórtica normal (VAT) consta de tres valvas casi idénticas semilunares. En cambio, una VAB está formada por dos valvas de tamaño desigual, en la que el patrón más común es que dos de las tres valvas estén fusionadas. El caso más frecuente es el que afecta a las valvas derecha e izquierda (patrón de fusión RL), seguido de la fusión de las valvas derecha y no

coronaria (patrón de fusión RN). El patrón menos frecuente implica la fusión de las cúspides izquierda y no coronaria⁷¹.

La presencia de VAB es la cardiopatía congénita más frecuente, con una incidencia en la población global de alrededor del 0,5-2,0%, siendo los hombres los más afectados^{72,73}. En la etapa inicial de la vida, la existencia de la VAB es imperceptible. Sin embargo, es en la edad adulta cuando se manifiestan los síntomas y se desarrollan diferentes patologías³⁴. La mayoría de estos pacientes desarrollan disfunción de la válvula aórtica, estenosis y regurgitación aórtica y también son más propensos a desarrollar dilatación de la aorta ascendente, haciéndolo además a una edad más temprana⁷¹. Aproximadamente, el 50% de los pacientes con VAB desarrollan AAT⁷⁴, siendo la aorta ascendente de los adultos con VAB de mayor calibre que la de los adultos con VAT⁷⁵.

Los factores de riesgo identificados que se asocian al AAT en pacientes con VAB no sólo son complejos, sino que varían entre los distintos estudios en función del diámetro aórtico inicial, la edad de los pacientes y/o el tiempo de seguimiento⁷⁶. Particularmente, el AAT en pacientes con VAB puede desarrollarse con funcionalidad de la válvula o bien tras la sustitución de la misma por una VAT, lo que sugiere que el desarrollo del AAT no sólo se produce por las alteraciones inherentes en la hemodinámica, la pared arterial o la etiología genética, sino que existen también mecanismos operativos aún desconocidos.

Los cambios fisiopatológicos que se observan en la aortopatía bicúspide son distintivos al AAT asociado a VAT. El remodelamiento patológico medial que se produce de una forma precoz en estos pacientes es el resultado de una desregulación de las CMLVs dentro de la media aórtica⁷⁷. Estas pierden marcadores contráctiles, como son la alfa actina de músculo liso (α -SMA, por sus siglas en inglés) y la proteína 22 alfa del músculo liso (SM22 α , por sus siglas en inglés), adoptando un fenotipo sintético que secreta colágeno y elastina desorganizada, además de una mayor abundancia de MMPs. El procesamiento anómalo de las CMLVs de la proteína de la MEC FBN1 inicia el desprendimiento de dichas células de la MEC, lo que lleva a la liberación de las MMPs junto con sus inhibidores. Esta degradación de la MEC y la fragmentación de la elastina y las láminas conduce a un aumento de la apoptosis de las CMLVs y la destrucción de la capa media, lo que afecta negativamente a la integridad estructural y la flexibilidad de la aorta⁷⁸. Las mutaciones o hipermetilación del gen *NOTCH1* están fuertemente vinculadas al desarrollo del AAT en presencia de una VAB⁷⁹. Esta señalización regula la diferenciación de las CMLVs y la homeostasis endotelial. En pacientes con AAT y VAB, se observa una disminución de la señalización NOTCH, lo que favorece la apoptosis aberrante y una diferenciación anormal de las CMLVs, contribuyendo así al debilitamiento de la pared aórtica y al desarrollo del AAT⁸⁰. También se han descrito algunos microARNs como responsables del desequilibrio entre MMPs y TIMPs en la aorta ascendente con VAB, sugiriendo una regulación postranscripcional del remodelado de la MEC⁸¹.

En este sentido, se ha descrito un aumento de la activación de la transición epitelio-mesénquima en los pacientes VAB-AAT en comparación con aquellos con VAT⁸². La transición epitelio-mesénquima es un proceso biológico crucial que implica la pérdida de marcadores endoteliales, como la VE-cadherina y CD31, y la adquisición de un fenotipo de CMLV, con un aumento en la expresión de α -SMA. Esto favorece la pérdida de adhesión celular y la adquisición de propiedades migratorias con el objetivo de remodelar la pared aórtica. Sin embargo, este proceso da lugar al aumento de rigidez en la misma y degradación de la MEC, posiblemente mediado por TGF- β 1, NOTCH1 y un flujo hemodinámico excéntrico, lo que lleva a una mayor apoptosis de las CMLVs y un remodelado arterial patológico más precoz⁸³.

Es de especial relevancia en este tipo de AAT el papel del TGF- β , cuya señalización se ha visto más activada que en pacientes con VAT. Múltiples estudios han demostrado la importante influencia que tienen los patrones anormales del flujo aórtico torácico en la señalización subyacente de la vía TGF- β de la pared aórtica, los cuales amplifican la respuesta de la capa media y adventicia a través de la señalización de este factor de crecimiento, la degradación de la elastina, la localización de la dilatación y el riesgo de eventos aórticos^{84,85}. Este flujo diferencial presente con la VAB, que produce un aumento en la tensión de cizallamiento en la aorta de estos pacientes, induce una activación proinflamatoria a través NF- κ B, la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1)⁸⁶⁻⁸⁸, así como la producción de ROS de manera crónica, lo que contribuye a una mayor susceptibilidad al remodelado patológico de la MEC⁸⁹.

Además, la activación patológica de la vía PI3K/AKT, a través de señales mediadas por el factor de crecimiento endotelial (EGF, por sus siglas en inglés), la angiotensina II y el TGF- β , estimula vías como eNOS, mTOR, NF- κ B y WNT, generando un fenotipo sintético y proinflamatorio de las CMLVs favorecido por el estrés oxidativo y la inflamación⁹⁰.

Otro factor importante relacionado con la aortopatía bicúspide es el óxido nítrico. Este compuesto es secretado por las CE y promueve la dilatación de los vasos sanguíneos. Los cambios en su señalización o biodisponibilidad pueden alterar la homeostasis vascular y, por lo tanto, convertirse en un modulador importante del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como el AAT⁹¹.

Por todo ello, aunque la presencia de VAB es un factor de riesgo independiente para desarrollar AAT, parece claro que los riesgos se ven agravados por un espectro de variables que afectan al modo en que se desarrolla y remodela la pared aórtica torácica.

3.4. Diagnóstico, prevención y tratamiento

El diagnóstico del AAT suele ser incidental durante pruebas de imagen de revisiones o diagnósticos no relacionados con la patología. Por ello, es probable que las tasas reales de incidencia y prevalencia de los AAT estén muy subestimadas, ya que la formación del AAT es silente y los pacientes permanecen asintomáticos⁹². Esto hace que el 95% de todos los casos no se detecten hasta que se produce un evento aórtico agudo o la expansión provo que una compresión de las estructuras anatómicas cercanas. Por lo tanto, cuando aparecen los síntomas, el AAT suele ser muy grande y presentar riesgo de rotura, por lo que está asociado a altas tasas de mortalidad⁹³.

Hasta la fecha, no existe una recomendación general de cribado para las patologías de la aorta torácica. En pacientes con sospecha de AAT, el diagnóstico se realiza basado en el diámetro de la aorta mediante pruebas de imagen. La angiografía por tomografía computerizada (TC) desde la carótida hasta las arterias femorales comunes suele ser la modalidad diagnóstica de primera línea. La resonancia magnética (RM) puede ser una herramienta diagnóstica alternativa, especialmente en pacientes más jóvenes, para reducir la exposición a la radiación⁹⁴. Del mismo modo, la estimación del riesgo de rotura se basa actualmente en el diámetro de la aorta. Sin embargo, el diámetro de la aorta no es suficiente para predecir la disección aórtica y prevenir un desenlace fatal⁷⁰. Aunque la prueba del dímero D tiene valor diagnóstico para las disecciones aórticas agudas⁹⁵, carece de precisión en los AAT⁹⁶ y, hoy en día, no existe ningún análisis de sangre que permita diagnosticar el AAT de forma satisfactoria. De hecho, la mayoría de las disecciones de aneurismas no cumplirían los criterios para la cirugía profiláctica⁹⁷. En

particular, se detectó un diámetro normal de la aorta ascendente en el 63% de las mujeres y el 74% de los hombres que sufrieron una disección²². El uso del diámetro como principal característica de estimación del riesgo puede tener incluso un impacto negativo, especialmente en las mujeres, ya que su incidencia de eventos fatales en aneurismas con poca dilatación es tres veces mayor que en los hombres, incluso si el diámetro se corrige por el tamaño corporal^{98,99}. Es por ello por lo que se necesitan nuevas estrategias que ayuden a comprender mejor las diferencias moleculares subyacentes al desarrollo del AAT que puedan derivar en marcadores de diagnóstico, riesgo y pronóstico¹⁰⁰.

Actualmente, no hay marcadores diagnósticos o pronósticos disponibles en la clínica para el AAT, ni tratamientos farmacológicos eficaces, debido al conocimiento limitado de los mecanismos patogénicos del AAT no sindrómico. Esto se traduce también en una falta de programas específicos de prevención del AAT, más allá de las directrices generales para la prevención de las enfermedades cardiovasculares, como son el control de la presión arterial, el tratamiento de la hiperlipidemia, el dejar de fumar y la actividad física de baja intensidad.

La cirugía profiláctica es el único tratamiento disponible para reducir el riesgo de rotura o disección en el segmento afectado¹⁶, ya que, en la actualidad, no existe ningún tratamiento farmacológico eficaz que pueda ralentizar o inducir una remodelación favorable de la pared aórtica para revertir la dilatación aneurismática. El criterio de esta cirugía profiláctica depende del tamaño del aneurisma, la tasa de crecimiento y los factores de riesgo específicos del paciente¹⁰¹. De manera general, está indicada cuando el diámetro aórtico supera los 50 mm, aunque la dilatación entre 40 y 50 mm también es clínicamente relevante dependiendo de la naturaleza y la ubicación del aneurisma, así como de la presencia de factores de riesgo^{21,92}. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, existe un consenso generalizado sobre la falta de sensibilidad y especificidad del diámetro aórtico como estimador adecuado del riesgo de disección/rotura, lo que a menudo provoca que esto ocurra en pacientes con un diámetro aórtico por debajo del umbral óptimo y que otros pacientes se sometan a cirugía a pesar de no existir una amenaza real de disección o ruptura¹⁰².

La ausencia de fármacos específicos que proporcionen un tratamiento eficaz para el AAT se suple con el uso de terapias de otras afecciones cardiovasculares. De esta manera, las terapias convencionales para el AAT se han centrado en reducir el estrés de la pared aórtica mediante la disminución de la presión arterial y la resistencia vascular sistémica. Concretamente, se recomienda el uso de betabloqueantes como tratamiento de primera línea en todas las enfermedades de aneurisma torácico^{35,103}, así como un control estricto de la presión arterial a <130/80 mm Hg¹⁰⁴. Los bloqueantes de los receptores de la angiotensina, que actúan sobre el receptor de la angiotensina II tipo 1, con la consiguiente reducción de la señalización del TGF- β , también se han investigado como posible diana terapéutica, pero no se ha visto hasta la fecha una mejora en comparación con la protección que proporciona el tratamiento con betabloqueantes^{21,24}. Sin embargo, aunque no hay pruebas suficientes para recomendar el tratamiento con antagonistas de los receptores de la angiotensina frente al tratamiento con betabloqueantes, su uso es razonable cuando el tratamiento con betabloqueantes se tolera mal. Contrariamente, el uso de fluoroquinolonas parece aumentar el riesgo de formación de aneurismas aórticos y disecciones en la población general, especialmente en personas de edad avanzada, posiblemente a través de un desequilibrio de MMPs y TIMPs y una reducción del colágeno¹⁰⁵. También se ha observado una reducción de eventos adversos (muerte, rotura, disección) con la ingesta de estatinas¹⁰⁶. Sin embargo, a pesar de estos avances, el AAT sigue siendo un reto en términos de prevención y optimización de los resultados de los pacientes.

Aunque el AAT ha sido tradicionalmente considerado una entidad poco frecuente, en los últimos años se ha observado un aumento progresivo en su prevalencia e incidencia, probablemente favorecido por el envejecimiento poblacional, una mayor vigilancia clínica de pacientes con factores predisponentes y a la mejora y mayor accesibilidad de las técnicas de imagen, que permiten un diagnóstico más preciso en la práctica clínica actual⁹⁴. Siguiendo los requisitos de los especialistas para mejorar la práctica clínica, nuevas investigaciones que permitan dilucidar las vías de acción específicas del AAT pondrán de relieve nuevas dianas terapéuticas, urgentes para esta patología, y darán lugar a nuevos campos de investigación para el desarrollo de fármacos. Esto es extremadamente importante, ya que, como señalan los expertos “existe un consenso universal sobre la urgente necesidad de mejorar la identificación y la estratificación del riesgo de la aortopatía torácica”¹⁸ y “se necesita urgentemente un tratamiento médico”¹⁰⁷, ya que “todavía hay opciones terapéuticas limitadas para retrasar la progresión del AAT hacia la disección y ninguna para prevenirla”¹⁰⁸. Como se ha mencionado, el sexo también es un factor que influye en el crecimiento del AAT, luego las estrategias terapéuticas habrían de desarrollarse de forma diferenciada entre hombres y mujeres.

HIPÓTESIS

La hipótesis de esta tesis doctoral es que existen cambios moleculares en la aorta durante el desarrollo del aneurisma aórtico torácico no sindrómico antes de la rotura aórtica. Estos cambios implican una compleja red de actores, incluyendo proteínas y metabolitos, que condicionan la funcionalidad celular y mitocondrial y afectan a la matriz extracelular como una de las entidades responsables de la integridad estructural. Hipotetizamos además que estos cambios que se producen en la aorta tienen su reflejo en un fluido biológico accesible, como el plasma.

Por otro lado, hipotetizamos que, tanto las alteraciones esperadas como su implicación fisiopatológica, son distintas en el desarrollo del aneurisma en función de la presencia de una válvula aórtica tricúspide o bicúspide.

El estudio específico de estas características moleculares proporcionará la información necesaria para comprender la patología y los mecanismos operantes que predisponen al desarrollo del aneurisma aórtico torácico cuando está asociado a una u otra válvula aórtica. Los resultados obtenidos darán lugar a la identificación de nuevos mecanismos de acción además de proporcionar marcadores diagnósticos y dianas terapéuticas que, en última instancia, mejorarán el manejo y el tratamiento de los pacientes de manera personalizada.

OBJETIVOS

El AAT es una dilatación progresiva de la aorta torácica que se desarrolla de forma silenciosa y asintomática hasta que se produce una rotura o disección de la aorta con consecuencias fatales en la mayoría de los casos. Además, existe una mayor incidencia de AAT en sujetos con VAB por razones desconocidas. A pesar de su gravedad, no existen herramientas de diagnóstico y este es mayoritariamente fortuito, por lo que la prevalencia del AAT está subestimada. Actualmente, no hay disponibilidad de tratamiento farmacológico y el único tratamiento efectivo es la cirugía profiláctica.

La falta de herramientas de diagnóstico y fármacos efectivos es el resultado del conocimiento limitado de los mecanismos fisiopatológicos que operan en el desarrollo de la dilatación aórtica torácica y, en particular, de aquellos relacionados específicamente con la existencia de VAB.

Es por ello que el **objetivo general** de esta tesis doctoral es estudiar los mecanismos operantes en el desarrollo del AAT no sindrómico a través de un enfoque multidisciplinar que identifique las alteraciones moleculares subyacentes, evaluando los mecanismos similares y diferenciales entre los pacientes que presentan dilatación aórtica asociada a VAT y VAB.

Para lograr este objetivo general, los **objetivos específicos** son los siguientes:

- A. Identificación de las alteraciones proteicas y procesos biológicos diferenciales que ocurren en las células musculares lisas vasculares de la aorta con AAT asociada a VAT y a VAB.
- B. Caracterización de la contribución mitocondrial al desarrollo del AAT en pacientes con VAT y VAB. Análisis diferencial molecular, morfológico y funcional.
- C. Determinación de rutas metabólicas implicadas en el desarrollo del AAT asociado a VAT y VAB.
- D. Definición de un panel molecular en plasma con capacidad diagnóstica del AAT y específico para cada tipo valvular.
- E. Propuesta de rutas de acción para el manejo diferencial del AAT en pacientes con VAT y VAB.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes y obtención de muestras

Selección de pacientes. Los pacientes con AAT no sindrómico y los pacientes control (C) fueron reclutados en el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España). En total, se han reclutado 124 pacientes, 63 con AAT y 61 C.

Los pacientes se clasificaron en función de la dilatación aórtica y el tipo de válvula (VAT o VAB), definido de forma intraoperatoria, en cuatro grupos clínicos: VAT-C, VAT-AAT, VAB-C y VAB-AAT. El diámetro de la aorta ascendente se midió mediante angiografía por TC. Todos los pacientes incluidos en el estudio son mayores de 18 años con intervención quirúrgica programada de aorta ascendente (para el grupo AAT) o de reemplazo valvular sin dilatación aórtica (para el grupo C). La toma de decisiones quirúrgicas se realizó siguiendo las guías de la Sociedad Europea de Cardiología¹⁰⁹. Se excluyeron los pacientes con cirugía cardíaca previa, neoplasia, inestabilidad hemodinámica, tratamiento con corticoides o inmunosupresores, infección activa o muerte intrahospitalaria. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local (PIC143-2016_FJD, PIC029-21_FJD, PIC094-24_FJD) cumpliendo con los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Los datos clínicos de los pacientes se recopilaron a partir de dos bases de datos clínicas exhaustivas: FJD-Casiopea y la base de datos del Departamento de Cirugía Cardíaca SICCS (Sistema de Información en Cirugía Cardiovascular Sorin). La base de datos Casiopea recoge toda la información clínica de los pacientes, incluyendo el historial médico y todos los estudios complementarios, lo que permite el acceso al seguimiento analítico y a las pruebas de imagen. La base de datos SICCS es utilizada habitualmente por los departamentos de cirugía cardiovascular en Europa e incluye información clínica, quirúrgica e intrahospitalaria específica de los pacientes sometidos a cirugía cardíaca.

Obtención y procesamiento de muestras. De cada paciente se recogieron, siempre que fue posible, muestra de plasma, orina y tejido aórtico. Las muestras de sangre y orina se recogieron antes de cualquier procedimiento quirúrgico o anestésico. El plasma se aisló de la sangre recogida en tubos con EDTA por centrifugación a 1.400 g durante 10 min a 4°C y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Las muestras de orina se recogieron y guardaron a -80°C hasta su análisis. Las biopsias aórticas se obtuvieron de la cara anterior de la aorta ascendente, 1-2 cm por encima de la unión sinotubular, durante las intervenciones quirúrgicas correspondientes. Las muestras de tejido se lavaron inmediatamente en solución salina: una parte se congeló en fresco y otra parte se fijó en formalina e incluyó en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés). Se almacenaron a -80°C y a 4°C, respectivamente, para su posterior análisis. Una tercera parte se procesó para la obtención de cultivos primarios como se describe a continuación.

2. Análisis diferencial de las células musculares lisas vasculares (CMLVs) de aorta en el AAT asociado a VAT y VAB y traslación a biopsia líquida

2.1. Cultivos primarios de CMLVs de aorta

2.1.1. Obtención de cultivos celulares primarios

A partir de muestras de tejido aórtico (2-3 cm²) de pacientes con AAT y C y ambos tipos valvulares se generaron cultivos primarios de células musculares lisas vasculares (CMLVs) humanas (una línea celular por donante). El segmento arterial se incubó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12; Lonza) con 0,1% colagenasa tipo 1 (Gibco) durante la noche a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. Las células se sembraron en placas de Petri recubiertas previamente con gelatina estéril en medio DMEM-F12 suplementado con 0,1 mg/mL heparina (Merck), 30 µg/mL factor de crecimiento de CEs (Merck), 1% penicilina/estreptomicina (P/E; Lonza), 1% L-glutamina (Lonza), 10% fungizona (Lonza) y 20% suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés).

Las CMLVs se seleccionaron eliminando las CEs con el anticuerpo CD31 humano (BDbiosciences) y un anticuerpo secundario unido a partículas magnéticas (Dynabeads antimouse IgG del kit CELLection Pan Mouse IgG; Invitrogen). Las CMLVs se mantuvieron en DMEM con 10% FBS hasta su confluencia y se almacenaron a -80°C en FBS con 10% dimetilsulfóxido (DMSO) y, posteriormente, en nitrógeno líquido hasta su análisis.

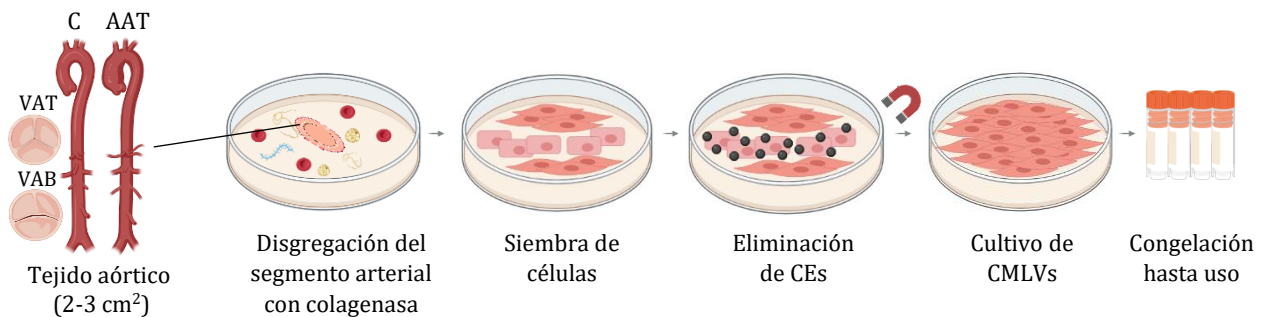


Figura 4. Obtención de cultivos primarios de CMLVs a partir de tejido aórtico humano. Creada con BioRender.com.

2.1.2. Caracterización de CMLVs mediante inmunofluorescencia

Las CMLVs se tiñeron con marcadores específicos para comprobar la pureza de los cultivos primarios y garantizar que no hubiese contaminación de CEs.

Para ello, se sembraron 3×10^4 células por pocillo en una placa de Petri previamente tratada con gelatina estéril durante 20 min a 37°C. Cuando alcanzaron un 70-80% de confluencia, se fijaron con paraformaldehído a 4°C y se dejaron 15 min en agitación a temperatura ambiente. Tras cuatro lavados con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS, por sus siglas en inglés) obtenida tras la dilución de PBS 10X (27,6 g de NaH₂PO₄; 35,6 g de Na₂HPO₄·2H₂O y 175,3 g de NaCl en H₂O destilada; pH: 7,2), se permeabilizó la membrana de las células con 0,15% Tritón en PBS 1X durante 30 min en agitación. Tras lavar nuevamente cuatro veces con PBS 1X, se bloquearon las uniones inespecíficas con 4% albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en PBS 1X y un 10% (para CD31, calponina y S100A4) o un 6% (para α-SMA) del suero de la especie en la que se generó el anticuerpo secundario, y se añadió el bloqueo de las regiones

Fcs (Invitrogen, dilución 1:100) durante 1h a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS 1X cuatro veces, se incubó con los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C (Tabla 1). Tras realizar cuatro lavados con PBS 1X, se añadieron los anticuerpos secundarios en una dilución 1:200 durante 1h a temperatura ambiente en oscuridad (Tabla 1). Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, por sus siglas en inglés; Sigma) en una dilución 1:10.000 durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se montaron con medio de montaje específico para fluorescencia (Fluorsave, Merck).

Tabla 1. Anticuerpos empleados en inmunofluorescencia para la caracterización de las CMLVs.

Anticuerpo primario	Referencia (Casa comercial)	Dilución	Anticuerpo secundario	Referencia (Casa comercial)
CD31	ab28364 (Abcam)	1:50	Alexa Fluor 488	A-212206 (Invitrogen)
Calponina	ab46794 (Abcam)	1:200	Alexa Fluor 546	A-11003 (Invitrogen)
α -SMA	06198 (Sigma)	1:1000		
S100A4	ab93283 (Abcam)	1:50		

2.2. Proteómica cuantitativa con marcaje isobárico y espectrometría de masas no dirigida

Para el análisis proteómico, se emplearon un total de 9 muestras de CMLVs, correspondientes a los grupos VAT-AAT (n = 4) y VAB-AAT (n = 5).

2.2.1. Extracción proteica, digestión y marcaje de péptidos

Extracción de proteínas. Los extractos de proteínas se obtuvieron utilizando un tampón de lisis compuesto por 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2% dodecil sulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) y 10 mM Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, por sus siglas en inglés), complementado con cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Complete Mini EDTA-free y phosSTOP, Roche). Las muestras se hirvieron durante 5 min y se dejaron a temperatura ambiente con agitación durante 20 min para la solubilización y reducción de las proteínas. Tras centrifugar a 15.000 g durante 15 min, se recogieron los sobrenadantes. La concentración de proteína se midió utilizando el kit RC DC Protein Assay (BioRad Laboratories).

Digestión proteica. Se partió de 100 μ g de proteína total y se digirieron mediante el método de digestión en filtro (FASP, por sus siglas en inglés)¹¹⁰. Para ello, los extractos de proteína se diluyeron en un tampón denominado UA (7 M urea; 0,1 M Tris-HCl; pH 8,5) y se cargaron en dispositivos de filtración centrífuga de 30 kDa (NanoSep 10k Omega, Pall Life Sciences). Las proteínas se alquilaron con 20 mM yodoacetamida en UA durante 30 min en la oscuridad, seguido de tres lavados con UA y tres lavados con 50 mM bicarbonato amónico. La digestión se llevó a cabo durante la noche a 37°C utilizando tripsina modificada (Promega) en bicarbonato amónico 50 mM a una proporción proteína:tripsina de 40:1. Los péptidos tripticos resultantes se obtuvieron por filtración en 50 mM bicarbonato amónico y 0,5 M NaCl. Se añadió ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) a una concentración final del 1%, para favorecer la retención posterior de los péptidos, se desalaron utilizando columnas Oasis-HLB (Waters) y se secaron utilizando un sistema Speed Vac (Thermo Savant).

Marcaje isobárico. Los péptidos tripticos se disolvieron en 150 mM tampón bicarbonato de trietilamonio (TEAB, por sus siglas en inglés). La concentración de péptidos se determinó midiendo los enlaces amida con el sistema Direct Detect (Millipore). Se marcaron cantidades

iguales de cada muestra peptídica utilizando el reactivo TMT 11plex (Thermo Fisher Scientific) según el protocolo del fabricante con pequeñas modificaciones. Brevemente, los péptidos se marcaron con 0,8 mg de reactivos TMT reconstituidos en 70 μ L de acetonitrilo (ACN). Tras una incubación de 1 h a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con TFA al 0,5% y se incubó durante 10 min. Los péptidos, marcados con una etiqueta TMT diferente para cada muestra, se combinaron en una única mezcla, se concentraron utilizando un Speed Vac (Thermo Savant) y se pasaron por columnas Oasis HLB para desalar y eliminar el exceso de reactivos de marcaje. La mezcla se secó utilizando el Speed Vac (Thermo Savant) para su posterior análisis. Para el análisis completo del proteoma, una alícuota de la mezcla peptídica marcada se fraccionó en seis partes con el objetivo de aumentar la cobertura proteica, ya que se mejora la detección de proteínas menos abundantes al distribuir la complejidad de la muestra entre varias fracciones, maximizando así las oportunidades de identificación de péptidos menos abundantes. Para ello, se utilizó el kit High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation (Pierce), siguiendo el protocolo del fabricante.

2.2.2. Análisis por espectrometría de masas

El análisis de alta resolución de los péptidos marcados con TMT se realizó con un cromatógrafo de líquidos EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific). Se añadió una disolución que contenía 0,2% de ácido fórmico y 2% de ACN a los péptidos, se cargaron en una precolumna (PepMap100 C18 LC 75 μ m ID, 2 cm, Thermo Fisher Scientific) y se separaron en línea en una columna analítica NanoViper PepMap100 C18 LC (75 μ m ID, 50 cm, Thermo Fisher Scientific) utilizando un gradiente continuo de fase B de 5-32% durante 240 min y de 32-90% durante 5 min a un flujo de 200 nL/min. Las fases A y B fueron 0,1% de ácido fórmico en agua y 0,1% de ácido fórmico en ACN, respectivamente. Cada ciclo de masas incluía espectros de los iones parentales obtenidos mediante Transformada de Fourier con resolución mejorada (60.000 de resolución) en el intervalo de masas de relación masa/carga (m/z) de 400-1.500, seguidos de espectros MS/MS de los iones parentales más intensos con estados de carga 2-4 en modo de adquisición dependiente de datos (DDA, por sus siglas en inglés). El valor establecido para el control automático de ganancia en el Orbitrap se fijó en 200.000, con un tiempo máximo de inyección de 50 ms. La fragmentación se realizó a una energía de colisión normalizada del 34%, con un objetivo de 50.000 iones, una resolución de 30.000, un tiempo de inyección de 120 ms y una exclusión dinámica fijada en 40 s.

2.2.3. Identificación de péptidos

Para la identificación de péptidos, los espectros adquiridos se analizaron en el programa Proteome Discoverer 2.5¹¹¹ (Thermo Fisher Scientific), utilizando el algoritmo Sequest HT¹¹² contra la base de datos Uniprot que contiene todas las secuencias de humano (Uniprot, SwissProt y Trembl; enero de 2020; 32.456 secuencias), con secuencias señuelo generadas utilizando DecoyPyrat¹¹³ para estimar la tasa de falsos positivos en la identificación peptídica. Los parámetros de la búsqueda incluyeron digestión con tripsina con hasta dos sitios de corte omitidos, tolerancias de masa de los iones precursores y de los iones fragmento de 2 Da y 0,03 Da, respectivamente, cisteína carbamidometil (+57,021) y modificaciones TMT (+229,1629) en los residuos N-terminal y lisina del péptido como modificaciones fijas. Como modificaciones dinámicas, se seleccionaron la oxidación de metionina (+15,995), la hidroxilación de prolina (+15,995), la acetilación del N-terminal (+42,011) y la fosforilación de serina/treonina (+79,096). El rango de carga del precursor se fijó en 2-4.

2.2.4. Análisis cuantitativo de péptidos y proteínas

Se utilizó el programa libre iSanXoT^{114,115} para cuantificar, en los espectros de fragmentación, la intensidad de los iones reportero a partir del marcaje isobárico. Inicialmente, la tasa de falsos descubrimientos (FDR, por sus siglas en inglés) se calculó utilizando la puntuación Xcorr corregida^{116,117}, con un filtro adicional de tolerancia de masa del ion precursor de 12 ppm¹¹⁸. Los péptidos identificados deben tener un FDR del 1% o inferior. La asignación de péptido a proteína se realizó mediante un método desarrollado internamente en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), en el que cada péptido se asigna a la proteína más probable de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. La información cuantitativa de las intensidades del ion reportero se integró desde el nivel de espectro al de péptido y después al de proteína, para cuantificar la abundancia relativa de cada proteína en los grupos clínicos comparados. Para ello, se utilizó el modelo estadístico de ponderación de espectros, péptidos y proteínas (WSPP, por sus siglas en inglés)¹¹⁹ y el Algoritmo Genérico de Integración (GIA, por sus siglas en inglés)¹²⁰. Este modelo normaliza la cuantificación de la abundancia de proteínas como log₂-ratios, con valores expresados en unidades de desviación estándar (Zq) según sus varianzas estimadas.

2.2.5. Biología de sistemas

Además del análisis de proteínas a nivel individual, se realizó un análisis funcional de sus respuestas coordinadas. Para ello, se empleó el algoritmo del triángulo de biología de sistemas (SBT, por sus siglas en inglés)¹²⁰. Las proteínas se agruparon en clases funcionales (categorías) utilizando la base de datos *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* (DAVID)¹²¹. Para cada categoría, el log₂-ratio expresado como unidades estandarizadas según sus varianzas estimadas (Zc) se calcula como la media ponderada de la variación de sus proteínas.

2.2.6. Análisis estadístico

Las diferencias en la abundancia de péptidos y proteínas y en el comportamiento funcional coordinado se estimaron comparando las medianas Zq o Zc de los grupos, respectivamente, determinadas por el modelo estadístico WSPP. Las proteínas o los cambios funcionales se consideran estadísticamente significativos con un valor $p \leq 0,05$, basado en una comparación utilizando la prueba t de dos colas de los valores Z empleando *limma*¹²².

2.2.7. Mapeo de proteínas en la estructura celular

Las localizaciones celulares específicas de las proteínas identificadas se obtuvieron del mapa subcelular de la base de datos *Human Protein Atlas* (HPA, por sus siglas en inglés; 26 de enero de 2021; 18.592 entradas; <https://www.proteinatlas.org/>). Las localizaciones subcelulares incluían el núcleo (nucléolo, nucleoplasma y membrana nuclear), el citoplasma (citosol, filamentos de actina, filamentos intermedios, microtúbulos, centrosoma y mitocondrias) y las proteínas secretoras (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática, secretoma y vesículas extracelulares). Las proteínas del secretoma (proteínas secretadas) se investigaron más a fondo inspeccionando las bases de datos SecretomeP 2.0, HPA y Uniprot para identificar aquellas secretadas extracelularmente. Las proteínas secretadas por la vía clásica se clasificaron como tal en función del péptido señal predicho por *SignalP*. Las proteínas secretadas por la vía no clásica se seleccionaron en función de una puntuación $NN/SecP > 0,6$, correspondiente al umbral recomendado para secuencias de mamíferos, pero sin que al mismo tiempo se predijera que contuviesen un péptido señal.

2.3. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La traslación de las proteínas identificadas en las CMLVs al plasma se cuantificó mediante ensayos ELISA en un total de 87 pacientes AAT y C, comparando VAT-AAT (n = 12) y VAB-AAT (n = 28) y AAT vs. C en cada tipo valvular (VAT-C: n = 18, VAB-C: n = 29). Se emplearon los kits comerciales que se recogen en la Tabla 2, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Tabla 2. Proteínas plasmáticas cuantificadas mediante ELISA en los cuatro grupos clínicos de estudio.

FASTA	Gen	Proteína	Referencia (casa comercial)
P04083	C1QTNF5	Proteína 5 relacionada con el factor de necrosis tumoral del complemento C1q	Human CTRP5/C1QTNF5 Elisa Kit SK00594-06 (Aviscera Bioscience)
Q9BXJ0	CCDC80	Proteína 80 que contiene el dominio de bobina enrollada	Human URB/CCDC80 ELISA Kit PicoKine™ EK1962 (Boster Biological Technology)
P16070	CEMIP	Proteína inductora de la migración celular y de unión al hialuronano	Human Cell Migration Inducing Hyaluronan Binding Protein/KIAA1199 (CEMIP) ELISA Kit abx153315 (abbexa)
Q8WUJ3	CP	Ceruloplasmina	Human CP (Ceruloplasmin) ELISA Kit E-EL-H6026 (Elabscience)
P00450	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Quantikine® ELISA. Human EGFR Immunoassay DEGFR0 (R&D Systems)
Q9NZ08	SERPINE2	Nexina derivada de glía	Human Glia Derived Nexin/GDN (SERPINE2) ELISA Kit abx151668 (abbexa)
P07093	ITIH3	Cadena pesada del inhibidor de la alfa-tripsina	Human inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (ITIH3) ELISA Kit CSB-EL011896HU (CUSABIO)
Q06033	LAMA2	Subunidad alfa-2 de la laminina	Human Laminin Subunit Alpha-2 (LAMA2) ELISA Kit CSB-EL012726HU (CUSABIO)
P24043	LGALS3	Galectina-3	Quantikine® ELISA. Human Galectin-3 Immunoassay DGAL30/SGAL30/PDGAL30 (R&D Systems)
P17931	MEGF6	Proteína 6 con múltiples dominios similares al factor de crecimiento epidérmico	Human Multiple Epidermal Growth Factor-Like Domains Protein 6 (MEGF6) ELISA Kit abx532697 (abbexa)
O75095	MFGE8	Lactaderina	Quantikine® ELISA. Human MFG-E8 Immunoassay DFGE80 (R&D Systems)
Q08431	MMP2	Colagenasa tipo IV de 72 kDa	Matrix Metalloproteinase 2 ELISA Kit SEA100Hu (Cloud-Clone Corp.)
P08253	BGN	Biglicano	Human Biglycan (BGN) ELISA Kit CSB-EL002683HU (CUSABIO)
Q13332	FAP	Prolil endopeptidasa FAP	Human Prolyl Endopeptidase FAP ELISA Kit abx555418 (abbexa)
Q12884	SLIT2	Proteína homóloga 2 de Slit	Human Slit2 SimpleStep ELISA® Kit ab283885 (abcam)
O94813	SLIT3	Proteína homóloga 3 de Slit	Slit Homolog 3 (Slit3) ELISA Kit SED353 Hu (Cloud-Clone Corp.)
O75094	SPARC	Proteína secretada ácida y rica en cisteína	Human SPARC SimpleStep ELISA® Kit ab220654 (Abcam)
P09486	TIMP2	Inhibidor de la metaloproteinasas 2	Human TIMP-2 ELISA Kit PicoKine™ EK0522 (Boster Biological Technology)
P16035	THBS2	Trombospondina-2	Human THBS2 SimpleStep ELISA® Kit ab260051 (abcam)
P35442	THBS3	Trombospondina-3	Human Thrombospondin 3 (THBS3) ELISA Kit abx259888 (abbexa)
P49746	AZGP1	Glicoproteína alfa-2 asociada a zinc	Human Zinc-Alpha-2-Glycoprotein ELISA RD191093100R (Biovendor)

2.4. Daño oxidativo del ADN celular

La molécula 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) se midió en el ADN extraído de CMLVs de 9 pacientes (VAT-AAT: n = 4, VAB-AAT: n= 5) y de orina, de un total de 43 pacientes (VAT-AAT: n = 13, VAB-AAT: n= 30), ya que la orina es la mejor matriz no invasiva para evaluar la 8-OHdG debido a la estabilidad del compuesto en la orina y a que el daño oxidativo del ADN se refleja en su excreción¹²³. El ADN se extrajo de las CMLVs con el kit MasterPure Complete DNA and RNA Purification (Epicenter, Biosearch Technologies). El ADN desnaturalizado se digirió en nucleótidos mediante incubación durante 30 min a 37°C con la nucleasa P1 (New England Biolabs). Los nucleótidos se desfosforilaron ajustando el pH de la muestra a 7,5-8,5 e incubando a 37°C durante 10 min con la fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo Fisher Scientific). Se determinó la presencia de 8-OHdG en el ADN extraído de CMLVs y de orina mediante ELISA (ab201734), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.5. Perfil del ciclo celular mediante citometría de flujo

El perfil del ciclo celular se midió en un total de $1,5 \times 10^5$ células por paciente. El total de pacientes incluidos en este estudio fue de 13 y se comparó VAT-AAT (n = 5) con VAB-AAT (n = 8). Las CMLVs se descongelaron, se lavaron dos veces con PBS 1X, se fijaron en etanol frío al 70% durante 30 min a 4°C y, posteriormente a -20°C, y se almacenaron hasta su uso. Para el análisis, se lavaron dos veces en PBS 1X, se añadió una solución de 0,5 mg/mL de yoduro de propidio (Sigma), 0,01% de IGEPAL CA-630 (Merck) y 0,1 mg/mL de ARNasa A (Qiagen) en PBS 1X y se incubaron durante 3 h a 4°C en oscuridad. Durante la adquisición, se seleccionó la población celular de interés de acuerdo con los parámetros de dispersión lateral (SSC-A, por sus siglas en inglés) y dispersión frontal (FSC-A, por sus siglas en inglés), previamente optimizados para el tamaño y la complejidad de las CMLVs (FSC: 250V y SSC: 320V). Posteriormente, se llevó a cabo el cálculo del porcentaje de células en apoptosis y en las fases G0-G1, S y G2-M del ciclo celular, mediante la detección de fluorescencia en el canal de la Ficoeritrina (PE-A, por sus siglas en inglés), correspondiente a la tinción con yoduro de propidio. La adquisición se realizó en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences), registrando 10.000 eventos por muestra. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (vX.0.7).

La Figura 5 muestra un esquema del flujo de trabajo llevado a cabo en esta sección.

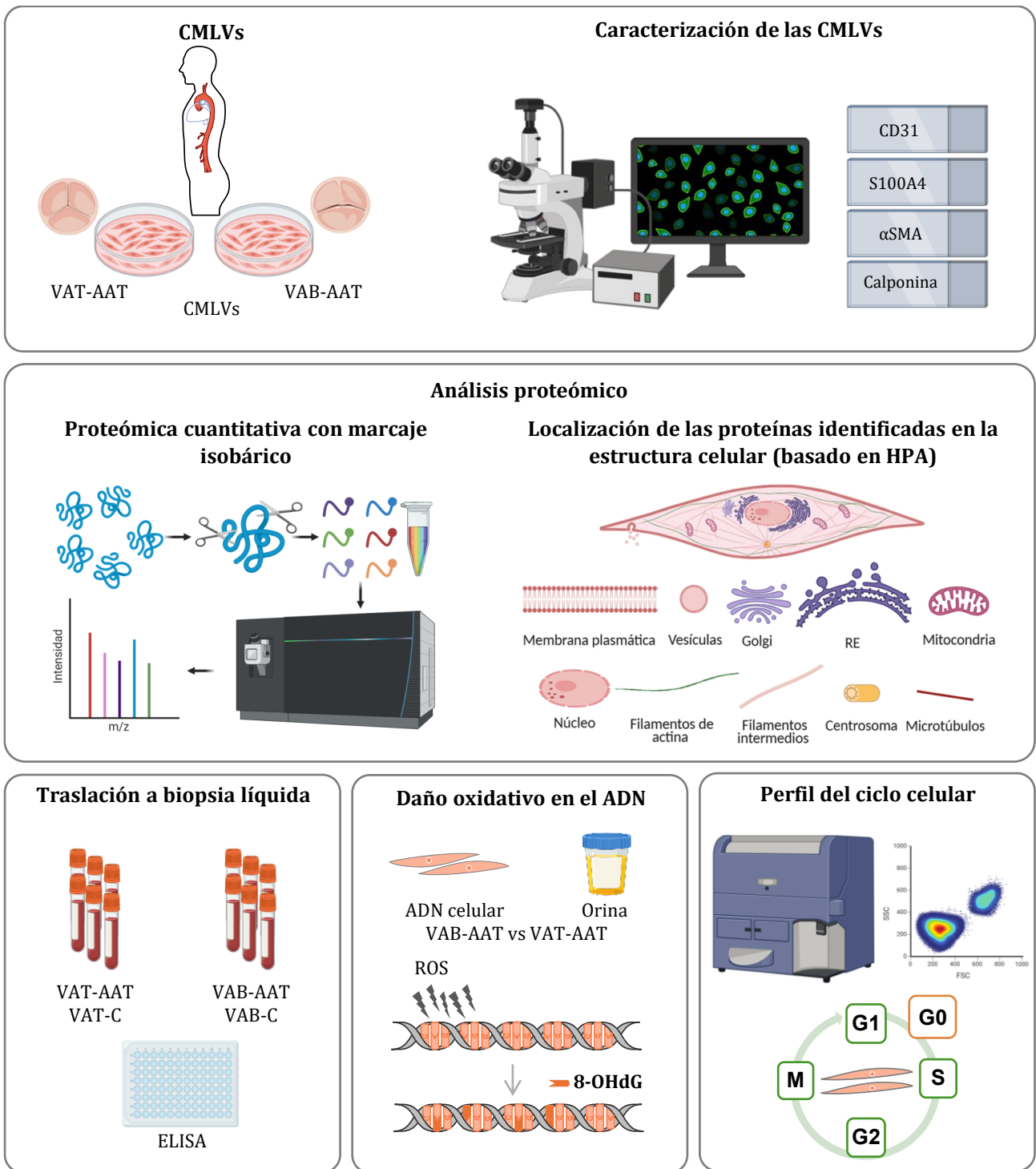


Figura 5. Análisis diferencial de las CMLVs de aorta en el AAT asociado a VAT y VAB y traslación a biopsia líquida. Creada parcialmente con BioRender.com.

3. Análisis de la funcionalidad mitocondrial en el AAT asociado a VAT y VAB

3.1. Enriquecimiento de mitocondrias de tejido aórtico

3.1.1. Obtención de fracciones mitocondriales enriquecidas

Las mitocondrias se aislaron de aortas de un total de 18 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 4), VAT-AAT (n = 4), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 5). El aislamiento se llevó a cabo a 4°C a partir de 10-100 mg de tejido aórtico congelado empleando un tampón con 300 mM sucrosa, 10 mM HEPES y 1 mM EGTA a pH 7,2-7,4 y utilizando el equipo de disociación gentleMACS (Miltenyi Biotec) con tubos C, específicos para aislar mitocondrias (Miltenyi Biotec). Para la disgregación del tejido, se empleó un ciclo del programa preestablecido para el aislamiento de mitocondrias. A continuación, se centrifugó a 200 g, 30 s a 4°C y se añadieron 4 mg/mL subtilisina A (Merck) durante 10 min a 4°C para romper las membranas celulares y liberar las mitocondrias. Tras centrifugar a 750 g durante 4 min a 4°C, se filtró el sobrenadante en filtros de 40 µm, se añadió BSA a 20 mg/mL y se filtró en filtros de 40 y 10 µm sucesivamente. Finalmente, se obtuvo la fracción no mitocondrial en el sobrenadante y un *pellet* con las mitocondrias tras dos centrifugaciones a 9.000 g durante 10 min a 4°C. Se procesaron inmediatamente de acuerdo con los análisis posteriores.

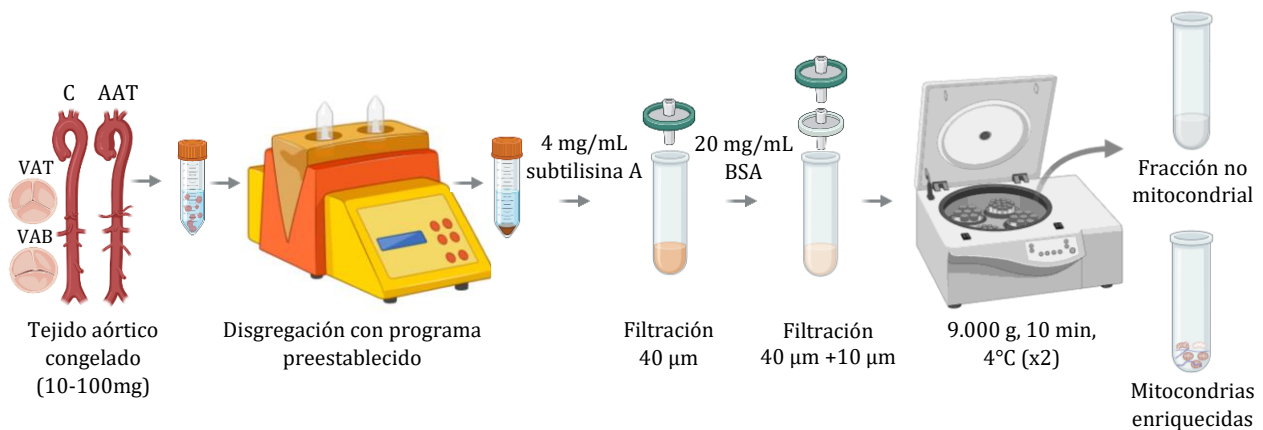


Figura 6. Aislamiento de mitocondrias a partir de tejido aórtico congelado. Creada con BioRender.com.

3.1.2. Evaluación de la pureza mitocondrial

3.1.2.1. Western blot

La evaluación del enriquecimiento de la fracción mitocondrial se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) empleando el equipo PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad). Los geles se realizaron a una concentración del 12%. Se cargaron 30 µL de las muestras (fracciones no mitocondriales y mitocondriales), las cuales se prepararon en condiciones reductoras con tampón de carga (glicerol al 20%, 4 g de SDS y 1,51 g de hidrócloruro de tris(hidroximetil)aminometano), azul de bromofenol y β-mercaptoetanol y se desnaturalizaron calentándolas durante 5 min a 95°C. Para determinar el peso molecular correspondiente a cada una de las bandas, se añadió un marcador comercial preteñido (Thermo Fisher Scientific).

Tras la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) mediante transferencia semi seca utilizando el sistema Trans-Blot Turbo Transfer (BioRad, Hercules, CA, USA). Al finalizar la transferencia, la membrana se tiñó con solución Ponceau

(Sigma) para la rápida visualización de las bandas de proteínas. Tras varios lavados, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en tampón PBS con Tween al 0,1% y 5% de leche o 3% de BSA según el anticuerpo primario empleado posteriormente (Tabla 3). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-Tween al 0,1% y la membrana se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente descrito en la Tabla 3. Los anticuerpos α -tubulina y vinculina se emplearon como marcadores citoplasmáticos, la laminina A/C como marcador nuclear y el citocromo C, la translocasa de la membrana mitocondrial externa 20 (TOMM20) y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) como marcadores de la fracción mitocondrial.

Tabla 3. Anticuerpos empleados para la evaluación del enriquecimiento mitocondrial.

Anticuerpo primario	Referencia (Casa comercial)	Dilución	Bloqueo	Anticuerpo secundario
Citocromo C	ab110325 (Abcam)	1:1000	5% leche	RAM
Laminina A/C	sc-376248 (Santa Cruz)	1:1000	3% BSA	RAM
TOMM20	ab56783 (Abcam)	1:100	3% BSA	RAM
α -Tubulina	ab7291 (Abcam)	1:1000	3% BSA	RAM
VDAC	ab15895 (Abcam)	1:1000	3% BSA	GAR
Vinculina	ab129002 (Abcam)	1:1000	5% leche	RAM

Después de lavar con PBS-Tween al 0,1%, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra específico frente a conejo (GAR, por sus siglas en inglés) conjugado con peroxidasa (Jackson Laboratory) o con un anticuerpo secundario de conejo específico frente a ratón (RAM, por sus siglas en inglés) conjugado con peroxidasa (Jackson Laboratory) según el anticuerpo primario empleado (Tabla 3). Ambos anticuerpos secundarios se diluyeron 1:5.000 en una solución de PBS-Tween al 0,05% con leche al 3%.

Para finalizar, la membrana se lavó de nuevo con PBS-Tween al 0,1% y las proteínas se detectaron utilizando el reactivo quimioluminiscente ECL Prime para Western blotting (Amersham Biosciences) en el equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

3.1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las mitocondrias purificadas se fijaron en paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences) y glutaraldehído al 2,5% (Sigma) en tampón fosfato (2,26% $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; pH 7,2-7,4; ajustando con 2,52% NaOH), seguido de una postfijación en tetróxido de osmio al 2% (Electron Microscopy Sciences) y ferrocianuro potásico acuoso al 3% (Sigma) en una proporción 1:1. Tras una deshidratación en serie de acetona: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y dos pasos al 100%, los tejidos se embebieron en la mezcla de baja viscosidad de Spurr (Electron Microscopy Sciences) y se polimerizaron a 70°C durante 48 h. Se montaron secciones ultrafinas de 60 nm en rejillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japón) a 80kV y las imágenes se adquirieron utilizando una cámara CCD Gatan Erlangshen ES 500W.

3.2. Proteómica cuantitativa con marcaje isobárico y espectrometría de masas no dirigida

El análisis proteómico mitocondrial se llevó a cabo en las mitocondrias aisladas de los 18 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 4), VAT-AAT (n = 4), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 5) de

la misma manera que se ha descrito anteriormente en el apartado 2.2 (de los apartados 2.2.1 a 2.2.6), pero en este caso empleando un reactivo TMT 18plex. Se compararon AAT vs C en cada tipo valvular. De manera particular, se realizó un estudio de las proteínas implicadas en los siguientes procesos mitocondriales: cadena respiratoria, biogénesis, estructura y metabolismo mitocondrial.

3.3. Caracterización morfológica de las mitocondrias

Se evaluó el número de mitocondrias, su tamaño, la cercanía al núcleo y el perfil de crestas mitocondriales en muestras de tejido aórtico de 18 pacientes (VAT-C: n = 4, VAT-AAT: n = 4, VAB-C: n = 5 y VAB-AAT: n = 5), comparando AAT vs. C en cada tipo valvular mediante microscopía electrónica de transmisión y empleando el mismo protocolo descrito anteriormente para las fracciones enriquecidas en el apartado 3.1.2.2. Se obtuvieron imágenes de cada paciente, se analizaron diez células con características ultraestructurales de CMLV mediante ImageJ (v1.5.2n) y se calcularon los valores medios para cada una de las variables descritas. La cercanía al núcleo se determinó como el ratio entre el número de mitocondrias en contacto con el núcleo con respecto al número total de mitocondrias en cada grupo. El perfil de crestas mitocondriales se calculó como el porcentaje de mitocondrias con 0-7 crestas o > 7 crestas con respecto al número total de mitocondrias en cada grupo correspondiente.

3.4. Número de copias de ADN mitocondrial

Para determinar el número de copias de ADNmt, se extrajo el ADN total de tejido aórtico de 16 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 4), VAT-AAT (n = 2), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 5) y se comparó AAT vs. C en cada tipo valvular. Los tejidos se pulverizaron mecánicamente en nitrógeno líquido y en cámara fría. Posteriormente, se utilizó el reactivo TRIzol (Life Technologies) y cloroformo para obtener una fase intermedia y apolar, de donde se purifica el ADN.

3.4.1. Extracción de ADN

Para la extracción y purificación del ADN, se recuperó la fase apolar y se añadió NaOH 8mM. Esta mezcla se dejó durante toda la noche a 4°C. A continuación, se añadió etanol al 100% y acetato de sodio 3 mM a pH 5,0. Tras centrifugar a 13.800 g durante 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 75%. Después de una nueva centrifugación a 13.800 g durante 5 min a 4°C, el ADN obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió finalmente en agua libre de nucleasas.

3.4.2. Cuantificación y pureza del material genético

La cuantificación del ADN se determinó mediante la medida de absorbancia a 260 nm con un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó su pureza mediante la relación A260/280, considerando un valor dentro del rango 1,8-2,0 ausencia de contaminación proteica. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

El análisis cuantitativo se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) a partir de 5 ng de ADN por muestra. Todas las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado con la mezcla maestra SYBR (TB Green Premix Ex Taq; TaKaRa) en un sistema de PCR 7500 Fast Real-Time (Applied Biosystems). El paso inicial de desnaturalización fue de 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 40 s y

72°C durante 40 s. Para evaluar la especificidad de las sondas, se realizó un análisis de la curva de fusión posterior a la amplificación para garantizar que cada reacción produjera un pico de temperatura de fusión único y distinto.

El número de copias de ADNmt se calculó a partir del valor de ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés) del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I, subunidad I (MT-COI) y del gen nuclear beta-2-microglobulina (B2M), a través de la siguiente fórmula:

$$2 \times 2^{\Delta Ct}$$

Siendo:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen de DNA nuclear}) - Ct (\text{gen mtDNA})$$

Los cebadores empleados se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores humanos específicos empleados para determinar el número de copias de ADN mitocondrial.

Gen	Forward	Reverse
<i>MT-COI</i>	CCACCTCTAGCCTAGCCGTTTA	GGGTCATGATGGCAGGAGTAAT
<i>B2M</i>	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA	CGGCAGGCATACTCATCTTTT

3.5. Potencial de membrana mitocondrial

El análisis del potencial de membrana mitocondrial se llevó a cabo en cultivos primarios de CMLVs procedentes de 17 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 2), VAT-AAT (n = 4), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 6). Se comparó AAT vs. C en cada tipo valvular utilizando el reactivo tetrametilrodamina etil éster perclorato (TRME) empleando el kit comercial ab113852 (Abcam) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se sembraron $1,5 \times 10^4$ CMLVs por pocillo en una placa negra en DMEM suplementado con 0,1 mg/mL heparina (Merck), 30 µg/mL factor de crecimiento de CEs (Merck), 1% P/E (Lonza), 1% L-glutamina (Lonza), 10% fungizona (Lonza) y 10% FBS e incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% CO₂. Al día siguiente, con una confluencia del 60-70%, se llevó a cabo el ensayo añadiendo 1000 nM de TRME y se incubó 1 h a 37°C. Finalmente, se determinó la medida de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 549 nm y de 575 nm de emisión. Los resultados se normalizaron por el número de células por pocillo contadas con una cámara de Neubauer (Hirschmann).

3.6. Generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno

La detección del superóxido mitocondrial se llevó a cabo utilizando 7×10^3 CMLVs por pocillo procedentes de 18 pacientes clasificados en VAT-C (n = 2), VAT-AAT (n = 4), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 7). Se comparó AAT vs. C en cada tipo valvular. Brevemente, las CMLVs fueron sembradas en medio DMEM suplementado con 0,1 mg/mL heparina (Merck), 30 µg/mL factor de crecimiento de CEs (Merck), 1% P/E (Lonza), 1% L-glutamina (Lonza), 10% fungizona (Lonza) y 20% FBS e incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% CO₂ durante 24 h. Cuando se encontraban en un 60-70% de confluencia, se realizó el ensayo empleando el kit comercial ab219943, siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se

normalizaron por el número de células por pocillo contadas con una cámara de Neubauer (Hirschmann).

3.7. Respiración mitocondrial

La capacidad respiratoria mitocondrial se evaluó en cultivos primarios de CMLVs procedentes de 18 pacientes clasificados en VAT-C (n = 2), VAT-AAT (n = 4), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 7) comparando los grupos AAT vs C en cada tipo valvular mediante el ensayo de estrés mitocondrial y el ensayo de glucólisis. La tasa de acidificación extracelular (ECAR, por sus siglas en inglés) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés) se midieron con el analizador Seahorse XFPro (Seahorse Biosciences) en quintuplicados de CMLVs de cultivos primarios procedentes de pacientes individuales. Se sembraron 1×10^4 células por pocillo con DMEM suplementado con 0,1 mg/mL heparina (Merck), 30 μ g/mL factor de crecimiento de CEs (Merck), 1% P/E (Lonza), 1% L-glutamina (Lonza), 10% fungizona (Lonza) y 10% FBS y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% CO₂ dos días antes del ensayo. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó el medio específico para la prueba Seahorse: medio DMEM Seahorse XF, pH 7,4 (Agilent Technologies), suplementado con 1 mM piruvato, 2 mM glutamina y 25 mM glucosa y se incubaron las células durante 1 h a 37°C sin CO₂. Se prepararon los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial correspondientes al kit Cell Mito-Stress (Agilent Technologies): 1,5 μ M oligomicina, 1,0 μ M carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, por sus siglas en inglés) y 0,5 μ M rotenona/antimicina A con 1 μ g/mL Hoechst (Invitrogen). Se midió la respiración basal de las células en las cuatro condiciones clínicas durante 20 min, momento en el que se añadió la oligomicina, inhibidor de la ATP-sintasa mitocondrial, para evaluar la producción del ATP de las células y la posible fuga de protones. Se realizaron medidas durante otros 20 min y se añadió el FCCP, desacoplador mitocondrial que colapsa el potencial de membrana de la mitocondria, con el objetivo de ver la capacidad máxima de respiración celular. Tras 20 min de mediciones, se añadió la mezcla de rotenona/antimicina A, que inhiben el complejo I y el III de la cadena respiratoria, respectivamente, con el fin de inhibir la respiración mitocondrial y evaluar así la respiración no mitocondrial de la célula. Se normalizaron las mediciones del Seahorse con respecto al número de células (1×10^3) cuantificadas en la plataforma CellInsight CX7 (Thermo Fisher Scientific) por medición de los núcleos celulares teñidos con el reactivo Hoechst. Se utilizó el software Seahorse Analytics (Agilent Technologies, 2025) para la normalización, análisis y exportación de los datos.

La Figura 7 muestra el flujo de trabajo llevado a cabo en esta sección.

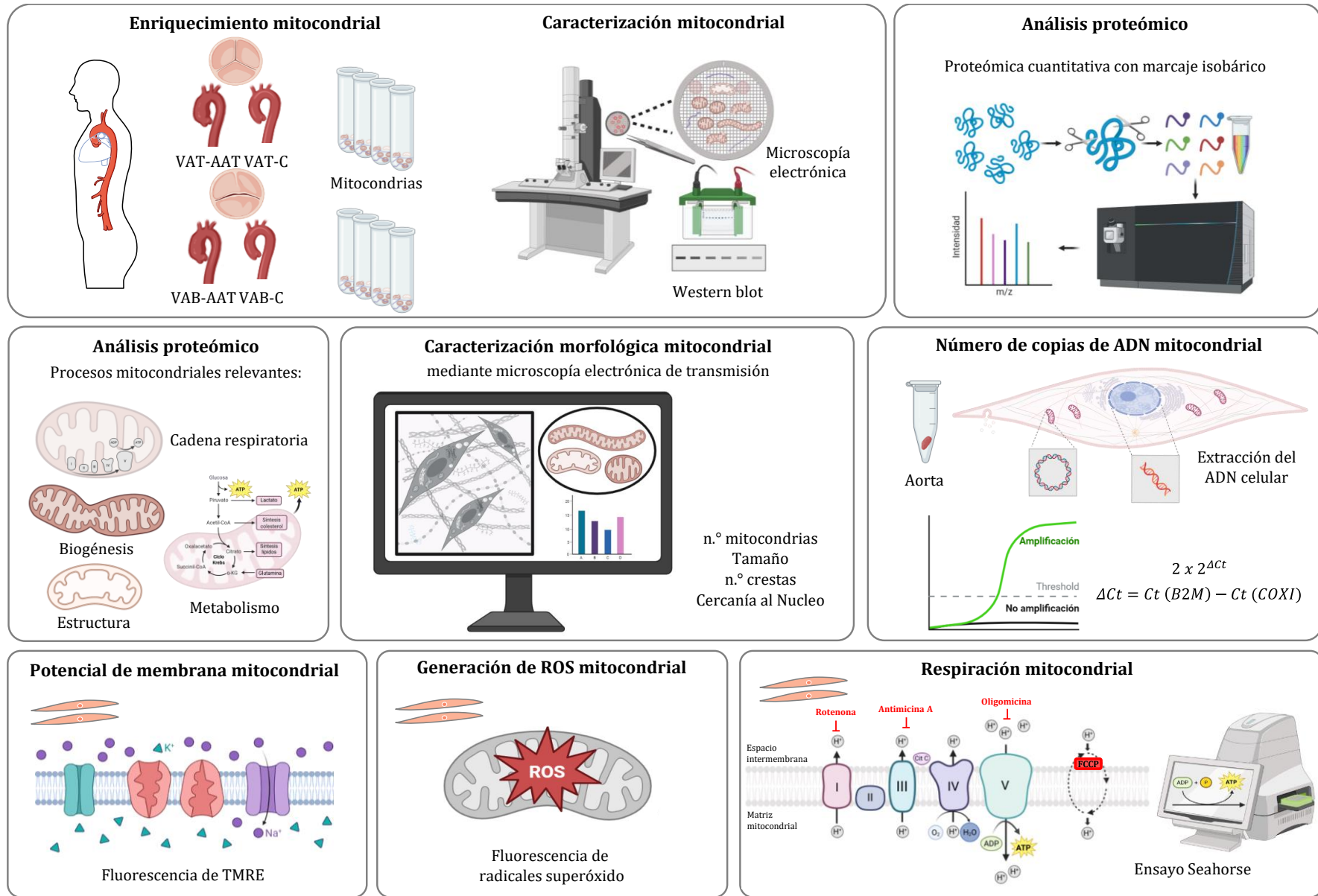


Figura 7. Análisis de la funcionalidad mitocondrial en el AAT asociado a VAT y VAB. Creada con BioRender.com.

4. Análisis del uso diferencial de la glucosa en el AAT asociado a VAT y VAB

4.1. Metabolómica cuantitativa no dirigida mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Los estudios de metabolómica no dirigida se llevaron a cabo en el plasma de 27 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 6), VAT-AAT (n = 6), VAB-C (n = 8) y VAB-AAT (n = 7) y se comparó el grupo AAT vs. C en cada tipo valvular.

4.1.2. Extracción de metabolitos

Los metabolitos del plasma humano se extrajeron mediante la desproteínización de 100 μ L de plasma con ACN en una proporción 1:8. Tras centrifugar a 15.200 g durante 15 min a 4°C, se recogió el sobrenadante y se llevó a sequedad en un evaporador GeneVac HT-8 (Savant). El residuo seco se reconstituyó en ACN:H₂O en una proporción 50:50 con ácido fórmico al 0,1%. Se añadieron warfarina (Merck), roxitromicina (Merck) y cafeína deuterada (Cayman Chemical) como patrones internos a 250 ng/mL.

4.1.3. Análisis por espectrometría de masas

Los metabolitos del plasma se analizaron utilizando un módulo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) del sistema LC Agilent 1290 (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas de TripleTOF 5600 (AB SCIEX). Para el análisis, se emplearon columnas de fase reversa e interacción hidrofílica en modos de ionización por electrospray positivo y negativo.

La cromatografía líquida en fase reversa (RPLC, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en el modo positivo (+) en una columna Atlantis T3 HPLC C18 (2,1 mm \times 150 mm, 3 μ m; Waters) mantenida a 25°C en un gradiente de ACN: 0-0,5 min de eluyente B al 1%; 0,5-11 min de eluyente B al 99%; 11-15,50 min de eluyente B al 99%; 15,50-15,60 min de eluyente B al 1% y 15,60-20 min de eluyente B al 1%. El eluyente A estaba compuesto por una mezcla de ACN:H₂O en una proporción 10:90 con 0,1% de ácido fórmico y el eluyente B era una mezcla de ACN:H₂O en una proporción 90:10 con 0,1% de ácido fórmico. En modo negativo (-), la cromatografía en fase reversa se realizó utilizando una columna Gemini HPLC C18 (100 mm \times 2 mm, 3 μ m; Phenomenex) mantenida a 25°C en un gradiente de ACN: 0-0,3 min de eluyente B al 0,1%; 0,3-7,3 min de eluyente B al 99%; 7,3-10,3 min de eluyente B al 99% y 10,3-13,3 min de eluyente B al 1%. El flujo se ajustó a 300 μ L/min y se inyectaron 3 μ L de plasma.

Complementariamente, para favorecer la identificación de metabolitos polares, se realizó también cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés) utilizando una columna de amida Waters Xbridge BEH (2,1 \times 150 mm, 2,5 μ m) en modo de ionización positiva y negativa. En ambos análisis se utilizó el mismo gradiente: 0-0,5 min de eluyente A al 0,1%; 0,5-7 min de eluyente A al 70%; 7-8 min de eluyente A al 70%; 8,00-8,10 min de eluyente A al 1% y 8,10-11 min de eluyente A al 1%. Los eluyentes A y B son los descritos en el párrafo anterior. El flujo se fijó en 350 μ L/min y se inyectaron 2 μ L de plasma.

En todos los casos, los datos se adquirieron en modo de masas (MS) en un rango de masas de 80-1.400 m/z seguido de la adquisición de espectros por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) a partir de los ocho iones parentales más intensos durante todo el recorrido cromatográfico. La calibración de masa exacta se realizó automáticamente cada 10 inyecciones. Las muestras blanco, constituidas por ACN:H₂O en una proporción 50:50 con ácido fórmico al 0,1%, se analizaron a lo largo de la secuencia cada 30 inyecciones. Las muestras de control de

calidad (QC, por sus siglas en inglés), compuestas por una mezcla de 5 μL de todas las muestras incluidas en el estudio, se analizaron cada 10 inyecciones.

4.1.4. Procesamiento de datos

El programa Peak View (v1.1.2; AB SCIEX) se utilizó para evaluar la variabilidad del tiempo de retención (RT, por sus siglas en inglés) y m/z entre las muestras, utilizando los picos de los estándares internos para determinar los rangos de alineamiento. La detección de picos, la alineación y el filtrado de datos se realizaron con el software Marker View (v1.2.1; AB SCIEX) teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Ventana RT: 0,10-0,12 min, umbral de ruido: 25-50 cps y tolerancia de masa: 12 ppm. Para la creación del conjunto de datos, sólo se tuvieron en cuenta los picos monoisotópicos para reducir la redundancia de masas y mejorar la selección de las características moleculares reales. El fondo y los contaminantes se eliminaron mediante un procedimiento de filtrado adicional teniendo en cuenta una tasa de cambio menor de 1,5 y un valor $p > 0,05$, obtenido mediante una prueba t , entre las muestras blanco y las muestras de estudio. Se descartaron las señales detectadas en las muestras QC con una variabilidad superior al 30% de desviación estándar relativa u observadas en menos del 50% de las muestras QC. El proceso analítico se evaluó mediante el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) de las muestras QC y mediante las elipses T2 de Hotelling en el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) para la identificación de valores atípicos.

Los datos de área de pico se normalizaron mediante los valores de los QC, se transformaron logarítmicamente y se escalaron en el programa MetaboAnalyst (v6.0). Se seleccionaron los m/z significativos en base a un valor $p \leq 0,05$ corregido por la tasa de FDR.

4.1.5. Identificación de metabolitos y confirmación por MS/MS

Se utilizó el software PeakView (v1.0 con el complemento Formula Finder v1.0, AB SCIEX) para asignar las fórmulas elementales de los candidatos seleccionados a partir de patrones precisos de masa, agrupación isotópica y fragmentación. Los m/z significativos se asignaron provisionalmente a identidades moleculares cotejando su masa con las bases de datos Human Metabolome Database (HMDB v5.0; hmdb.ca), Metlin (metlin.scripps.edu), Lipid Maps (lipidmaps.org) y PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), con una tolerancia de masa de 10 ppm y considerando $[M-H]^-$ y $[M+H]^+$ como aductos iónicos. No se tuvieron en cuenta los lípidos de cadena impar debido a su escasa presencia en humanos¹²⁴. Se utilizaron los espectros MS/MS cuando estaban disponibles para la identificación estructural exacta, comparando la fragmentación experimental con las bases de datos espectrales (HMDB; NIST2014: v2.2, Scientific Instrument Services). En el resto de los casos, la identificación de metabolitos se confirmó mediante análisis de MS/MS dirigido cuando fue posible.

4.2. Metabolómica cuantitativa dirigida mediante LC-MS/MS en modo de monitorización de reacción seleccionada (SRM)

La metabolómica dirigida se llevó a cabo en el plasma de 98 pacientes, clasificados en VAT-C ($n = 22$), VAT-AAT ($n = 12$), VAB-C ($n = 34$) y VAB-AAT ($n = 30$) y se compararon los grupos AAT vs. C en cada tipo valvular.

4.2.1. Extracción de metabolitos

Los metabolitos del plasma se extrajeron mediante la precipitación de las proteínas en metanol (MeOH) frío:H₂O en una proporción 1:1. Tras 30 min a 4°C, se centrifugaron las muestras a

15.800 g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron en ácido fórmico al 0,1% en H₂O en una proporción 1:3 y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm directamente en un vial de MS con inserto para su inyección.

4.2.2. Sintonización de estándares comerciales

A partir de los estándares comerciales disponibles en el mercado, se prepararon, de manera general, soluciones madre 1 mg/mL en MeOH:H₂O con 0,1% de ácido fórmico en una proporción 1:1. Particularmente, debido a las características de solubilidad propias de cada compuesto de interés, las soluciones madre de las carnitinas y el ácido lisofosfatídico (LPA) se prepararon en una mezcla de ACN:H₂O en una proporción 50:50, mientras que las lisofosfatidilcolinas (LPC) y lisofosfatidiletanolaminas (LPE) se prepararon en un disolvente constituido por cloroformo:MeOH:H₂O en una proporción 89:10:1. Antes de la infusión directa para optimizar las condiciones del espectrómetro de masas para cada metabolito, las soluciones madre de las carnitinas se diluyeron en H₂O con ácido fórmico al 0,1% y las soluciones madre de los lisofosfolípidos se diluyeron en una mezcla de etanol:H₂O en una proporción 50:50 con formiato de amonio 2 mM. La concentración final fue 1 µg/mL. La optimización de los diferentes lípidos se llevó a cabo por infusión directa utilizando una jeringa Hamilton de 1 mL con un flujo de 600 µL/min y el software MassHunter Optimizer (v4.0, Agilent Technologies).

4.2.3. Análisis por SRM-LC-MS/MS

Los estándares comerciales y las muestras de pacientes se analizaron empleando un espectrómetro de masas 6460 Triple Cuadrupolo acoplado a un cromatógrafo HPLC Serie 1200 (Agilent Technologies) en modo de monitorización de reacción seleccionada (SRM, por sus siglas en inglés) y controlado mediante el software Mass Hunter Qualitative Analysis (v4.0, Agilent Technologies). Se aplicó el modo de ionización por electrospray en modo positivo y negativo. La separación cromatográfica se realizó en una columna HPLC Atlantis T3 (2,1 mm × 100 mm, 3 µm; Waters) mantenida a 40°C. Las masas del precursor y del fragmento característico de cada metabolito (transición), así como sus condiciones de fragmentación, se recogen en la Tabla 5.

Para los metabolitos analizados en modo de ionización positiva, se empleó el siguiente gradiente de ACN: 0-0,4 min con 1% de fase B; 0,4-7,30 min con 99% de fase B; 7,30-10,30 min con 99% de fase B; 10,30-13,30 min con 1% de fase B y 13,30-16,0 min con 1% de fase B. El eluyente A consistía en una mezcla de ACN:H₂O en una proporción 10:90 y el eluyente B de una mezcla de ACN:H₂O en una proporción 90:10. Ambos disolventes contenían 0,1% de formiato de amonio al 20%. Para el LPA, analizado en modo de ionización negativa, se utilizó un gradiente isocrático de MeOH:H₂O en una proporción 99,5:0,5 durante 6 min.

En ambos modos, el flujo se fijó en 400 µL/min y se utilizaron volúmenes de inyección de 10 µL. El análisis cuantitativo se realizó interpolando las áreas de los picos en curvas de calibración generadas utilizando los estándares comerciales.

Tabla 5. Condiciones de análisis mediante LC-MS/MS en modo de monitorización de reacción seleccionada (SRM-LC-MS/MS) basada en estándares comerciales.

Metabolito	Estándar de referencia (casa comercial)	Masa precursora (m/z)	Masa fragmento (m/z)	Energía de colisión (V)	Potencial fragmentador (V)	Dwell time (ms)	Ionización
Acetilcarnitina (CAR 2:0)	16948 (Cayman Chemical)	204,2	85	22	100	20	+
Glutarilcarnitina (CAR 5:1)	870868P (Merck)	276,3	85	22	90	20	+
Miristoilcarnitina (CAR 14:0)	26559 (Cayman Chemical)	372,6	85	26	132	20	+
Propionilcarnitina (CAR 3:0)	42602 (Merck)	218,3	85	18	60	20	+
LPA 18:1	857130P (Merck)	435,5	79	30	156	20	-
LPC 15:0	855576P (Merck)	482,6	183,8	22	110	20	+
LPC 16:0	855675C (Merck)	496,6	104	18	156	20	+
LPC 18:1	845875P (Merck)	522,7	104	26	60	20	+
LPE 18:0	856715P (Merck)	482,6	44,2	26	156	20	+

4.3. Análisis de la expresión génica

Para analizar la expresión génica de las enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno, como son la fosforilasa del glucógeno muscular (PYGM), la UDP-glucosa pirofosforilasa 2 (UGP2) y la glucógeno sintasa 1 (GYS1), y de la ruta biosintética de las hexosaminas (HBP, por sus siglas en inglés): la glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa 2 (GFPT2) y la UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1 (UAP1), se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) total de tejido aórtico procedente de 23 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 4), VAT-AAT (n = 9), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 5), y se compararon los grupos AAT vs. C en cada tipo valvular. Para ello, los tejidos se pulverizaron mecánicamente en nitrógeno líquido y en cámara fría.

4.3.1. Extracción de ARN

Al tejido pulverizado se le añadió el reactivo TRIzol (Life Technologies) y cloroformo, obteniendo el ARN en la fase acuosa. Para su extracción, se recogió la fase acuosa y se le añadió isopropanol frío. Esta mezcla se mantuvo a 4°C durante 5 min y, posteriormente, se dejó a -20°C durante toda la noche. Tras una centrifugación a 13.800 g durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el ARN con etanol al 70% y al 100% y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió en agua libre de nucleasas.

4.3.2. Cuantificación y pureza del material genético

La cuantificación del ARN se determinó mediante la medida de absorbancia a 260 nm con un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó su pureza mediante la relación A260/280, considerando un valor en el rango 1,8-2 ausencia de contaminación proteica. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

4.3.3. Retrotranscripción: síntesis de ADN complementario

La transcripción inversa del ARN a ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo empleando 1 µg de ARN y utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) en un termociclador PTC-100 (MJ Research), donde se inició la reacción a 25°C durante 10 min. A continuación, se elevó la temperatura a 37°C durante 2 h y, por último, se mantuvo a 85°C durante 5 min. La actividad enzimática se paró por bajada de la temperatura a 4°C. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

4.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

El análisis cuantitativo se realizó mediante qPCR a partir de 2 µg de ADNc por muestra. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo empleando las mismas condiciones descritas anteriormente para la determinación del número de copias de ADNmt (apartado 3.4.3). El ARNm de las muestras se estimó utilizando el método de cuantificación relativa 2- Δ Ct con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de normalización.

Todos los cebadores empleados para el análisis de la expresión génica de las enzimas del metabolismo de la glucosa se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores humanos específicos para las reacciones de qPCR de las enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno y de HBP.

Gen	Forward	Reverse
<i>UAP1</i>	AATGACCTCAAACCTCACGTTGT	GCTCTGCATAAAGTTCTACCTGT
<i>GFPT2</i>	ATGTGCGGAATCTTGCCTAC	ATCGAGAGCCTTGACTTTCCC
<i>UGP2</i>	ATGTCTCAAGATGGTGCTTCTCA	GGTGTGCTCAAATTCATGTGATG
<i>GYS1</i>	GCGCTCACGTCTTCACTACTG	TCCAGATGCCCATAAAAATGGC
<i>PYGM</i>	CAATGTGCGGTGGCTACATCCA	TATCTGGGAAGGCATCGAAGT
<i>GAPDH</i>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

4.4. Actividad enzimática

La actividad enzimática de las enzimas implicadas en la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés) recogidas en la Tabla 7 se midió en biopsias aórticas procedentes de un total de 21 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 4), VAT-AAT (n = 7), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 5) y se comparó el grupo AAT vs. C en cada tipo valvular. Para ello, los tejidos fueron mecánicamente pulverizados en nitrógeno líquido en cámara fría y se siguieron las recomendaciones de los fabricantes. Para las enzimas de la glucólisis, se emplearon: 8 mg de tejido para la hexoquinasa (HK), 25 mg para la 6-fosfofructoquinasa (PFK), 5 mg para la piruvato quinasa (PK) y 10 mg para la lactato deshidrogenasa (LDH). Para la enzima perteneciente a la ruta PPP: la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), se utilizaron 10 mg de tejido.

Tabla 7. Ensayos de actividad enzimática de las enzimas del metabolismo de la glucólisis y la ruta PPP.

Enzima	Referencia (Casa comercial)
HK	Hexokinase Activity Assay Kit (Colorimetric) ab136957 (Abcam)
PFK	6-Phosphofructokinase Activity Assay Kit (Colorimetric) ab155898 (Abcam)
PK	Pyruvate Kinase Assay Kit ab83432 (Abcam)
LDH	LDH Assay Kit / Lactate Dehydrogenase Assay Kit (Colorimetric) ab102526 (Abcam)
G6PD	Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase Assay Kit (Colorimetric) ab102529 (Abcam)

4.5. Cuantificación subcelular de glucógeno

La cuantificación de glucógeno se realizó en tejidos aórticos (1-2 mm) de 18 pacientes, clasificados en VAT-C (n = 4), VAT-AAT (n = 4), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 5), comparando AAT y C en cada tipo valvular, mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, se llevó a cabo el mismo protocolo descrito anteriormente en el apartado 3.1.2.2. De cada paciente, se analizaron cinco células que presentaban características ultraestructurales de CMLV mediante ImageJ (v1.5.2n). Se cuantificó la cantidad de glucógeno (%) en cada célula y se normalizó con respecto al área citoplasmática.

4.6. Ensayos de productos finales de reacción: Lactato y NADP⁺/NADPH

La concentración de lactato y NADP⁺/NADPH se determinó empleando biopsias aórticas mecánicamente pulverizadas en nitrógeno líquido y cámara fría procedentes de un total de 21 pacientes (VAT-C: n = 4, VAT-AAT: n = 7, VAB-C: n = 5 y VAB-AAT: n = 5) y de 19 pacientes (VAT-C: n = 4, VAT-AAT: n = 6, VAB-C: n = 5 y VAB-AAT: n = 4), respectivamente, comparando AAT vs. C en cada tipo de válvula. El producto glucolítico final L-lactato se midió en 10 mg de biopsias aórticas mediante el kit comercial ab65330 (Abcam), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la determinación de NADP⁺ y NADPH, se utilizaron 5 mg de las biopsias aórticas y el kit comercial ab65349, siguiendo, de igual manera, las instrucciones del fabricante.

4.7. Histología de tejidos mediante tinción con Alcian Blue

El contenido de GAGs de los tejidos aórticos se evaluó en 18 pacientes clasificados en VAT-C (n = 4), VAT-AAT (n = 4), VAB-C (n = 5) y VAB-AAT (n = 5), comparando AAT y C en cada tipo valvular, mediante la tinción Alcian Blue con rojo nuclear.

Esta tinción se llevó a cabo en secciones de tejido de 8 μm incluidos en parafina. Tras desparafinar en estufa a 65°C durante 40 min y en xilol durante 4 min, se hidrataron los cortes tisulares con pases sucesivos de 1 min de etanol 100%, etanol 96%, etanol 70% y H₂O destilada y se trataron con ácido acético al 3% durante 3 min. A continuación, se tiñeron con el reactivo Alcian's Blue al 1% (Sigma) durante 15 min y, posteriormente, se lavaron con H₂O destilada durante 15 min. Para realizar el contraste nuclear, se utilizó el rojo nuclear (Bio-Optica) durante 6 min. A continuación, se retiró el exceso de color con flujo continuo de agua corriente. Tras llevar a cabo un lavado en H₂O destilada, se deshidrataron las muestras con pases sucesivos de 1 min en etanol 70%, etanol 96% y etanol 100% y 4 min en xilol. Finalmente, se montaron con resina acrílica con base de xileno (DPX, por sus siglas en inglés; Merck).

Los GAGs se cuantificaron en la capa media de la aorta utilizando diez imágenes capturadas con un aumento de 20x empleando ImageJ (v1.5.2n, con el paquete FIJI) a partir de portaobjetos digitalizados, utilizando al menos dos cortes por cada paciente, y se calcularon los valores medios.

El flujo de trabajo llevado a cabo en esta sección se recoge en la Figura 8.

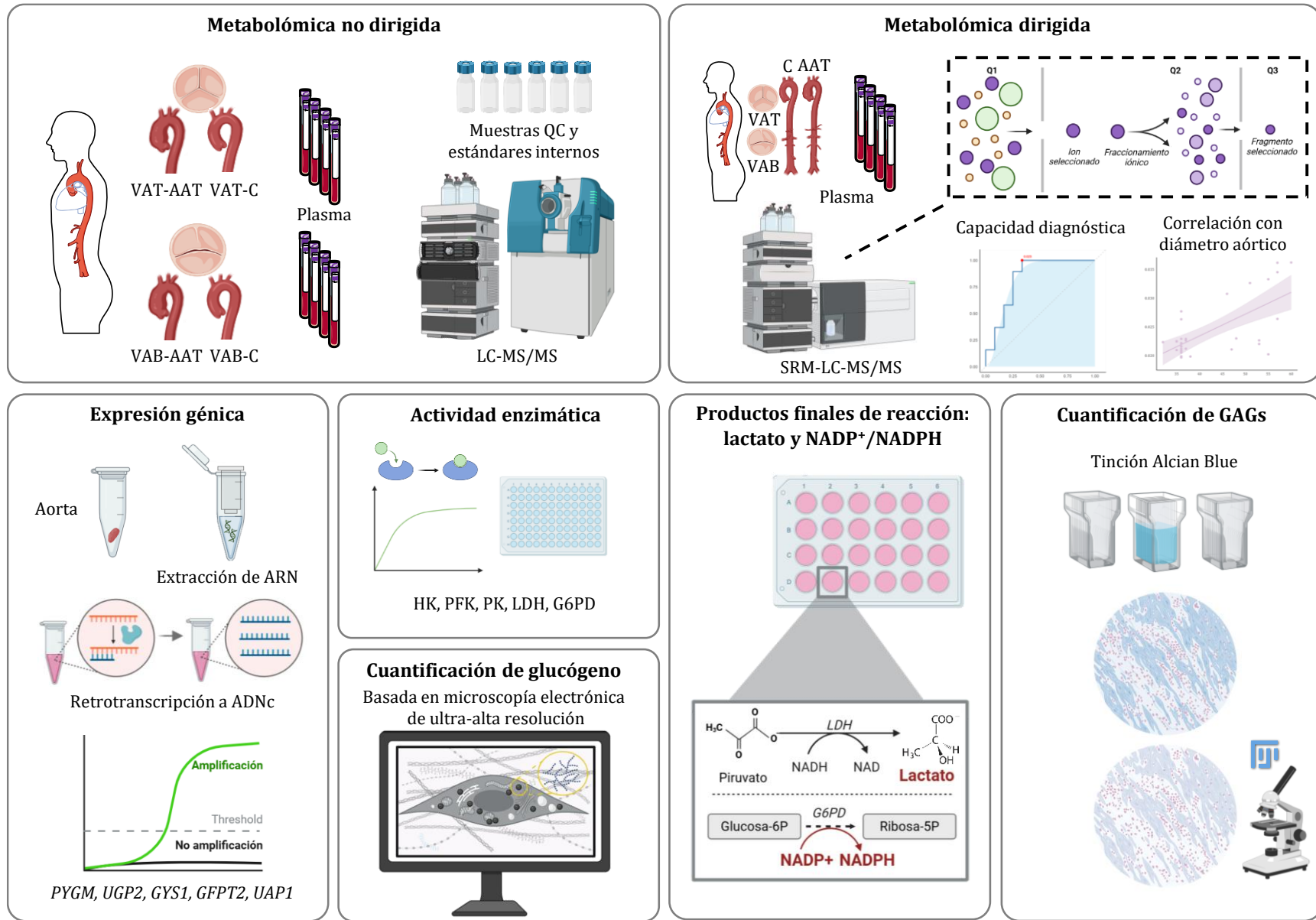


Figura 8. Análisis del uso diferencial de la glucosa en el AAT asociado a VAT y VAB. Creada con BioRender.com.

5. Análisis estadísticos

Excepto para el análisis proteómico y metabolómico no dirigidos, cuyo análisis estadístico se describe en sus apartados correspondientes (apartados 2.2 y 4.1, respectivamente), las comparaciones de grupos clínicos se realizaron con GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) y R (RStudio Software, v2022.02.0+443). Las variables continuas se describieron como media \pm desviación estándar y las variables categóricas se presentan como número total y porcentaje. La normalidad se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk y las comparaciones entre dos grupos se analizaron con una prueba t o con la prueba de Mann-Whitney, según procediera. Se aplicó el método de regresión robusta y eliminación de valores atípicos (ROUT, por sus siglas en inglés) y se evaluaron las posibles variables confusoras, incluidas las características clínicas y la medicación de los pacientes. Cuando fue necesario, se ajustaron los resultados con estas variables mediante la construcción de modelos de regresión multivariable. La significación se definió como $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ y $****p \leq 0,0001$. Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La capacidad de los marcadores plasmáticos para discriminar ambas formas de AAT en función del tipo valvular se evaluó mediante el análisis de la curva operativa del receptor (ROC, por sus siglas en inglés) y el cálculo del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés). Además, la correlación entre la concentración de estos marcadores y el diámetro aórtico se evaluó mediante el coeficiente de correlación de rangos de Spearman, considerando una correlación significativa cuando el valor $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

A) ANÁLISIS DIFERENCIAL DE LAS CMLVs DE AORTA EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB Y TRASLACIÓN A BIOPSIA LÍQUIDA

Se investigaron los proteomas de las CMLVs de pacientes con AAT asociado a VAT y VAB con el objetivo de identificar los paneles proteicos y los procesos biológicos diferenciales en el desarrollo del AAT en función del tipo valvular, empleando espectrometría de masas no dirigida. Las características demográficas y de comorbilidad de la cohorte clínica empleada se presentan en la Tabla 8 (CMLVs; MS no dirigida), sin mostrar diferencias significativas entre los grupos comparados.

Las CMLVs obtenidas de las aortas de estos pacientes y empleadas en este estudio se caracterizaron por inmunofluorescencia, tal y como se muestra en la Figura 9.

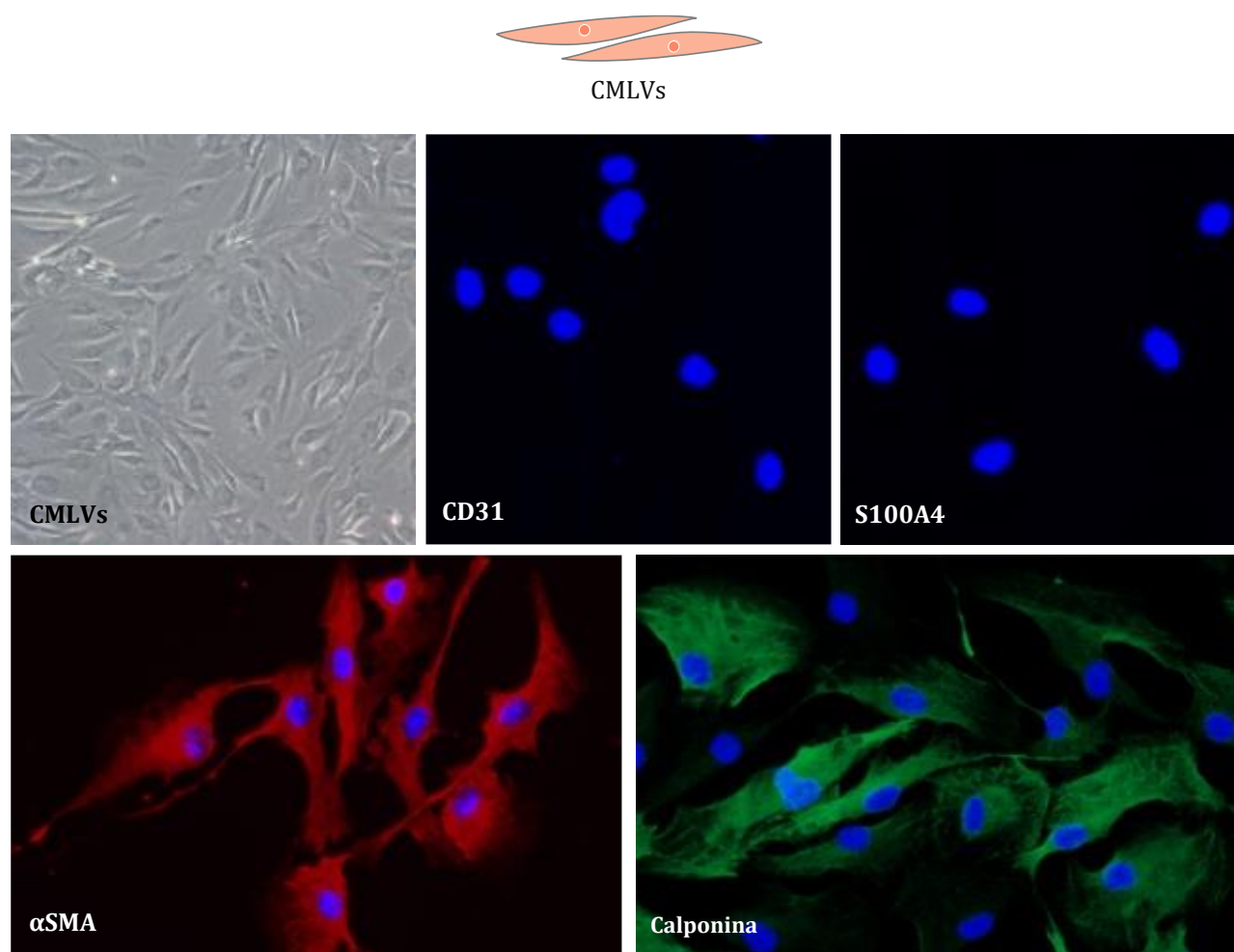


Figura 9. Cultivos primarios de CMLVs. Caracterización mediante inmunofluorescencia con α SMA (rojo) y calponina (verde). No se observa marcaje de CD31 para células endoteliales ni de S100A4 para fibroblastos.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes de las cohortes de CMLVs, orina y plasma en los diferentes análisis.

EVALUACIÓN CELULAR en CMLVs									
Característica clínica	MS no dirigida			Daño oxidativo del ADN			Perfil del ciclo celular		
	VAT-AAT (n = 4)	VAB-AAT (n = 5)	VAB-AAT vs. VAT-AAT	VAT-AAT (n = 4)	VAB-AAT (n=5)	VAB-AAT vs. VAT-AAT	VAT-AAT (n = 5)	VAB-AAT (n = 8)	VAB-AAT vs. VAT-AAT
Edad (años)	65 ± 11	65 ± 6	0,9603	63 ± 18	57 ± 18	0,7143	68 ± 7	56 ± 13	0,0249
Sexo masculino	3(75)	3(60)	> 0,9999	3(75)	3(60)	> 0,9999	3(60)	5(62)	> 0,9999
Diabetes	1(25)	1(20)	> 0,9999	1(25)	0(0)	0,4444	1(20)	0(0)	0,3846
HTA	3(75)	3(60)	> 0,9999	3(75)	3(60)	> 0,9999	4(80)	1(12)	0,0319
DSL	2(50)	1(20)	0,5238	1(25)	2(40)	> 0,9999	1(20)	2(25)	> 0,9999
Tabaco	0(0)	0(0)	> 0,9999	0(0)	1(20)	> 0,9999	0(0)	4(50)	0,1939
FEVI	0(0)	0(0)	> 0,9999	0(0)	1(20)	> 0,9999	1(20)	0(0)	0,3846
Diámetro aórtico (mm)	51 ± 2	53 ± 2	0,2063	48 ± 5	54 ± 9	0,4444	56 ± 3	48 ± 3	0,0007
EA	2(50)	3(60)	> 0,9999	3(75)	3(60)	> 0,9999	1(20)	6(75)	0,1026
IA	2(50)	0(0)	0,1667	1(25)	1(20)	> 0,9999	5(100)	3(37)	0,0808

MEDIDAS EN BIOPSIA LÍQUIDA										
Característica clínica	Daño oxidativo del ADN (orina)			Traslación (plasma)						
	VAT-AAT (n = 13)	VAB-AAT (n = 30)	VAB-AAT vs. VAT-AAT	VAT-C (n = 18)	VAT-AAT (n = 12)	VAB-C (n = 29)	VAB-AAT (n = 28)	VAT-AAT vs. VAT-C	VAB-AAT vs. VAB-C	VAB-AAT vs. VAT-AAT
Edad (años)	65 ± 12	60 ± 13	0,2043	69 ± 12	66 ± 13	63 ± 10	60 ± 12	0,2522	0,3265	0,1166
Sexo masculino	10(77)	19(63)	0,491	14(78)	9(75)	17(59)	17(61)	> 0,9999	> 0,9999	0,4844
Diabetes	3(23)	3(10)	0,3455	6(33)	3(25)	4(14)	3(11)	0,7036	> 0,9999	0,3407
HTA	11(85)	16(53)	0,0855	14(78)	10(83)	18(62)	15(54)	> 0,9999	0,5964	0,1523
DSL	6(46)	11(37)	0,7357	11(61)	6(50)	16(55)	10(36)	0,7106	0,1864	0,4898
Tabaco	3(23)	8(27)	> 0,9999	2(11)	3(25)	7(24)	8(29)	0,6221	0,7655	> 0,9999
FEVI	2(15)	4(13)	> 0,9999	1(6)	2(17)	5(17)	4(14)	0,5478	> 0,9999	> 0,9999
Diámetro aórtico (mm)	55 ± 7	51 ± 5	0,0189	36 ± 2	54 ± 7	38 ± 6	51 ± 5	< 0,0001	< 0,0001	0,0734
EA	2(15)	21(70)	0,0020	12(67)	2(17)	28(97)	20(71)	0,0106	0,0119	0,0021
IA	9(69)	9(30)	0,0225	5(28)	8(67)	6(21)	8(29)	0,061	0,5497	0,0367

Los valores se expresan como número en % para las variables categóricas y media ± desviación estándar para las variables continuas. Los valores p (comparaciones VAT-AAT vs. VAT-C, VAB-AAT vs. VAB-C y VAB-AAT vs. VAT-AAT) se estimaron mediante una prueba no paramétrica (Mann-Whitney). MS: espectrometría de masas, CMLVs: células musculares lisas vasculares, ADN: ácido desoxirribonucleico, VAT: válvula aórtica tricúspide, VAB: válvula aórtica bicúspide, AAT: aneurisma de aorta torácica, HTA: hipertensión, DSL: dislipidemia, FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda, EA: estenosis aórtica, IA: insuficiencia aórtica.

1. Las CMLVs presentan un fenotipo diferencial en el AAT asociado a VAB

El análisis del proteoma celular completo identificó más de 8.000 proteínas (Tabla S1). Entre ellas, se evaluaron aquellas proteínas asociadas con los diferentes fenotipos de CMLVs: contráctil, proliferativo y de estrés¹²⁵ (Figura 10). En este estudio, principalmente identificamos proteínas relacionadas con el estrés con una abundancia diferencial en pacientes con AAT y VAB frente a aquellos con AAT asociado a VAT (Figura 10C, Tabla S2).

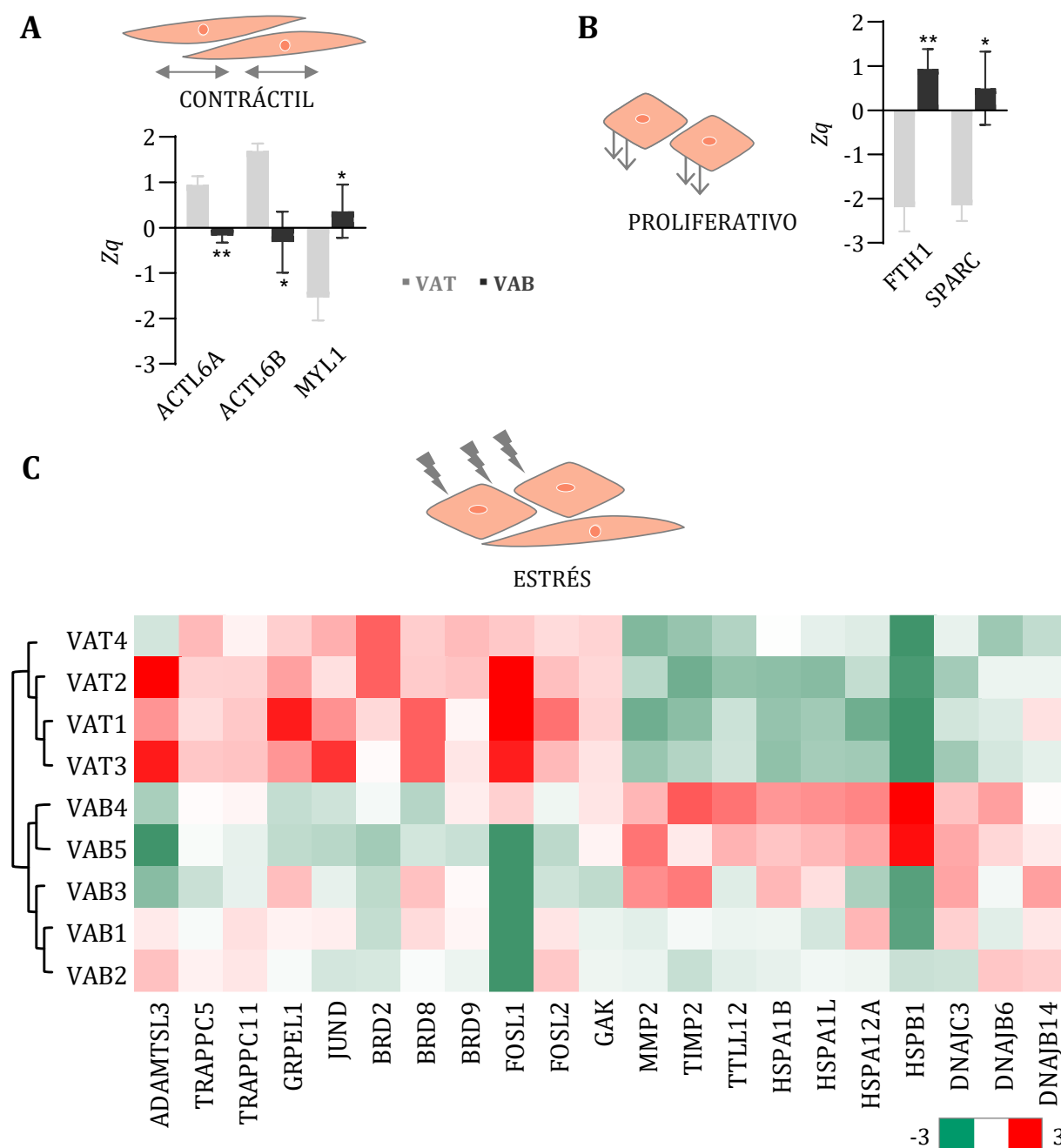


Figura 10. Las CMLVs de AAT asociado a VAB muestran un fenotipo de estrés. A. Fenotipo contráctil y proteínas diferenciales representativas en las CMLVs de AAT asociado a VAT y VAB. B. Fenotipo proliferativo y proteínas diferenciales representativas en las CMLVs de AAT asociado a VAT y VAB. C. Fenotipo de estrés. Mapa de calor de las 21 proteínas diferenciales relacionadas con el estrés, que evidencian un fenotipo estresado en pacientes AAT con VAB. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$. Mapa térmico de proteínas: valor $p \leq 0,05$. Escala de colores: $\Delta Zq = -3$ (verde), pasando por 0 (blanco), hasta $+3$ (rojo).

En detalle, para los pacientes VAB-AAT en comparación con los pacientes VAT-AAT, se encontraron niveles más bajos de la proteína 3 similar a ADAMTS (ADAMTSL3), las subunidades 5 y 11 del complejo de proteínas de tráfico de partículas (TRAPPC5 y TRAPPC11), el homólogo de la proteína GrpE 1, mitocondrial (GRPEL1), el factor de transcripción jun-D (JUND), las proteínas con bromodominio 2, 8 y 9 (BRD2, BRD8 y BRD9), los antígenos 1 y 2 relacionados con Fos (FOSL1 y FOSL2) y la quinasa asociada a ciclina G (GAK). Por el contrario, se encontraron niveles más altos de la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2) y su inhibidor (TIMP2), la proteína similar a la tubulina tirosina ligasa 12 (TLL12), las proteínas de choque térmico de 70 kDa 1B, 1 similar y 12A (HSPA1B, HSPA1L, HSPA12A) y de choque térmico beta-1 (HSPB1), el miembro 3 de la subfamilia C homóloga a DnaJ (DNAJC3) y los miembros 6 y 14 de la subfamilia B homóloga a DnaJ (DNAJB6 y DNAJB14).

Estos cambios, junto con las funciones conocidas de las proteínas, sugieren un fenotipo estresado de las CMLVs en el caso del AAT asociado a VAB. Este estrés está asociado con cambios en la matriz extracelular, el plegamiento y la agregación de proteínas, así como con la muerte celular.

2. La maquinaria del ADN muestra alteraciones en el AAT asociado a VAB

El análisis de las proteínas más significativamente alteradas en el proteoma de las CMLVs reveló un panel de 52 proteínas relacionadas principalmente con la maquinaria de replicación y reparación del ADN (16 con abundancia elevada y 36 con abundancia reducida) (Figura 11, Tabla S3).

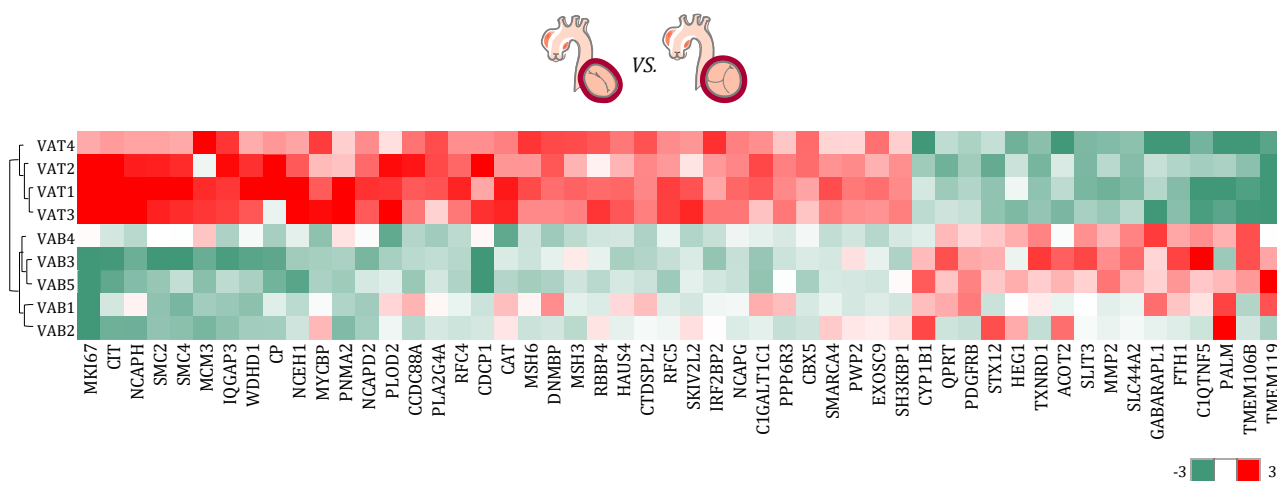


Figura 11. Las CMLVs de pacientes AAT con VAB muestran una desregulación en la replicación del ADN y en la maquinaria de reparación. Mapa de calor de las 52 proteínas más significativamente alteradas en el proteoma de las CMLVs de pacientes AAT con VAT y VAB (≥ 3 péptidos identificados, tasa de cambio $-2 \geq \Delta Zq \geq 2$ y valor $p \leq 0.01$), que apuntan a una alteración en la maquinaria del ADN. Escala de colores: $\Delta Zq = -3$ (verde), 0 (blanco), $+3$ (rojo).

El panel incluye proteínas de reparación de desajustes del ADN (MMR, por sus siglas en inglés) Msh3 y Msh6 (MSH3 y MSH6), las subunidades 4 y 5 del factor de replicación C (RFC4 y RFC5), el factor de licencia de replicación del ADN MCM3 (MCM3) y varios componentes del complejo condensina I: proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas 2 y 4 (SMC2 y SMC4) y subunidades 1, 2 y 3 del complejo condensina (NCAPD2, NCAPH y NCAPG). Además, también

encontramos alteradas significativamente otras proteínas relacionadas con estas, como fueron MSH2, el homólogo 1 de la proteína PMS1 (PMS1), la polimerasa δ y RFC1, RFC2 y RFC3 (Tabla S1). Esto, en conjunto, apunta a la activación de la respuesta al daño del ADN en las CMLVs de los pacientes con AAT y VAB¹²⁶.

La reparación del daño en el ADN a gran escala requiere la coordinación entre la detención del ciclo celular y la activación del sistema de reparación del daño a través de un proceso en el que intervienen las quinasas serina/treonina ATR y ATM (ATR y ATM)¹²⁷. El contenido de ATM no difirió en las CMLVs de los pacientes con AAT y VAB respecto a aquellos con AAT y VAT, pero se observó una disminución significativa de ATR, una proteína que garantiza la fidelidad de la replicación del ADN durante la fase S. También observamos una disminución generalizada de las histonas en los pacientes VAB-AAT, siendo HIST1H2BM, HIST3H3, HIST1H2AD e HIST2H3A las que mostraron las mayores diferencias. De la misma forma, detectamos una disminución en la abundancia de la subunidad 1 del complejo promotor de la anafase (ANAPC1) y de p53 y la proteína 1 regulada por el daño al ADN (PDRG1), ambas implicadas en la progresión del ciclo celular (Tabla S1). Todas estas alteraciones confirmaron un daño en el ADN y alteraciones en el ciclo celular en los pacientes con AAT asociado a VAB.

A continuación, se evaluaron las respuestas proteicas coordinadas para identificar los procesos biológicos alterados más allá de cambios proteicos individuales, los cuales apuntaron nuevamente a la activación de la maquinaria del ADN en las CMLVs de pacientes VAB-AAT, acompañada de un aumento en la señalización mediada por proteínas G (Figura 12 y Tabla S4).

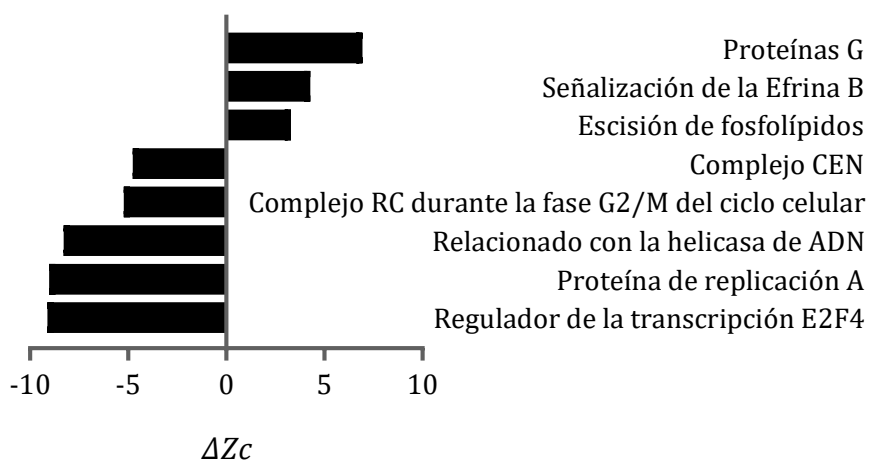


Figura 12. La maquinaria de replicación del ADN y la señalización mediante proteínas G está alterada en VAB-AAT. Representación de los ocho principales procesos biológicos alterados en VAB-AAT vs. VAT-AAT seleccionados por $-3,0 \geq \Delta Zc \geq 3,0$, un comportamiento intragrupo homogéneo y un valor $p \leq 0,001$.

Las proteínas implicadas en estos procesos se investigaron más a fondo y se agruparon en familias. Se observaron niveles disminuidos de proteínas relacionadas con el ADN y la progresión del ciclo celular, que coincidían con las proteínas de mayor cambio, pertenecientes a las siguientes familias de proteínas: MCM (mantenimiento de minicromosomas), CHD (cromodominio helicasa de unión al ADN), DPO (ADN polimerasa), ORC (complejo de reconocimiento del origen) y RFC (factor de replicación C) (Figura 13).

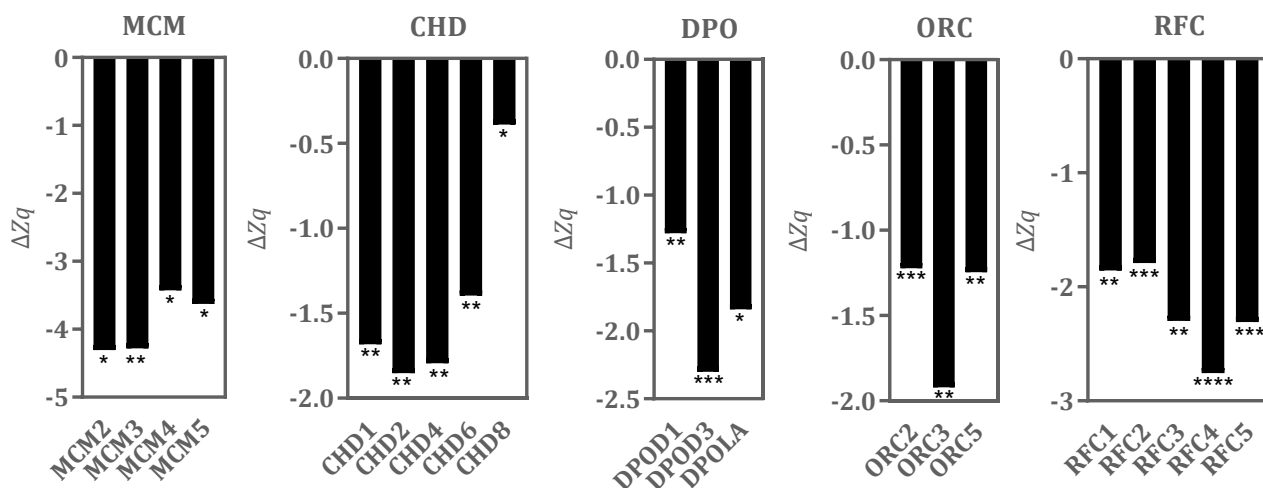


Figura 13. Las proteínas de los procesos alterados se relacionan con el ADN. Proteínas con niveles más bajos en pacientes con AAT y VAB de las familias de proteínas asociadas a los cambios coordinados (procesos biológicos) más representativas en VAB-AAT vs. VAT-AAT relacionadas con el ADN. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$; *** valor $p \leq 0,001$; **** valor $p \leq 0,0001$.

Con tendencia contraria, numerosas proteínas G mostraron un aumento significativo de su abundancia, incluidas las proteínas de la superfamilia Ras, implicadas en señalización intracelular que controla proliferación, diferenciación, migración, organización del citoesqueleto y supervivencia celular, y las proteínas G heterodiméricas, que transducen señales desde receptores acoplados a proteína G y regulan procesos como contracción del músculo liso, actividad de canales iónicos, liberación de segundos mensajeros y respuestas vasomotoras/inflamatorias (Figura 14).

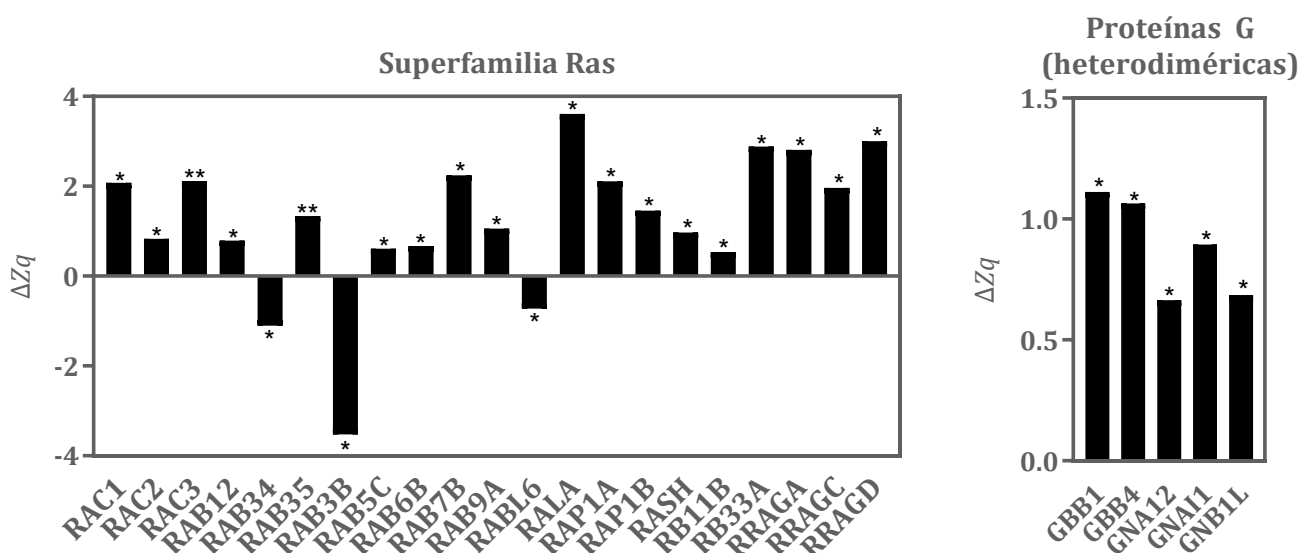


Figura 14. Las proteínas G muestran un incremento en pacientes VAB-AAT. Proteínas con cambios destacados en su abundancia pertenecientes a las familias de proteínas alteradas más representativas de VAB-AAT vs. VAT-AAT relacionadas con la señalización por proteínas G. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$; *** valor $p \leq 0,001$; **** valor $p \leq 0,0001$.

3. El estrés oxidativo es característico del AAT asociado a VAB

Las proteínas de las categorías funcionales más alteradas sugerían una activación de la respuesta al daño del ADN en pacientes con AAT asociado a VAB. Un análisis más detallado de estas familias de proteínas mostró que todas ellas están implicadas en la reparación del ADN utilizando ATP. Concretamente, encontramos una disminución de la expresión de las familias CHD, ORC y RFC; todas ellas dependientes de ATP. Esa disminución podría indicar una disponibilidad limitada del ATP, una característica de la existencia de estrés oxidativo.

Para confirmar esta situación de estrés oxidativo exacerbado, evaluamos las categorías funcionales identificadas que implicaban procesos biológicos redox, por ejemplo: «respuesta al estrés oxidativo», «síntesis y metabolismo de ROS» y «respuesta al estrés oxidativo mediada por NRF2» y, en particular, las variaciones proteicas individuales que componen esos procesos biológicos. La variación significativa en la abundancia de este proteoma oxidativo de las CMLVs (57 proteínas) confirmó el mayor entorno de ROS en la aortopatía asociada a la válvula bicúspide en comparación con la asociada a la tricúspide (Figura 15).

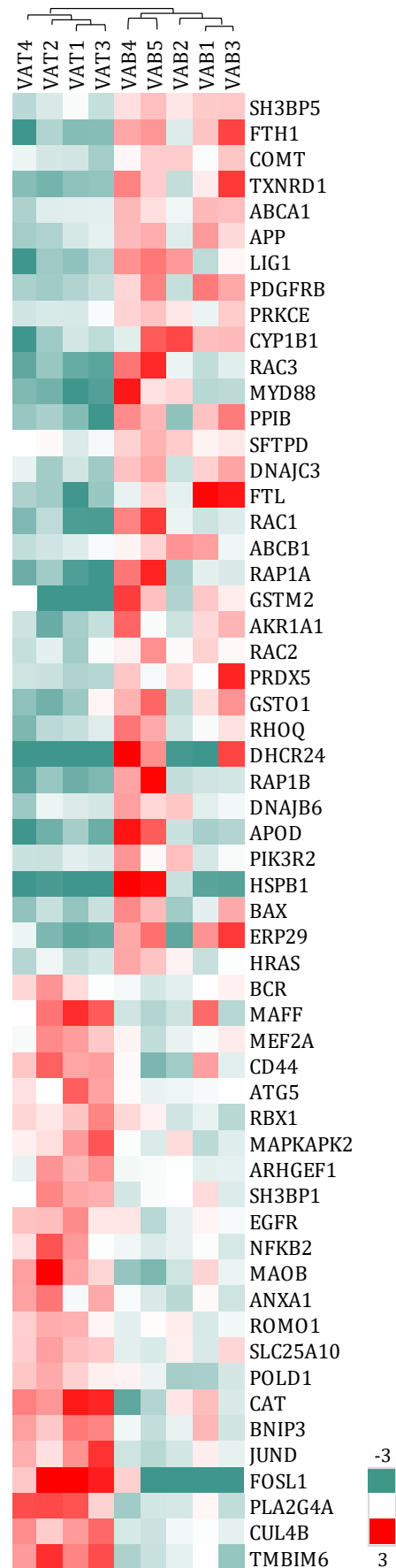


Figura 15. El VAB-AAT presenta un entorno de estrés oxidativo. Mapa de calor de proteínas relacionadas con estrés oxidativo identificadas por análisis de respuesta coordinada. Mapa térmico de proteínas: valor $p \leq 0,05$. Escala de colores $\Delta Zq = -3$ (verde), pasando por 0 (blanco), hasta +3 (rojo).

Además, cabe destacar que las CMLVs de pacientes con AAT asociado a VAB mostraron niveles elevados de los antioxidantes tioredoxina reductasa 1 (TXNRD1), glutatión S-transferasa Mu 2 (GSTM2) y glutatión S-transferasa omega-1 (GSTO1), así como niveles reducidos de catalasa (CAT) (Figura 16). Las CMLVs de pacientes con AAT y VAT o VAB mostraron niveles similares en el contenido de otros antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa.

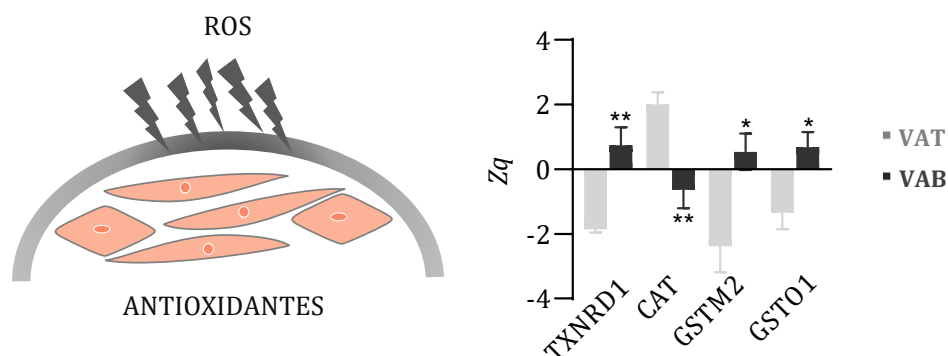


Figura 16. La defensa antioxidante está alterada en VAB-AAT. Proteínas diferenciales con actividad antioxidante en las CMLVs de pacientes VAT-AAT y VAB-AAT. Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$.

4. El ADN de las CMLVs de VAB presenta daño oxidativo

Para evaluar si el estrés oxidativo elevado identificado en las CMLVs se extiende al ADN causando oxidación del mismo, cuantificamos el daño oxidativo del ADN en ADN extraído de CMLVs y en orina, midiendo 8-OHdG. Este es un marcador establecido de estrés oxidativo producido por la acción de ROS y nitrógeno sobre el ADN. La Tabla 8 muestra las características clínicas de los pacientes con AAT incluidos en estos análisis de confirmación, clasificados según el tipo de válvula (CMLVs y orina; daño oxidativo del ADN). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en las variables clínicas, excepto en el diámetro aórtico, la estenosis y la insuficiencia aórtica, cuando se analizó en orina, que se consideraron variables confusoras.

El 8-OHdG estaba elevado en el ADN de las CMLVs ($p = 0,0159$) y en la orina ($p = 0,002$) de los pacientes VAB-AAT vs. VAT-AAT, lo que confirma un mayor nivel de daño en el ADN en los pacientes con AAT y VAB debido a una situación de estrés oxidativo prolongado (Figura 17). No se encontró asociación del diámetro aórtico ni de la estenosis con la concentración de 8-OHdG en orina. Sin embargo, sí se encontró asociación entre la concentración de dicha molécula y la presencia de insuficiencia aórtica, de manera que se corrigió la influencia de la insuficiencia en las diferencias observadas en la concentración de 8-OHdG en la orina.

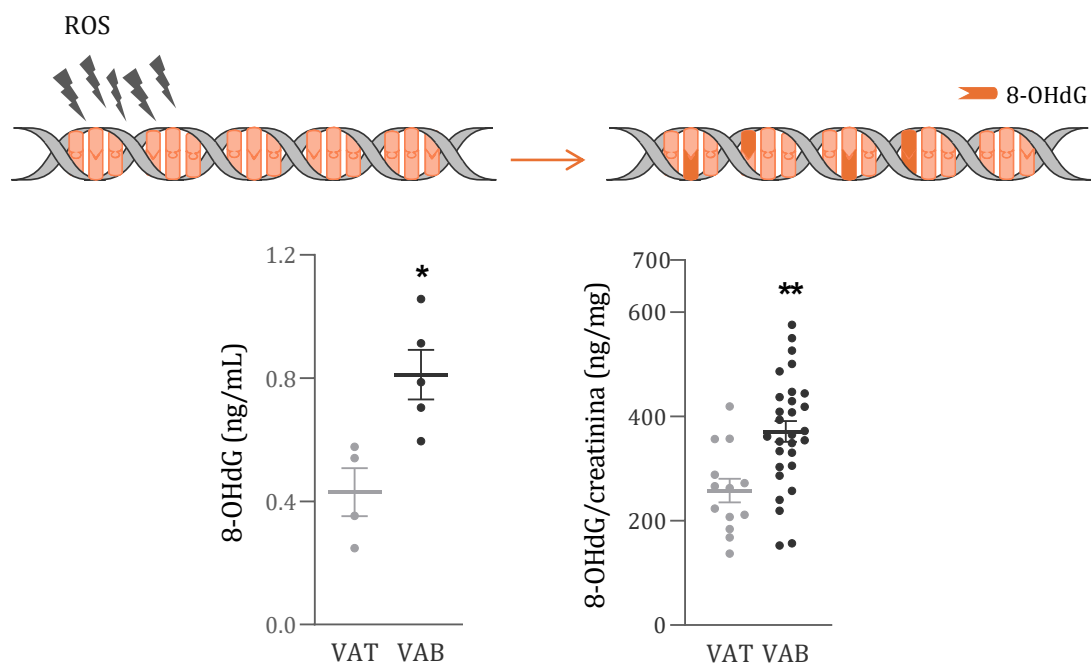


Figura 17. El estrés oxidativo en VAB-AAT provoca daño en el ADN. Cuantificación de 8-OHdG a partir de ADN extraído de CMLVs (gráfico de la izquierda) y muestras de orina (gráfico de la derecha). * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$.

5. El ciclo celular está detenido en el AAT asociado a VAB

El daño en el ADN observado en pacientes VAB-AAT activa una respuesta a dicho daño. Como se ha detallado anteriormente, esto se refleja en una disminución de la expresión de proteínas MMR y factores de replicación (por ejemplo, ORC, RCF, MCM) e histonas, que están asociados con la progresión del ciclo celular hacia las fases S y G2¹²⁸, lo que sugiere alteraciones en el ciclo celular, tal y como se muestra en la Figura 18.

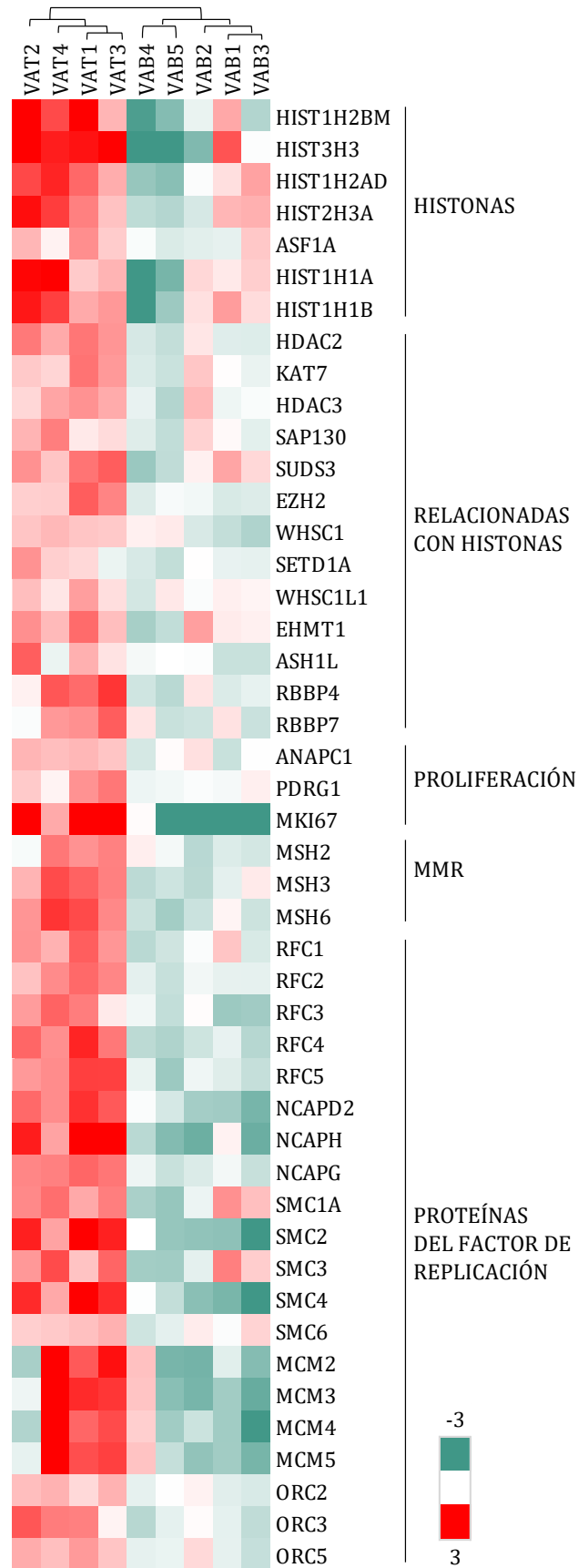


Figura 18. La progresión del ciclo celular está afectada en el AAT asociado a VAB. Mapa de calor de las proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular en pacientes con AAT y VAT frente a aquellos pacientes con AAT y VAB. Mapa térmico de proteínas: valor $p \leq 0,05$. Escala de colores: $\Delta Zq = -3$ (verde), pasando por 0 (blanco) hasta +3 (rojo).

Por este motivo, se evaluó el perfil del ciclo celular en CMLVs de pacientes con AAT y VAB o VAT. La Tabla 8 muestra las características clínicas de los pacientes con AAT (CMLVs; perfil del ciclo celular). No se observan diferencias significativas entre los grupos de estudio, salvo para la edad, la hipertensión y el diámetro aórtico, que se consideraron variables confusoras. La Figura 19 muestra un aumento significativo de la detención de la fase S en pacientes VAB-AAT (panel negro), lo que confirma la activación de la respuesta al daño en el ADN. La detención en la fase S y el consiguiente arresto del ciclo celular parecen indicar un aumento de la apoptosis inducida por el daño en el grupo VAB-AAT, como se observa en el histograma de barras. No se encontró en ningún caso asociación de las variables confusoras ni con el aumento de la detención de la fase S ni con el aumento de la apoptosis en VAB-AAT.

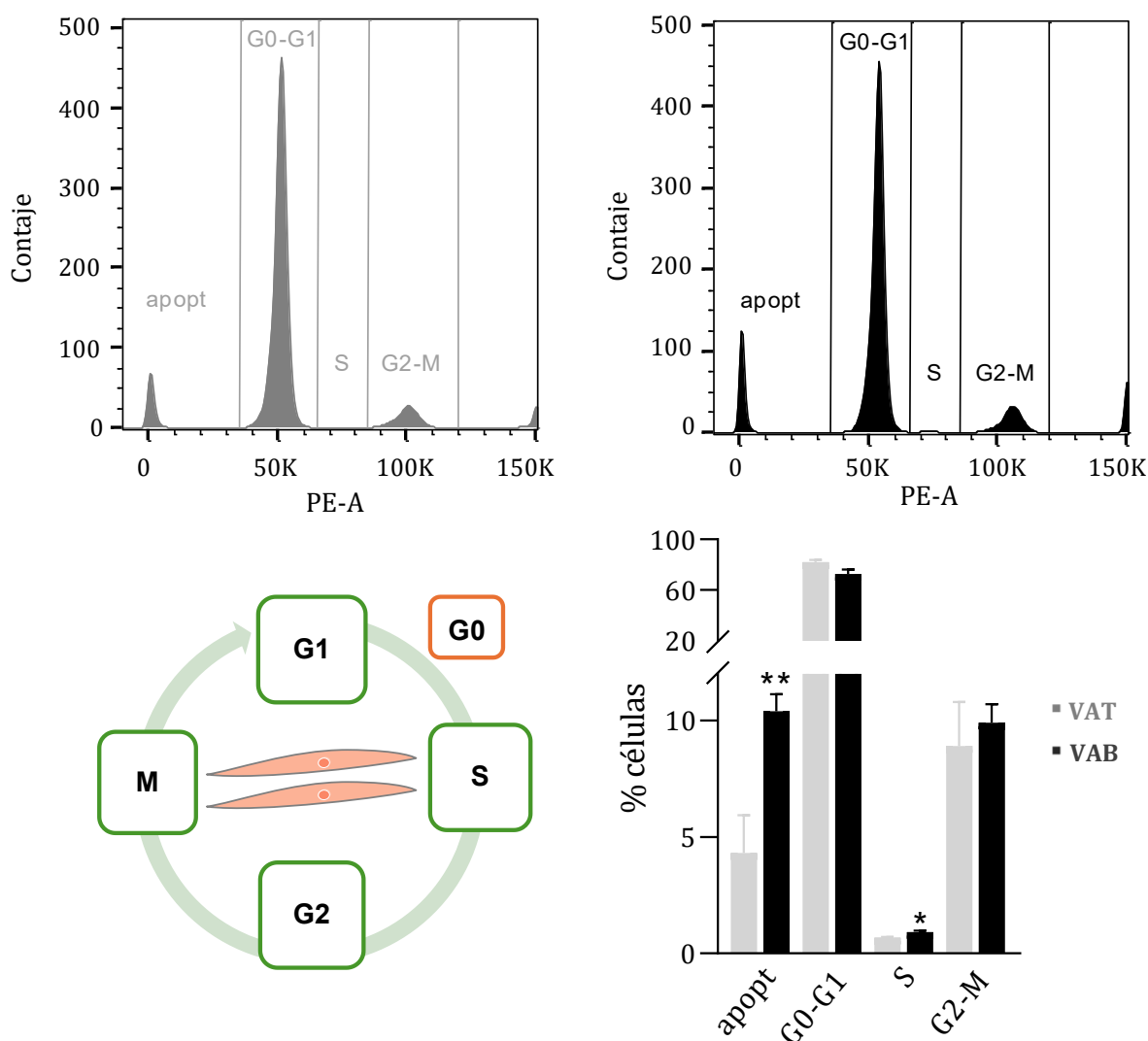


Figura 19. Las CMLVs de pacientes VAB-AAT muestran un arresto del ciclo celular en fase S. Perfil del ciclo celular en pacientes VAT-AAT (histograma gris) y en pacientes VAB-AAT (histograma negro). En el gráfico de barras se muestra el porcentaje de células en apoptosis, fases G0-G1, S y G2-M. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$.

6. Los cambios observados en las proteínas de las CMLVs de aortas de pacientes con AAT son transferibles al plasma como herramienta diagnóstica

Dentro de las proteínas con mayor tasa de cambio entre VAB-AAT y VAT-AAT, se encontraron un total de 21 proteínas que pueden secretarse de forma extracelular (Tabla S5 y S6). Las concentraciones de estas proteínas se estimaron en el plasma de una cohorte ampliada de 40 pacientes (Tabla 8; medidas en biopsia líquida; traslación: plasma). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en las variables clínicas, excepto en la estenosis y la insuficiencia aórtica, que se consideraron variables confusoras.

La proteína del Complemento C1q relacionada con el factor de necrosis tumoral 5 (C1QTNF5) ($p = 0,0073$), la subunidad alfa 2 de la laminina (LAMA2) ($p = 0,0359$), la prolil endopeptidasa FAP (FAP) ($p = 0,0009$), el biglicano (BGN) ($p = 0,0071$), la proteína 80 que contiene el dominio de bobina enrollada (CCDC80) ($p = 0,0007$), la trombospondina 3 (THBS3) ($p < 0,0001$) y la nexina derivada de la glía (SERPINE2) ($p = 0,0001$) mostraron niveles significativamente reducidos en el plasma de pacientes con AAT asociado a VAB (Figura 20), contrariamente a los resultados que observamos en las CMLVs, donde encontramos un aumento de todas estas proteínas en los pacientes con AAT asociado a VAB frente a VAT. No se encontró asociación entre la concentración de ninguna de estas proteínas con la estenosis o la insuficiencia aórtica.

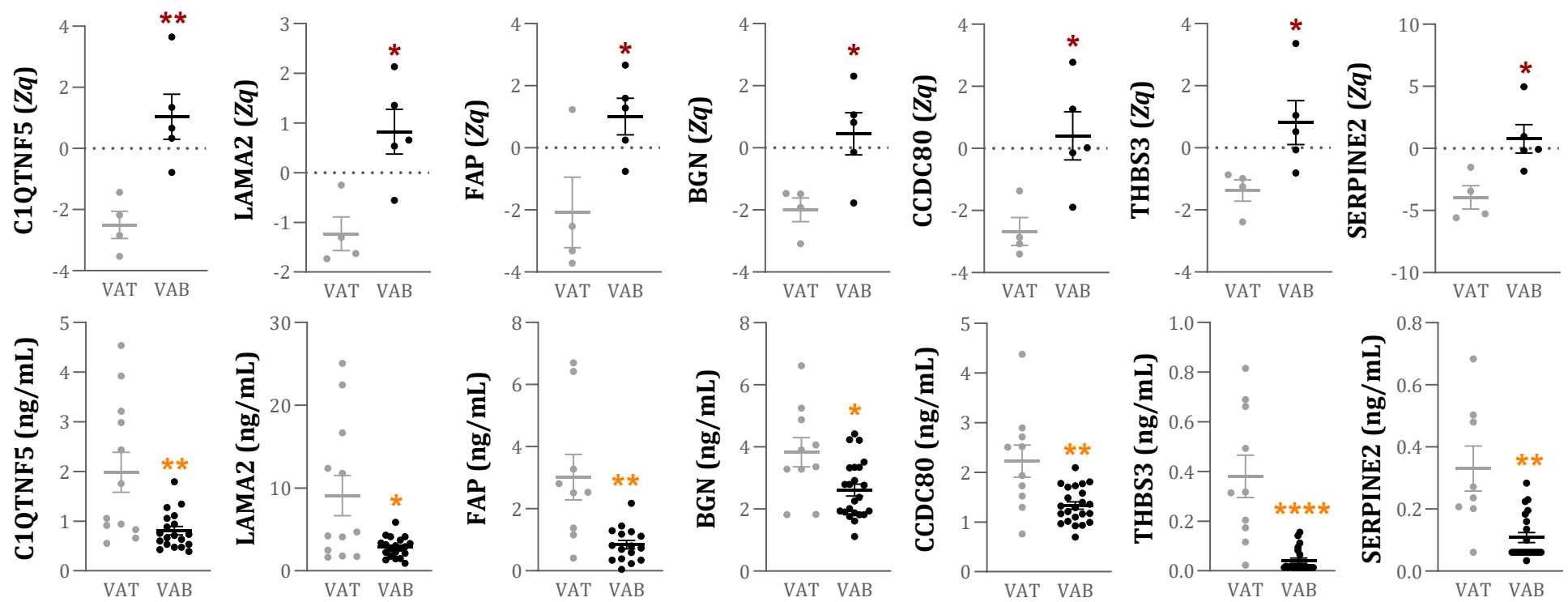


Figura 20. Las proteínas secretadas extracelularmente por las CMLVs en pacientes con AAT y VAB muestran niveles alterados en el plasma. Alteraciones en las CMLVs (panel superior) y en el plasma (panel inferior) de C1QTNF5, LAMA2, FAP, BGN, CCDC80, THBS3 y SERPINE2 en pacientes AAT con VAT y VAB. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$; *** valor $p \leq 0,001$; **** valor $p \leq 0,0001$.

Para evaluar estas proteínas como posibles marcadores diagnósticos del AAT asociado a VAB o VAT, se incluyó una cohorte de 48 pacientes sin dilatación y ambos tipos valvulares (Tabla 8; medidas en biopsia líquida; traslación: plasma). Para ambas comparativas, de acuerdo con el criterio de clasificación de los pacientes, se encontraron diferencias significativas en el diámetro aórtico para ambas formas de AAT al comparar los pacientes con y sin dilatación. No se observaron diferencias en ninguna otra variable clínica, salvo en la estenosis aórtica, que se consideró una variable confusora.

En el caso del AAT asociado a VAT, encontramos a la proteína FAP significativamente aumentada en los pacientes VAT-AAT frente a los pacientes VAT sin dilatación ($p = 0,0385$), mientras que no mostraba alteración significativa en pacientes con dilatación y VAB frente a pacientes sin dilatación. Esta proteína podría ser un buen marcador con capacidad diagnóstica para clasificar a estos pacientes AAT con VAT (AUC = 0,731; 95% CI [0,481-0,980]). Además, su concentración correlacionó positivamente con el diámetro aórtico ($R = 0,542$; $p = 0,0075$), sirviendo, por lo tanto, como marcador de seguimiento del AAT en el plasma de pacientes con VAT (Figura 21).

En los pacientes con AAT asociado a VAB, las proteínas C1QTNF5 ($p < 0,0001$) y LAMA2 ($p = 0,0471$) estaban disminuidas significativamente en los pacientes VAB-AAT en comparación con VAB-C, sin mostrar alteración significativa en los pacientes con VAT. Para los pacientes con AAT y VAB, la proteína C1QTNF5 mostró el mejor rendimiento a la hora de distinguir entre pacientes C y AAT (AUC = 0,882; 95% CI [0,778-0,986]) y su correlación negativa con el diámetro aórtico de los pacientes ($R = -0,534$; $p = 0,0005$) indicó que puede servir como marcador de progresión del AAT en el plasma de pacientes con VAB (Figura 21).

La capacidad discriminadora de todos estos marcadores fue independiente de la estenosis aórtica.

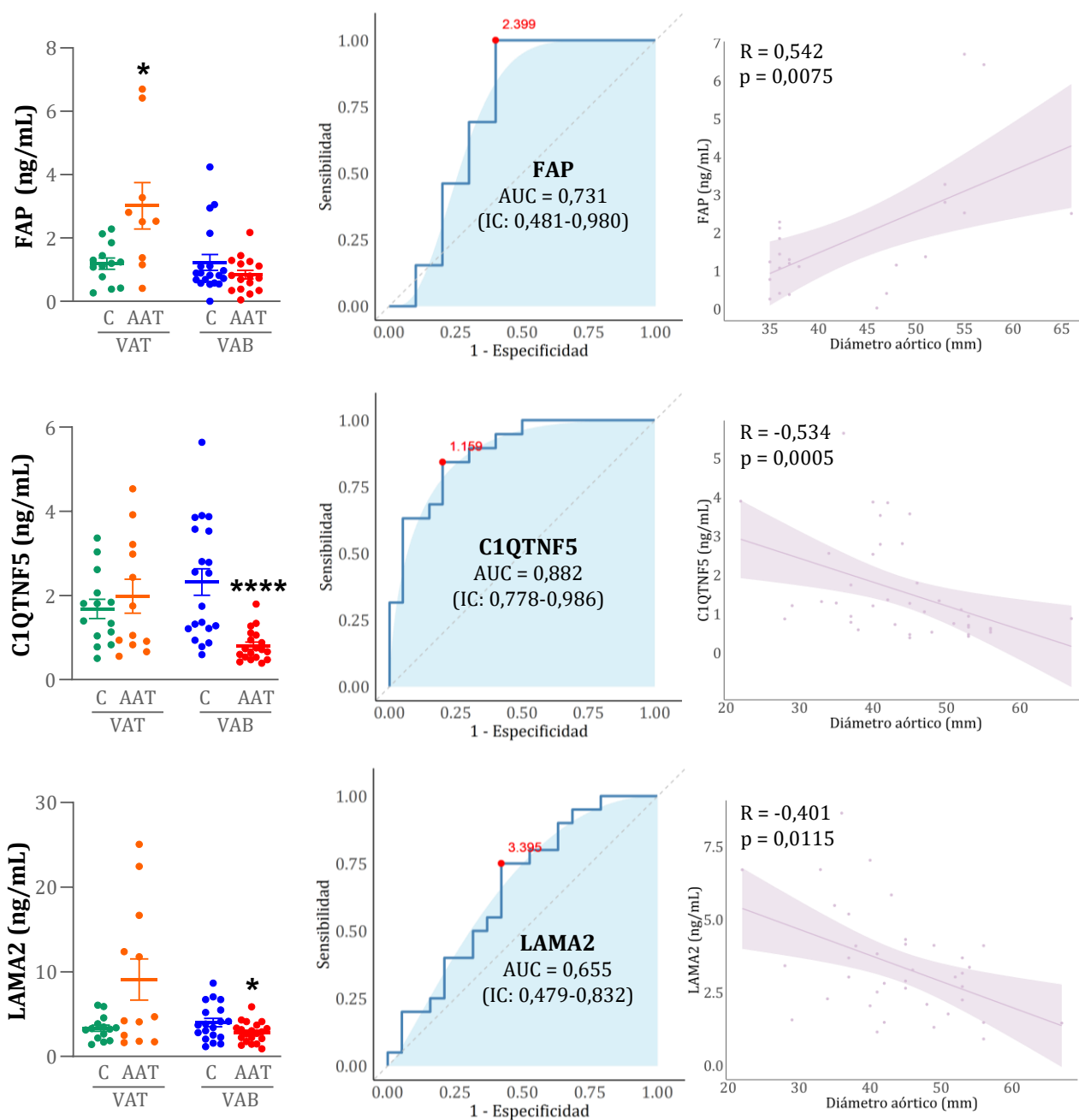


Figura 21. Las proteínas diferenciales en las CMLVs son transferibles al plasma como marcadores de diagnóstico y seguimiento en el AAT asociado a VAT y VAB. Proteínas diferenciales en las CMLVs que muestran también diferencias significativas en el plasma de los pacientes con AAT en comparación con pacientes sin dilatación, asociado a VAT (FAP) y a VAB (C1QTNF5 y LAMA2). Se incluyen el análisis de la curva ROC y la correlación de su concentración con el diámetro aórtico. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$; *** valor $p \leq 0,001$; **** valor $p \leq 0,0001$.

B) ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB

Para evaluar las características mitocondriales en el desarrollo del AAT en pacientes con VAT y VAB, se seleccionó la cohorte clínica cuyas características se presentan en la Tabla 9. En este estudio se incluyó además una cohorte de pacientes control. De acuerdo con el criterio de clasificación de los pacientes, se encontraron diferencias significativas en el diámetro aórtico, con un valor $p < 0,0001$ para ambas formas de AAT al comparar los pacientes con y sin dilatación. No se observaron diferencias significativas en las variables clínicas de estudio, salvo en la dislipemia en la comparativa de VAT y en la estenosis aórtica en ambas comparativas, de manera que se consideraron variables confusoras.

Tabla 9. Características de los pacientes C y AAT estratificados por VAT y VAB incluidos en el estudio mitocondrial.

	Grupos clínicos				Valor p	
	VAT-C (n = 12)	VAT-AAT (n = 13)	VAB-C (n = 9)	VAB-AAT (n = 12)	VAT-AAT vs. VAT-C	VAB-AAT vs. VAB-C
Edad (años)	65±11	68±8	64±11	59±9	0,7143	0,1635
Sexo masculino	8(89)	8(67)	7(58)	10(77)	0,3383	0,4110
IMC (kg/m ²)	28±3	29±6	27±4	28±6	0,8078	> 0,9999
Diabetes	2(22)	2(17)	2(17)	0(0)	> 0,9999	0,2200
HTA	7(78)	9(75)	6(50)	4(31)	> 0,9999	0,4283
DSL	6(67)	1(8)	6(50)	4(31)	0,0158	0,4283
Tabaco	3(33)	2(17)	2(17)	3(23)	0,6108	> 0,9999
FEVI	1(11)	3(25)	1(8)	3(23)	0,6030	0,5930
Diámetro aórtico (mm)	37±1	54±4	38±7	50±4	< 0,0001	< 0,0001
EA	7(78)	3(25)	12(100)	8(62)	0,0300	0,0391
IA	3(33)	8(67)	1(8)	6(46)	0,1984	0,0730

Los valores se expresan como número en % para las variables categóricas y media \pm desviación estándar para las variables continuas. Los valores p se estimaron mediante una prueba no paramétrica (Mann-Whitney). VAT: válvula aórtica tricúspide, VAB: válvula aórtica bicúspide, AAT: aneurisma de aorta torácica, HTA: hipertensión, DSL: dislipidemia, FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda, EA: estenosis aórtica, IA: insuficiencia aórtica.

La pureza de las fracciones enriquecidas en mitocondrias que se emplearon para este estudio, obtenidas a partir de tejido aórtico, se evaluó por Western blot analizando los marcadores citoplasmáticos vinculina y α -tubulina, el marcador nuclear laminina A/C y los marcadores mitocondriales VDAC, TOMM20 y citocromo C, y por microscopía electrónica de transmisión, tal y como se muestra en la Figura 22.

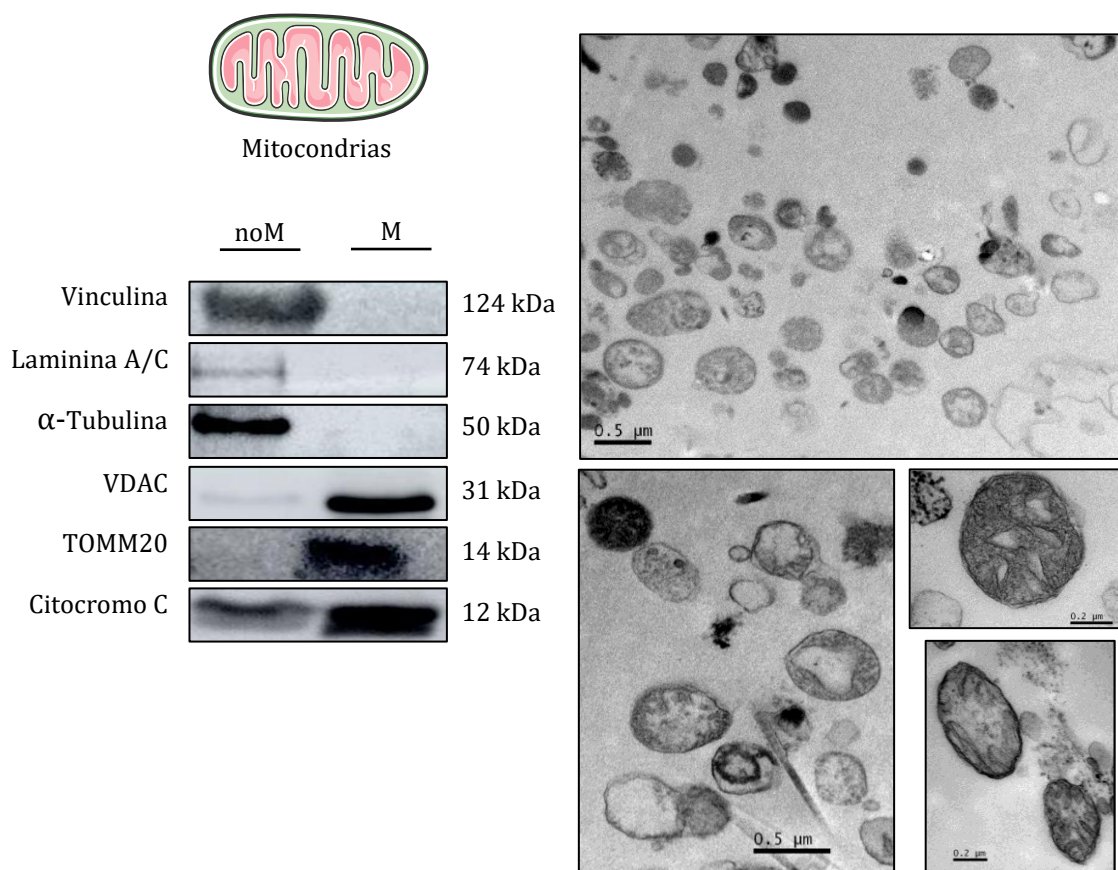


Figura 22. Las fracciones aisladas de tejido aórtico están enriquecidas en mitocondrias. Caracterización mediante Western blot con los marcadores vinculina, laminina A/C y α -tubulina para la fracción no mitocondrial y VDAC, TOMM20 y citocromo C para la fracción mitocondrial (izquierda) y mediante microscopía electrónica de transmisión (derecha). noM: fracción no mitocondrial (citoplasma + núcleo), M: fracción mitocondrial.

1. Las mitocondrias de tejido aórtico de pacientes con AAT asociado a VAT y VAB tienen comprometidas de forma diferencial la cadena respiratoria, la biogénesis, la estructura y el metabolismo mitocondrial

El análisis proteómico de la fracción mitocondrial identificó un total de 865 proteínas. De todas ellas, evaluamos en detalle las proteínas que identificamos pertenecientes a los principales procesos mitocondriales (Tabla S7), tales como la cadena respiratoria, de la cual encontramos 49 proteínas pertenecientes a los cinco complejos; la biogénesis, de la cual encontramos cinco proteínas; la estructura mitocondrial, donde detectamos siete proteínas; la síntesis de proteínas mitocondriales, de las cuales identificamos 13; y el metabolismo mitocondrial, donde detectamos 40 proteínas (Figura 23).

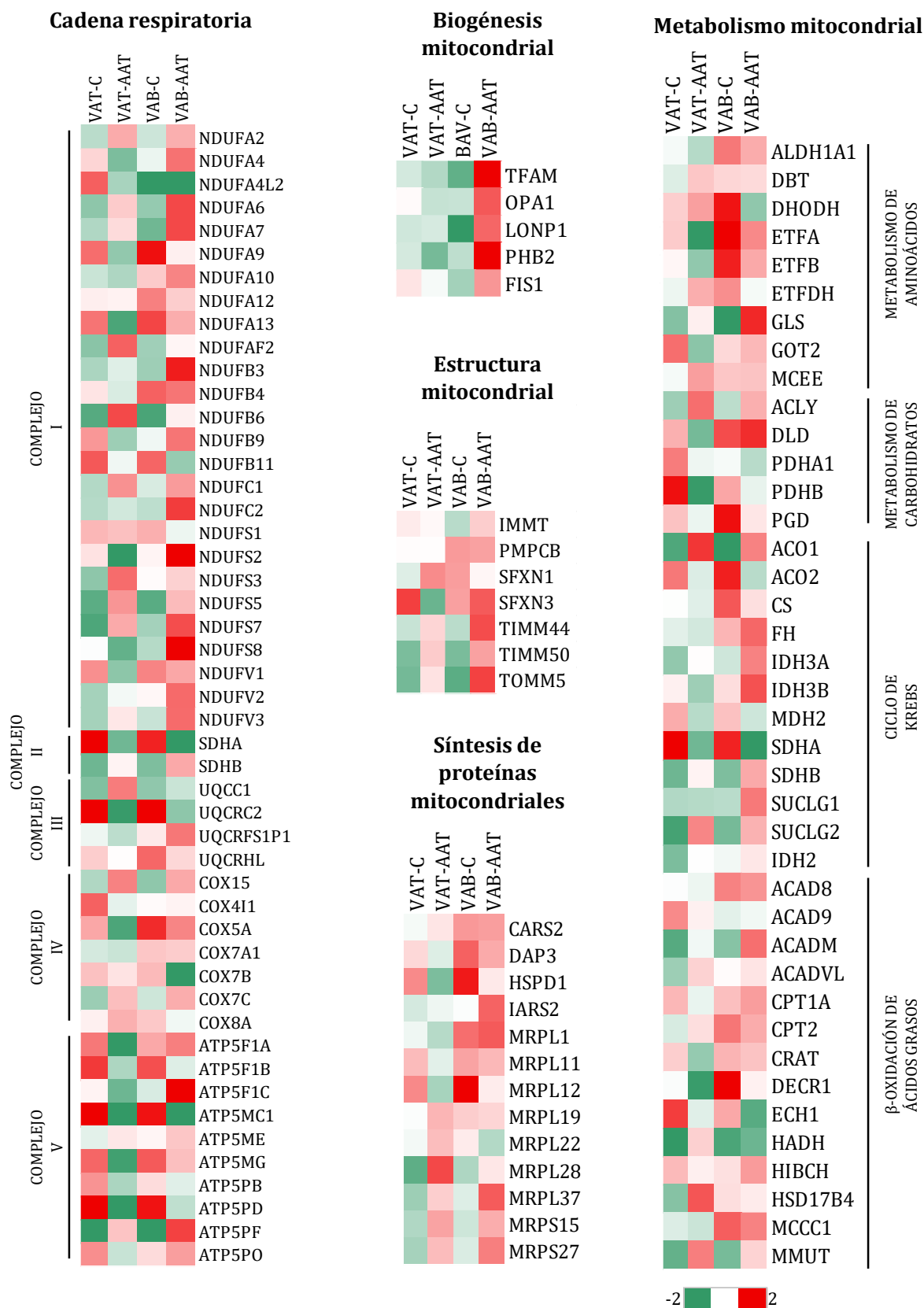


Figura 23. Proteoma de la cadena respiratoria, la biogénesis, estructura, síntesis de proteínas y el metabolismo mitocondrial en el AAT de pacientes con VAT y VAB. Mapa de calor de las proteínas relacionadas con la cadena respiratoria, la biogénesis, la estructura, la síntesis de proteínas y el metabolismo mitocondriales en los cuatro grupos clínicos de estudio. Escala de colores: Zq media = -2 (verde), pasando por 0 (blanco), hasta +2 (rojo).

Particularmente, al estudiar en detalle los pacientes VAT-AAT vs. VAT-C, se encontraron 19 proteínas significativamente alteradas de la cadena respiratoria (Figura 24). En su mayoría, tanto las proteínas del complejo I (NDUFA2, NDUFA6, NDUFAF2, NDUFB6, NUDFS3, NDUFS5, NDUFS7), como las del complejo IV (COX7C, COX15), se encontraron aumentadas en los pacientes con AAT. Por el contrario, el complejo II (SDHA), el III (UQCRC2) y el V (ATP5FB1, ATP5MC1, ATP5MG, ATP5PB, ATP5PD) mostraron una disminución generalizada en su abundancia en el AAT asociado a VAT (Tabla S7). La disminución significativa en la proteína SFXN3 en este tipo de AAT también podría impactar en estas alteraciones de la cadena respiratoria, ya que esta se encarga de ensamblar los complejos y tiene una función esencial en la organización de la membrana interna mitocondrial y en su estabilidad. Por el contrario, pero en el mismo contexto de la estructura mitocondrial, observamos un aumento en la proteína TOMM5, encargada de mantener la integridad y la importación proteica en la mitocondria.

La evaluación de la abundancia de proteínas implicadas en la síntesis de proteínas mitocondriales indica un aumento significativo mayoritario de las proteínas implicadas en la formación de las subunidades de los ribosomas mitocondriales en este tipo de AAT (MRPL28, MRPL37, MRPS15, MRPS27), con una disminución de MRPL12 y la chaperonina mitocondrial HSPD1, esencial para el correcto plegamiento de las proteínas mitocondriales.

El aumento en la β -oxidación de los ácidos grasos (HSD17B4 y MMUT, ambas aumentadas) y la alteración en el metabolismo de los carbohidratos (ACLY, aumentada; PDHB, disminuida) que detectamos en el AAT asociado a VAT podrían indicar un ajuste en el metabolismo mitocondrial. Además, encontramos una disminución de proteínas relacionadas con el Ciclo de Krebs, como GOT2, que conecta el metabolismo de aminoácidos (aa) con el Ciclo de Krebs, ACO2 y SDHA, y un aumento de ACO1 y SUCLG2, que sugieren una posible alteración del Ciclo de Krebs.

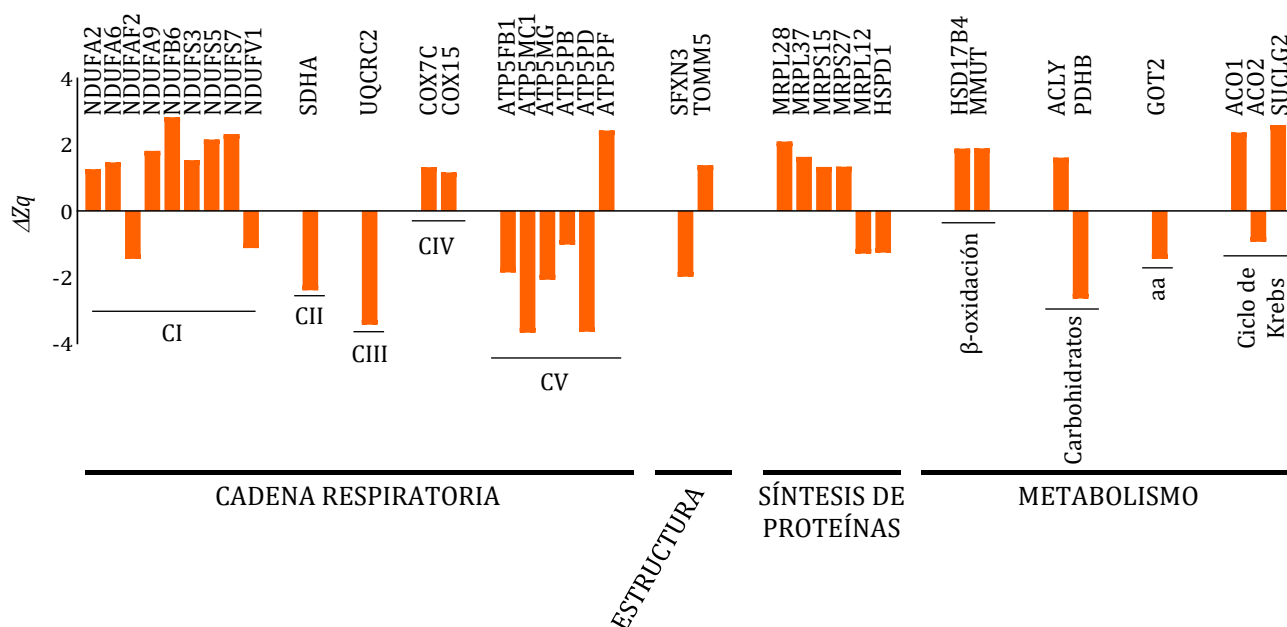


Figura 24. La β -oxidación de los ácidos grasos, el metabolismo de los carbohidratos y la síntesis de proteínas mitocondriales parecen procesos alterados en las mitocondrias del AAT asociado a VAT. Proteínas mitocondriales alteradas diferencialmente en la comparativa VAT-AAT vs. VAT-C. Proteínas representadas con valor $p \leq 0,05$.

En la comparativa VAB-AAT vs. VAB-C, se detectaron 11 proteínas diferenciales de la cadena respiratoria, pertenecientes a los complejos I (NDUFA6, NDUFA7, NDUFA9, NDUFB11, NDUFS7, NDUFS8), mayormente aumentadas, II (SHDA), IV (COX15) y V (ATP5F1B, ATP5MC1, ATP5PF), mayormente disminuidas (Figura 25). En este caso, no se encontró representación del complejo III (Tabla S7).

En este tipo AAT, el asociado a VAB, encontramos un aumento significativo de proteínas implicadas en la estructura mitocondrial. Concretamente, de las proteínas TIMM44 y TOMM5 (ambas aumentadas), las cuales forman parte de la maquinaria de importación mitocondrial y se encargan de la homeostasis estructural de la mitocondria. Como un proceso alterado exclusivamente en el AAT asociado a VAB encontramos la biogénesis mitocondrial, con un aumento de las proteínas OPA1 y TFAM, involucradas en la dinámica mitocondrial y, más concretamente, en la fusión y mantenimiento del ADNmt, respectivamente. Al igual que en VAT, encontramos una disminución en la proteína implicada en la síntesis de proteínas mitocondriales MRPL12, pero con una menor relevancia de este proceso que en el AAT asociado a VAT. Metabólicamente, se observa una disminución de las proteínas relacionadas con el Ciclo de Krebs (ACO2, SDHA, que también forma parte del complejo II de la cadena respiratoria), con un aumento de ACO1, de nuevo indicando una posible alteración de este ciclo. También detectamos un aumento de GLS, implicada en el metabolismo de la glutamina, así como una disminución en DHODH, esencial en la síntesis de pirimidinas.

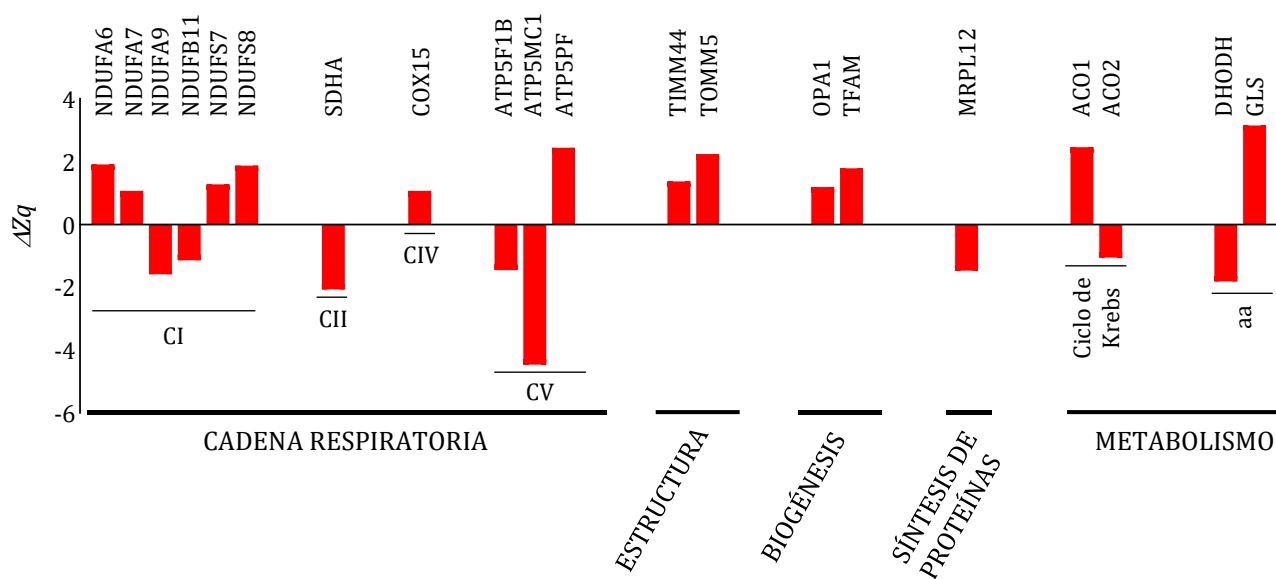


Figura 25. La estructura y la biogénesis mitocondrial parecen procesos alterados en las mitocondrias del AAT asociado a VAB. Proteínas mitocondriales alteradas diferencialmente en la comparativa VAB-AAT vs. VAB-C. Proteínas representadas con valor $p \leq 0,05$.

Estos resultados apuntan a que en el AAT asociado a VAT hay una alteración en la cadena respiratoria con una reprogramación metabólica hacia un metabolismo lipídico y un aumento en la síntesis de proteínas mitocondriales, que podría estar alterada y no ser del todo efectiva. Por su parte, en VAB-AAT, parece existir una adaptación mitocondrial con un aumento de la biogénesis y un metabolismo más dependiente de la glutamina y la síntesis de nucleótidos.

2. Las mitocondrias del AAT asociado a VAT y VAB muestran características morfológicas diferenciales

Se evaluaron las características morfológicas y el número de mitocondrias directamente en la aorta mediante microscopía electrónica de transmisión. Se midió el número de mitocondrias por célula, el tamaño, la cercanía al núcleo y el número de crestas por mitocondria en cada uno de los cuatro grupos clínicos de estudio (Figura 26).

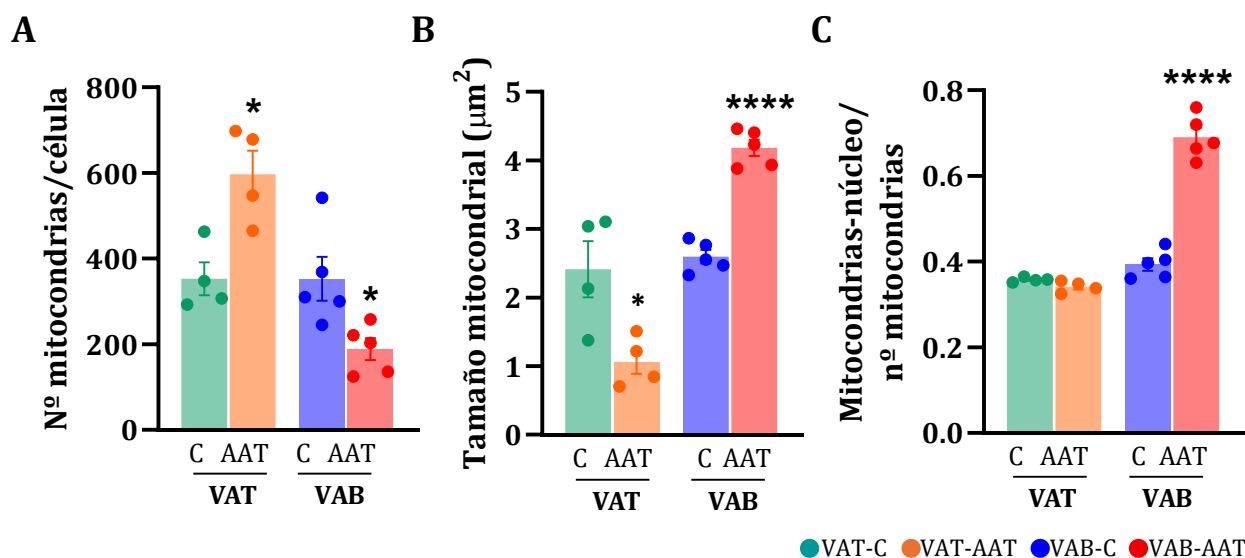


Figura 26. Las mitocondrias en pacientes VAT-AAT son más numerosas y pequeñas que en pacientes VAB-AAT, donde se encuentran más cerca del núcleo. Caracterización morfológica de las mitocondrias en tejido aórtico de pacientes con AAT asociado a VAT y VAB con respecto a sus respectivos controles. **A.** Número de mitocondrias por célula. **B.** Tamaño mitocondrial (expresado en área). **C.** Cercanía al núcleo, expresada como el ratio de mitocondrias en contacto con el núcleo (mitochondrias-núcleo) con respecto al total de mitocondrias del grupo de estudio. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$; *** valor $p \leq 0,001$; **** valor $p \leq 0,0001$.

La cuantificación del número de mitocondrias por célula en cada grupo clínico evidenció un mayor número de mitocondrias, entre 460 y 700, en los pacientes VAT-AAT con respecto a los VAT-C ($p = 0,0111$), donde encontramos entre 300 y 460 (Figura 26A). Sin embargo, pese a ser más numerosas, las mitocondrias tenían un menor tamaño en estos pacientes ($p = 0,0242$), con un área de entre 0,7-1,5 μm^2 frente a un área de 1,3-3 μm^2 del grupo control (Figura 26B). Por el contrario, en la comparativa VAB-AAT frente a VAB-C, encontramos en el AAT menos mitocondrias ($p = 0,0204$), entre 125 y 260 frente a las 245-540 del grupo control correspondiente (Figura 26A), pero más grandes ($p < 0,0001$), con un tamaño entre 3,8 y 4,5 μm^2 en el AAT vs. 2,3-2,8 μm^2 del grupo VAB-C (Figura 26B). Como se muestra en la figura, tanto el número de mitocondrias como el tamaño de estas son muy similares en VAT-C y VAB-C, luego parece ser el desarrollo del AAT el que da lugar a los cambios mitocondriales mencionados. Además, encontramos que las mitocondrias presentes en el AAT asociado a VAB se localizan más cerca del núcleo que sus correspondientes controles ($p < 0,0001$). No observamos diferencias significativas en los aneurismas asociados a VAT en cuanto a la localización respecto al núcleo ($p = 0,0678$) (Figura 26C).

En cuanto a las crestas de las mitocondrias, detectamos que sólo los controles tienen mitocondrias con más de siete crestas, mientras que hay una pérdida de mitocondrias con

muchas crestas en el AAT en general (Figura 27), como se observa en el perfil de crestas en VAT-AAT vs. VAT-C y en VAB-AAT vs. VAB-C, diferencial en ambos casos ($p < 0,0001$). Concretamente, en el AAT asociado a VAT desaparecen mitocondrias con muchas crestas, a pesar del aumento general del número de mitocondrias comentado anteriormente. Por otro lado, en el AAT asociado a VAB, también desaparecen mitocondrias con muchas crestas (≥ 5 crestas), pero las que quedan tienen menos crestas que sus respectivos controles (entre 0 y 4 crestas) de una forma más acusada que la tendencia observada en pacientes con VAT.

En general, el perfil de crestas en ambos aneurismas es muy similar y únicamente se observan diferencias entre VAT-C y VAB-C, por lo que parece que la presencia de VAT o VAB por sí misma hace que haya diferencias basales que luego parecen homogeneizarse durante el desarrollo del AAT.

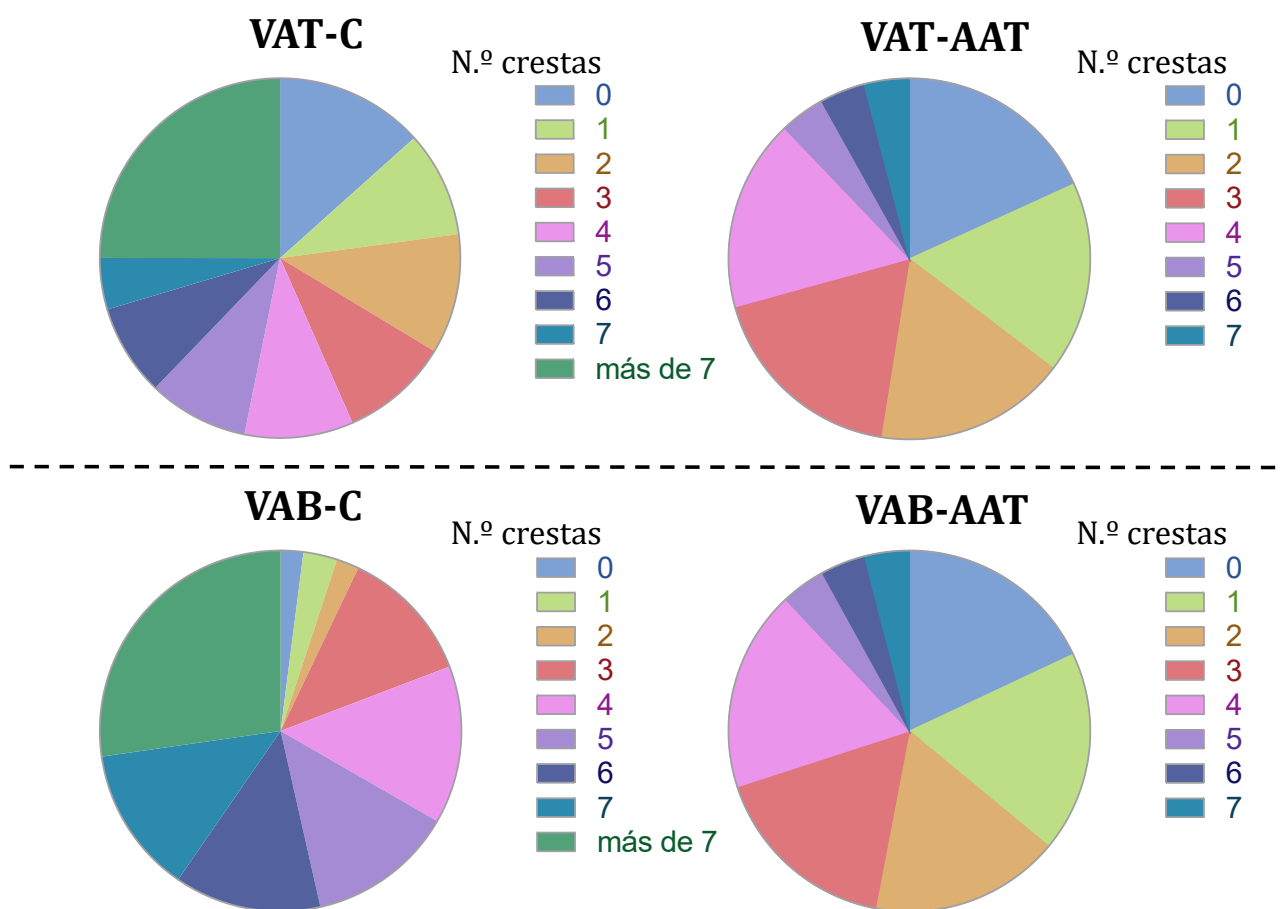


Figura 27. Las mitocondrias del AAT asociado a VAT y VAB muestran un perfil de crestas diferencial respecto a sus controles. Perfil de crestas mitocondriales de las mitocondrias de VAT-C, VAT-AAT, VAB-C y VAB-AAT, agrupadas según su número de crestas (de 0 a 7 y más de 7) en función del número total de mitocondrias del grupo correspondiente.

Al evaluar la asociación del número, el tamaño, la cercanía al núcleo y el número de crestas mitocondriales con las variables clínicas confusoras, no encontramos asociación en ningún caso.

Estos resultados sugieren que en VAT-AAT, aunque el tamaño mitocondrial sea menor, existe un aumento significativo en el número de mitocondrias, de manera que se permite seguir manteniendo la capacidad de generar ATP. Por el contrario, en VAB-AAT, se observa una disminución en el número de mitocondrias y, aunque son más grandes, tienen menos crestas, luego el proceso de obtención de ATP parece que podría ser más ineficiente.

3. La funcionalidad de las mitocondrias muestra patrones diferenciales en el desarrollo del aneurisma asociado a VAT y VAB

Para evaluar si las diferencias observadas a nivel proteómico y morfológico son reflejo de una funcionalidad mitocondrial diferencial en el AAT de ambos tipos valvulares, estudiamos: el número de copias de ADNmt como un reflejo de la capacidad bioenergética y la biogénesis mitocondrial; el potencial de membrana de estos orgánulos ($\Delta\Psi_m$), esencial para impulsar la síntesis de ATP; la cantidad de superóxido mitocondrial, como medida del estrés oxidativo celular; y la capacidad glucolítica y respiración mitocondrial para evaluar el estado metabólico de las CMLVs (Figura 28).

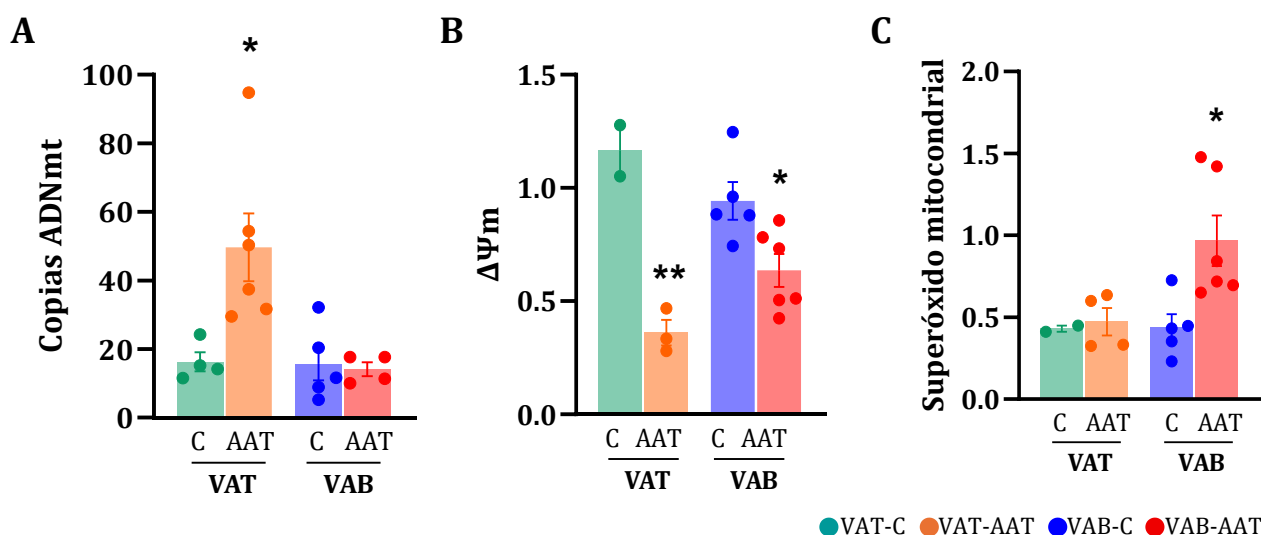


Figura 28. Disfunción mitocondrial en el AAT: compatible con un mecanismo compensatorio en VAT y más oxidativa en VAB. A. Cuantificación del número de copias de ADNmt en tejido aórtico. B. Medida del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) en CMLVs; C. Producción de superóxido mitocondrial en CMLVs. *Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$.

El análisis del número de copias de ADNmt reveló que los pacientes con AAT asociado a VAT tienen un mayor número de copias que sus respectivos controles ($p = 0,0060$), lo que concuerda con el mayor número de mitocondrias que observábamos previamente, apuntando a un posible mecanismo compensatorio en estos pacientes en un intento de contrarrestar la disfunción mitocondrial (Figura 28A). Esto está en consonancia con la mayor abundancia de proteínas implicadas en la formación de las subunidades ribosómicas que se veía en el proteoma mitocondrial (Figura 24). No se encontraron diferencias significativas en la comparativa VAB-AAT frente a VAB-C ($p = 0,7696$).

El potencial de membrana está disminuido en el AAT asociado a ambos tipos valvulares en comparación con sus respectivos controles (VAT-AAT vs. VAT-C: $p = 0,0054$; VAB-AAT vs. VAT-C: $p = 0,0208$), confirmando de nuevo una disfunción mitocondrial en el AAT (Figura 28B).

En cuanto a la generación de ROS, detectamos un aumento de superóxido mitocondrial en los pacientes con AAT y VAB ($p = 0,0193$), en concordancia con los resultados del análisis de las CMLVs presentado anteriormente, que indicaba un mayor estrés oxidativo en VAB-AAT (Figura 28C). No se detectaron diferencias en los pacientes AAT con VAT ($p = 0,7545$).

Los resultados del análisis de la capacidad glucolítica y la respiración mitocondrial de las CMLVs de los pacientes con AAT asociado a VAB (Figura 29B) mostraron que las mitocondrias tienen mayor respiración basal ($p = 0,0087$) (Figura 29C), así como una mayor fuga de protones ($p = 0,0173$) (Figura 29D) acompañada de una mayor producción de ATP ($p = 0,0043$) (Figura 29E). Además, tienen un menor índice de control respiratorio (RCR, por sus siglas en inglés), que indica una menor eficiencia de acoplamiento entre la respiración mitocondrial y la producción de ATP ($p = 0,0303$), calculada como la relación entre la respiración máxima (FCCP) y la respiración basal o de fuga (oligomicina)¹²⁹ (Figura 29F).

No se observaron diferencias significativas en estos parámetros en el aneurisma asociado a VAT (Figura 29B). Tampoco se detectaron diferencias entre los grupos clínicos de estudio ni en la respiración máxima (Figura 29G), ni en la capacidad respiratoria de reserva (Figura 29H) ni en la respiración no mitocondrial (Figura 29I).

Al evaluar la posible influencia de las variables confusoras en los resultados observados, no encontramos asociación entre ninguna de ellas con los parámetros funcionales estudiados.

Estos resultados sugieren que las mitocondrias de los pacientes con AAT asociado a VAB tienen un aumento de la respiración mitocondrial basal debido a una mayor demanda, posiblemente como respuesta a un estado de estrés o daño estructural, con un intento de la célula de minimizar este estrés oxidativo con la fuga de protones como mecanismo protector, pero que al final acaba siendo perjudicial. El intento de mantener la homeostasis energética, a pesar de la disfunción subyacente, se refleja en el aumento de la producción de ATP. Los resultados muestran una alteración funcional mitocondrial activa en el AAT asociado a VAB, mientras que en el AAT asociado a VAT no se observan estos cambios. En estos pacientes, a pesar de las alteraciones proteómicas que se observaron previamente en las proteínas de la cadena respiratoria, parece que existe un mecanismo compensatorio que permite mantener la producción de ATP en las mitocondrias del AAT asociado a VAT.

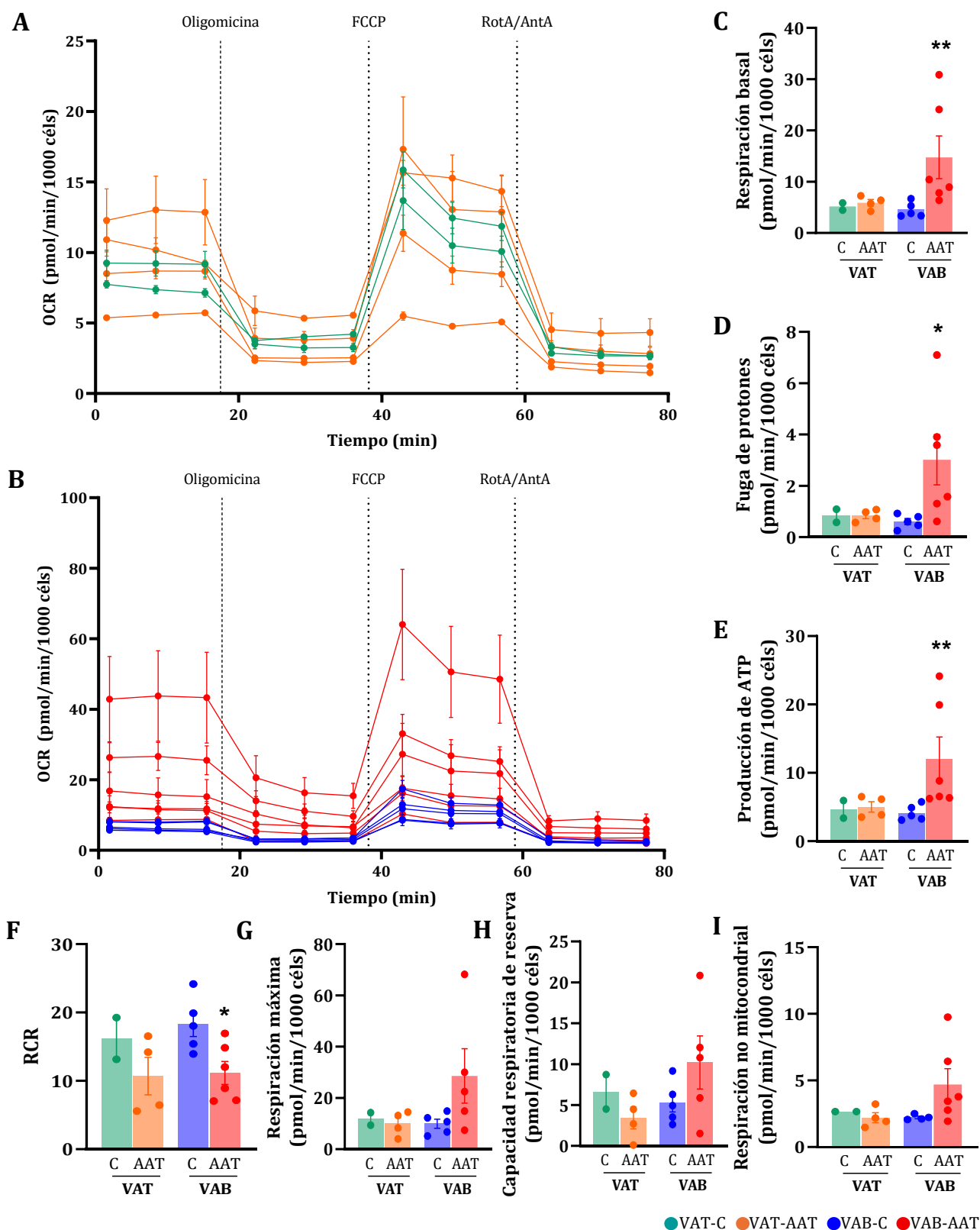


Figura 29. La capacidad respiratoria está alterada en pacientes VAB-AAT vs. VAB-C. **A.** Respiración mitocondrial en VAT-C y VAT-AAT medida por OCR. **B.** Respiración mitocondrial en VAB-C y VAB-AAT medida por OCR. **C.** Evaluación del consumo de oxígeno de las CMLVs en situación basal (respiración basal). **D.** Consumo de oxígeno tras inhibir la cadena respiratoria con oligomicina: fuga de protones y **E.** Producción de ATP. **F.** Eficiencia del acoplamiento entre la respiración mitocondrial y la producción de ATP (RCR). **G.** Evaluación al desacoplar la cadena respiratoria con FCCP: respiración máxima y **H.** Capacidad respiratoria de reserva. **I.** Evaluación del consumo tras inhibir el complejo I y el III de la cadena respiratoria con rotenona A y antimicina A, respectivamente (respiración no mitocondrial). *Valor $p \leq 0,05$; **valor $p \leq 0,01$.

C) ANÁLISIS DEL USO DIFERENCIAL DE LA GLUCOSA EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB

Un total de 110 pacientes fueron incluidos en este estudio cuyas características clínicas se recopilan en la Tabla 10. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a edad, sexo, índice de masa corporal, diabetes, hipertensión, dislipidemia, niveles de colesterol y triglicéridos o tabaquismo, pero sí en la estenosis aórtica en ambas comparativas y en la insuficiencia aórtica en la comparativa VAT-AAT vs. VAT-C, que se consideraron variables confusoras. De acuerdo con el criterio de clasificación de los pacientes, se encontraron diferencias significativas en el diámetro aórtico, con un valor $p < 0,0001$ para ambas formas de AAT al comparar los pacientes con y sin dilatación.

Tabla 10. Características de los pacientes C y AAT estratificados por VAT y VAB reclutados para el estudio de las diferencias metabólicas.

Característica clínica	Grupos clínicos				Valor p	
	VAT-C (n = 24)	VAT-AAT (n = 18)	VAB-C (n = 35)	VAB-AAT (n = 33)	VAT-AAT vs. VAT-C	VAB-AAT vs. VAB-C
Edad (años)	67±11	66±10	63±10	59±13	0,6097	0,3357
Sexo masculino	19(79)	12(67)	23(66)	24(73)	0,4832	0,6049
IMC (kg/m ²)	29±4	30±6	27±4	28±5	0,5887	0,3889
Diabetes	6(25)	4(22)	4(11)	3(9)	>0,9999	>0,9999
HTA	18(75)	14(78)	21(60)	17(52)	>0,9999	0,6256
DSL	14(58)	6(33)	21(60)	15(45)	0,1309	0,3311
Tabaco	5(21)	4(22)	9(26)	12(36)	>0,9999	0,4335
FEVI	3(13)	3(17)	5(14)	4(12)	>0,9999	>0,9999
Diámetro aórtico (mm)	36±1	55±5	38±5	50±4	<0,0001	<0,0001
EA	20(83)	3(17)	34(97)	25(76)	<0,0001	0,0121
IA	8(33)	4(22)	7(20)	9(27)	0,0058	0,5724
Colesterol total (mg/dL)	177±48	172±39	174±41	183±49	0,7244	0,4382
Triglicéridos (mg/dL)	130±97	121±66	123±61	130±79	0,9360	0,9413
Medicación						
Antiarrítmicos	9(38)	9(50)	25(71)	14(42)	0,5328	0,3112
Antihipertensivos	16(67)	13(28)	17(49)	15(45)	0,7482	0,8130
Antilipémicos	13(54)	4(22)	18(51)	14(42)	0,0572	0,4777
Antiplaquetarios	12(50)	4(22)	9(26)	9(27)	0,1087	>0,9999
Anticoagulantes	6(25)	4(22)	3(9)	7(21)	>0,9999	0,1809
Antidiabéticos	6(25)	4(22)	4(11)	3(9)	>0,9999	>0,9999

Las variables continuas se presentan como media ± desviación estándar y las variables categóricas se expresan como número total y %. Se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre los grupos de aneurisma y control. VAT: válvula aórtica tricúspide, VAB: válvula aórtica bicúspide, C: control, AAT: aneurisma aórtico torácico, IMC: índice de masa corporal, HTA: hipertensión, DSL: dislipidemia, EA: estenosis aórtica, IA: insuficiencia aórtica.

1. Los pacientes con AAT asociado a VAT y VAB presentan huellas metabólicas plasmáticas diferenciales

Con el objetivo de dilucidar las posibles diferencias metabólicas presentes en el AAT asociado a cada tipo valvular, se llevó a cabo el análisis metabólico en el plasma de los cuatro grupos

clínicos de estudio utilizando espectrometría de masas no dirigida. El correcto rendimiento de nuestros métodos analíticos se evaluó con los QCs. Los cuatro métodos cromatográficos utilizados, para maximizar la cobertura del metaboloma, separaron con éxito las muestras de AAT de las muestras C, tanto para el grupo VAB como para el grupo VAT, tal y como se visualiza en los modelos PLS-DA (Figura 30).

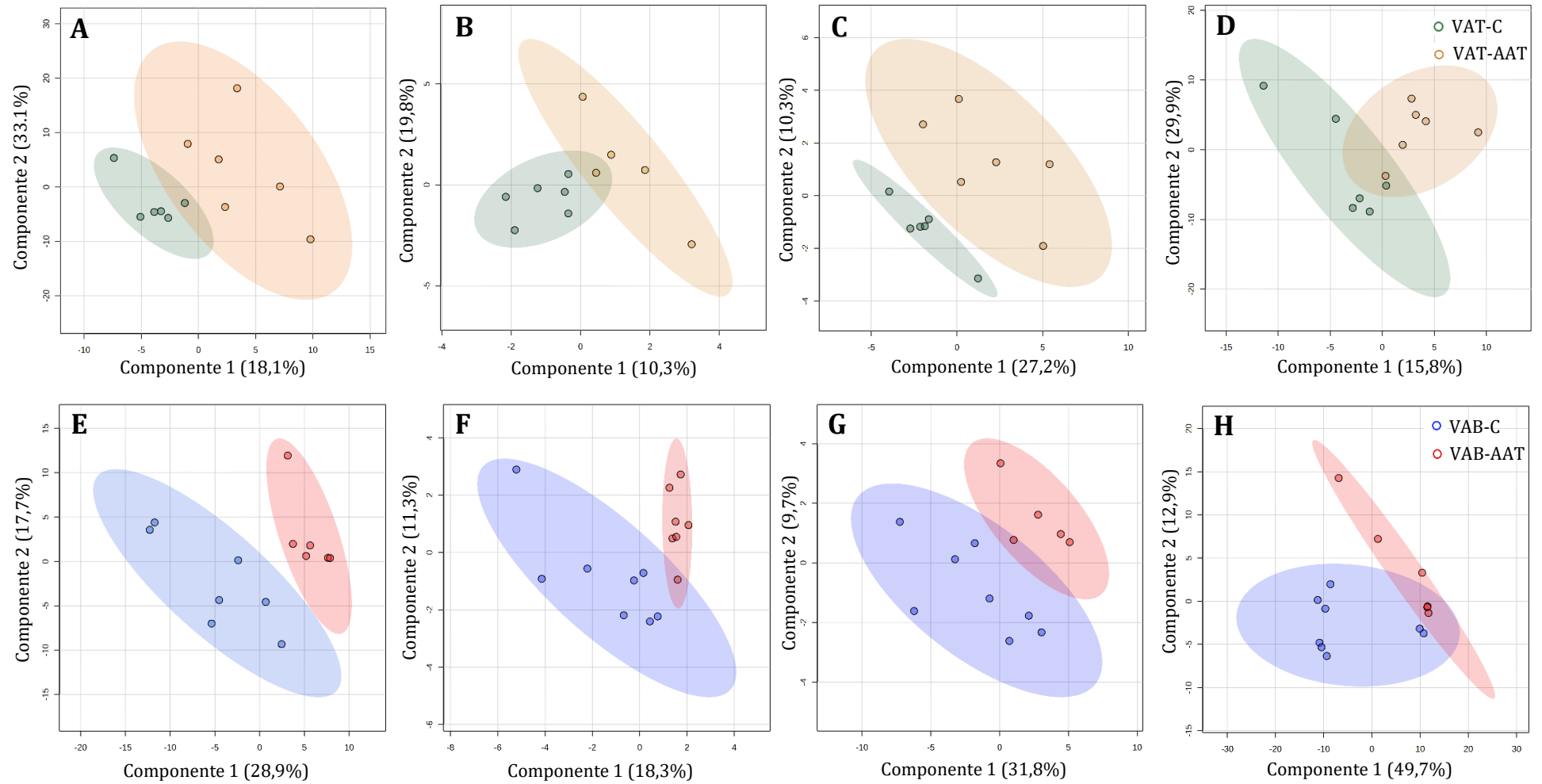


Figura 30. Los cuatro métodos cromatográficos muestran una buena separación entre los grupos de estudio. Se muestran gráficos PLS-DA para pacientes con VAT (A-D) y VAB (E-H). Los cuatro métodos cromatográficos incluyen: **A.** RPLC+; **B.** RPLC-; **C.** HILIC+ y **D.** HILIC- para la cohorte VAT y **E.** RPLC+; **F.** RPLC-; **G.** HILIC+ y **H.** HILIC- para la cohorte VAB.

Se consideraron un total de 1.839 señales moleculares (valores m/z) de los cuatro análisis: 837 m/z en RPLC+, 270 m/z en HILIC+, 140 m/z en RPLC- y 592 m/z en HILIC-. Entre ellos, 44 valores m/z (metabolitos) mostraron cambios significativos en su abundancia (valor p corregido por $FDR \leq 0,05$) (Tabla S8). Concretamente, 15 metabolitos se mostraron alterados en la comparación entre pacientes VAT-AAT y VAT-C: 11 aumentados en la condición patológica, siendo mayoritariamente carnitinas (CAR), y 4 disminuidos, principalmente glicerofosfolípidos (fosfatidilcolinas (PC, por sus siglas en inglés) y fosfatidiletanolaminas (PE, por sus siglas en inglés)) (Figura 31).

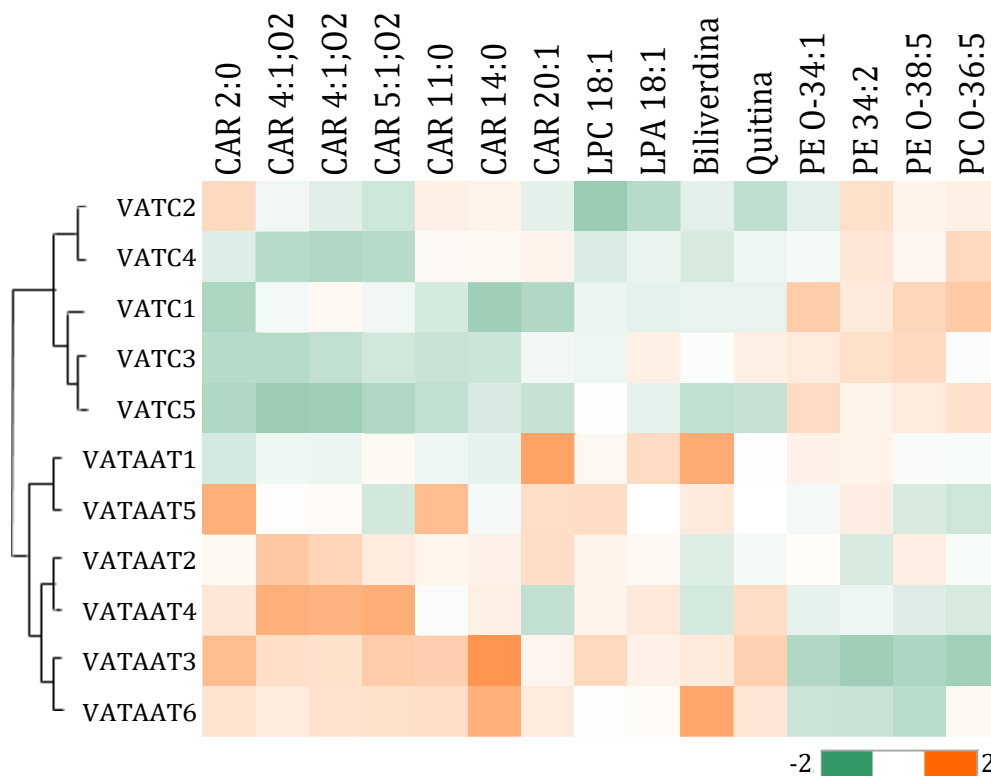


Figura 31. Las carnitinas son metabolitos diferenciales en el aneurisma de VAT. Mapa de calor de los metabolitos significativamente alterados (valor p corregido $\leq 0,05$) en la comparación VAT-AAT frente a VAT-C. Escala de colores: Abundancia= -2 (verde), pasando por 0 (blanco), hasta +2 (naranja).

En la comparación VAB-AAT vs. VAB-C, se encontraron 29 metabolitos alterados: 13 aumentados en la condición patológica, principalmente lisoglicerofosfolípidos (LPCs y LPEs) y 16 disminuidos, incluyendo también los lisoglicerofosfolípidos (LPAs) (Figura 32).

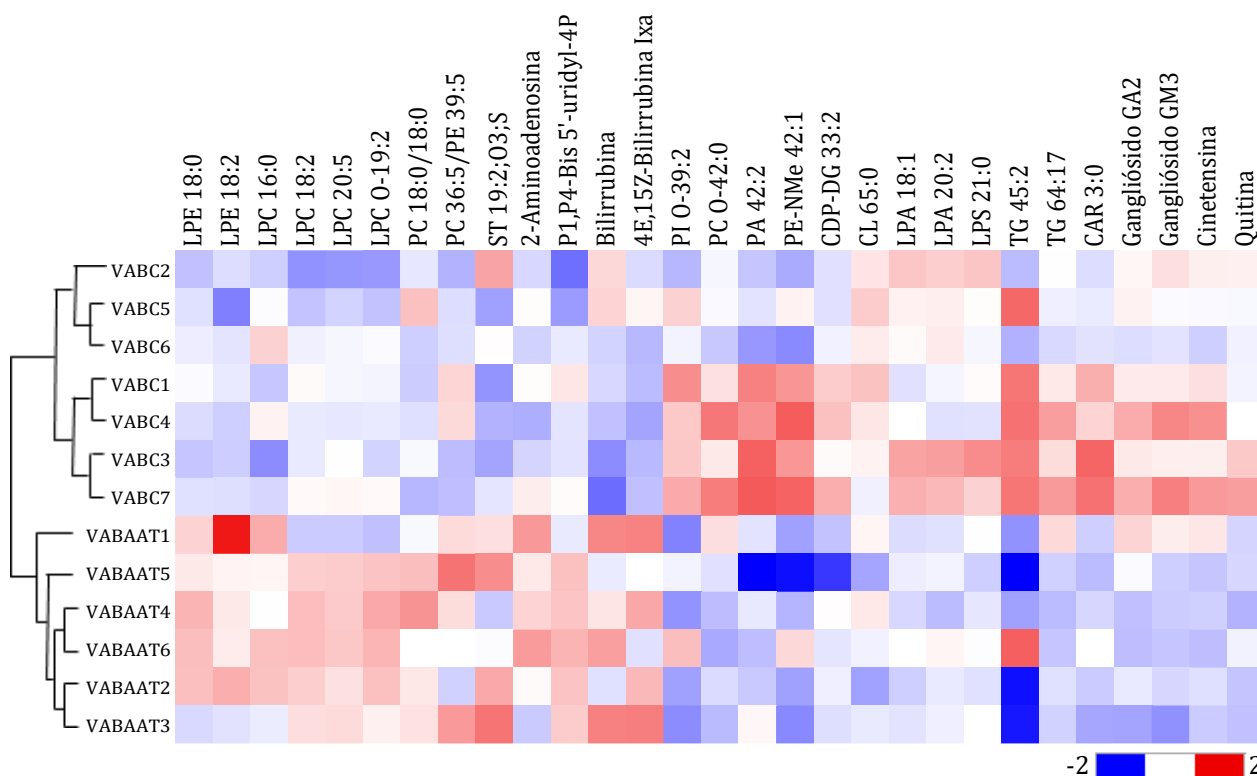


Figura 32. Los lisoglicerofosfolípidos son metabolitos diferenciales en el aneurisma de VAB. Mapa de calor de los metabolitos significativamente alterados (valor p corregido $\leq 0,05$) en la comparación VAB-AAT frente a VAB-C. Escala de colores: Abundancia = -2 (azul), pasando por 0 (blanco), hasta +2 (rojo).

Aquellos metabolitos alterados de forma significativa, con p valor corregido por FDR, identificados por MS/MS y con patrón comercial disponible, se estudiaron en detalle, correspondiendo mayormente a carnitinas y lisoglicerofosfolípidos (Figura 33).

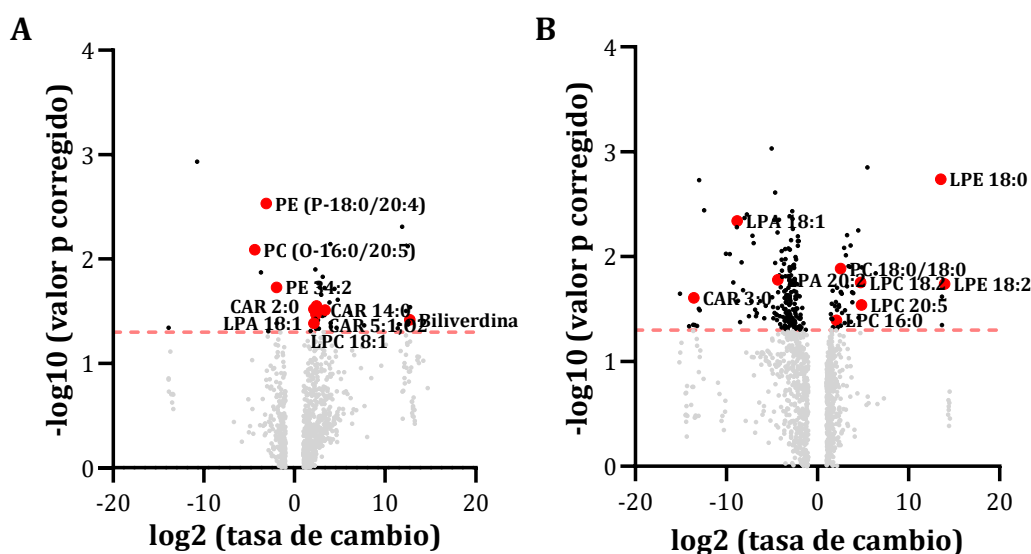


Figura 33. Alteraciones de carnitinas y lisoglicerofosfolípidos como huella metabólica del AAT asociado a VAT y VAB, respectivamente. A. Gráfico de volcán de los metabolitos identificados por MS/MS en la comparación VAT-AAT vs. VAT-C. B. Gráfico de volcán de los metabolitos identificados por MS/MS en la comparación VAB-AAT vs. VAB-C.

Los niveles de acilcarnitinas estaban significativamente más altos en el grupo VAT-AAT que en el grupo VAT-C. Concretamente, se encontraron aumentadas las siguientes especies: acetilcarnitina (CAR 2:0), glutarilcarnitina (CAR 5:1;O2) y miristoilcarnitina (CAR 14:0) (Figura 34A). En pacientes VAB-AAT, se encontraron significativamente aumentados los lisoglicerofosfolípidos LPE 18:0 y LPE 18:2 (Figura 34B) y LPC 16:0, LPC 18:2 y LPC 20:5 (Figura 34C) respecto al grupo VAB-C, mientras que LPA 18:1 y LPA 20:2 se encontraron significativamente más bajos en pacientes con dilatación aórtica y VAB (Figura 34D).

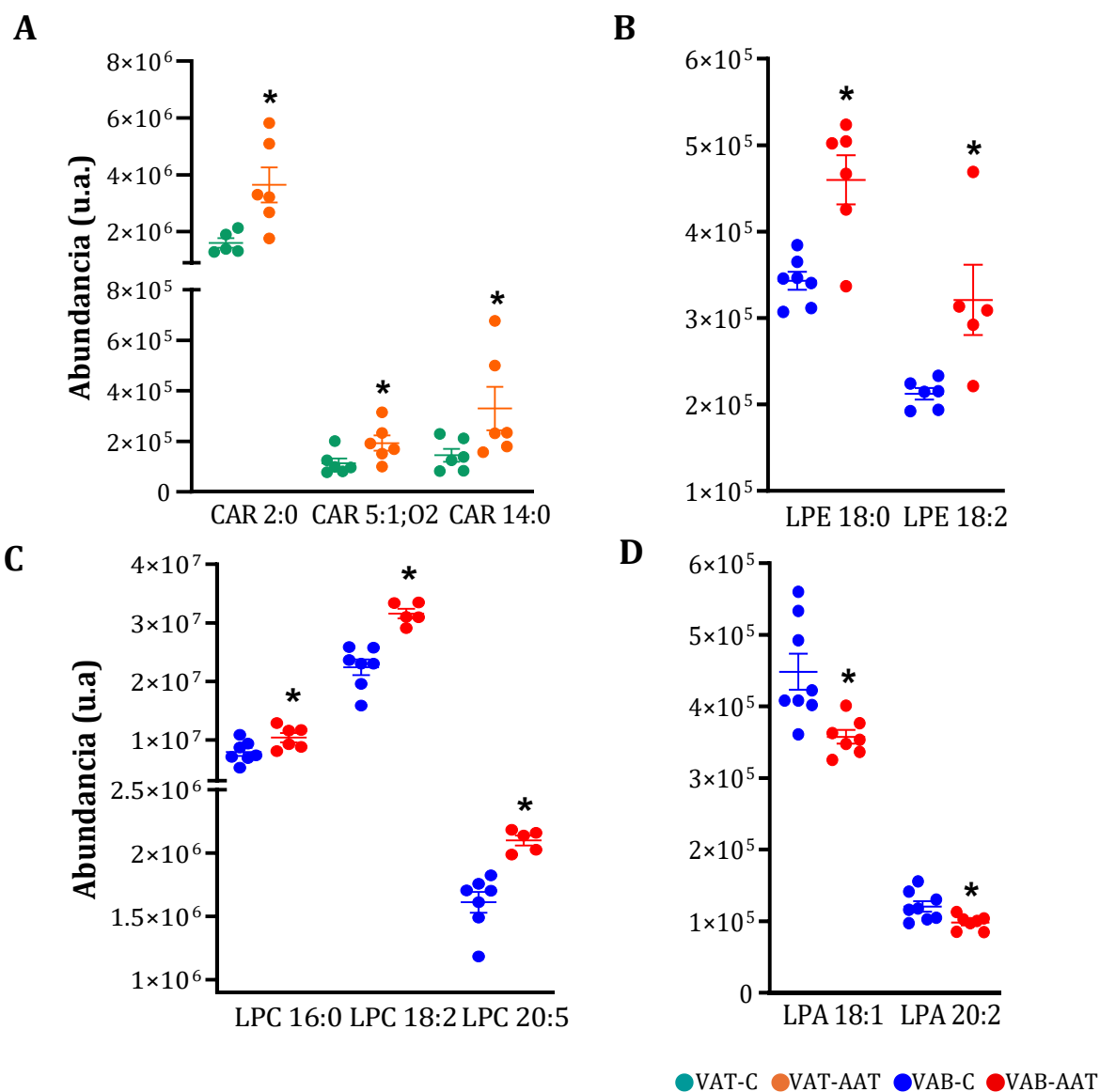


Figura 34. Las carnitinas están aumentadas en VAT-AAT y los lisoglicerofosfolípidos alterados en VAB-AAT. A. Abundancia de acilcarnitinas en el AAT asociado a VAT. **B.** Abundancia de LPEs en el AAT asociado a VAB. **C.** Abundancia de LPCs en el AAT asociado a VAB. **D.** Abundancia de LPAs en el AAT asociado a VAB. * Valor $p \leq 0,05$.

Estos cambios se confirmaron mediante espectrometría de masas dirigida en dos cohortes independientes de pacientes, una para cada tipo de AAT. De esta manera, se confirmó que la CAR 2:0 ($p = 0,0261$), la CAR 5:1;O2 ($p = 0,0114$) y la CAR 14:0 ($p = 0,0033$) estaban más

elevadas en el grupo VAT-AAT que en el grupo VAT-C, sin cambios en los pacientes con VAB (Figura 35A). También se confirmó que el LPC 16:0 ($p = 0,0321$) y el LPE 18:0 ($p = 0,0260$) se encontraban más elevados en el grupo VAB-AAT que en el grupo VAB-C, sin cambios en los pacientes con VAT (Figura 35B).

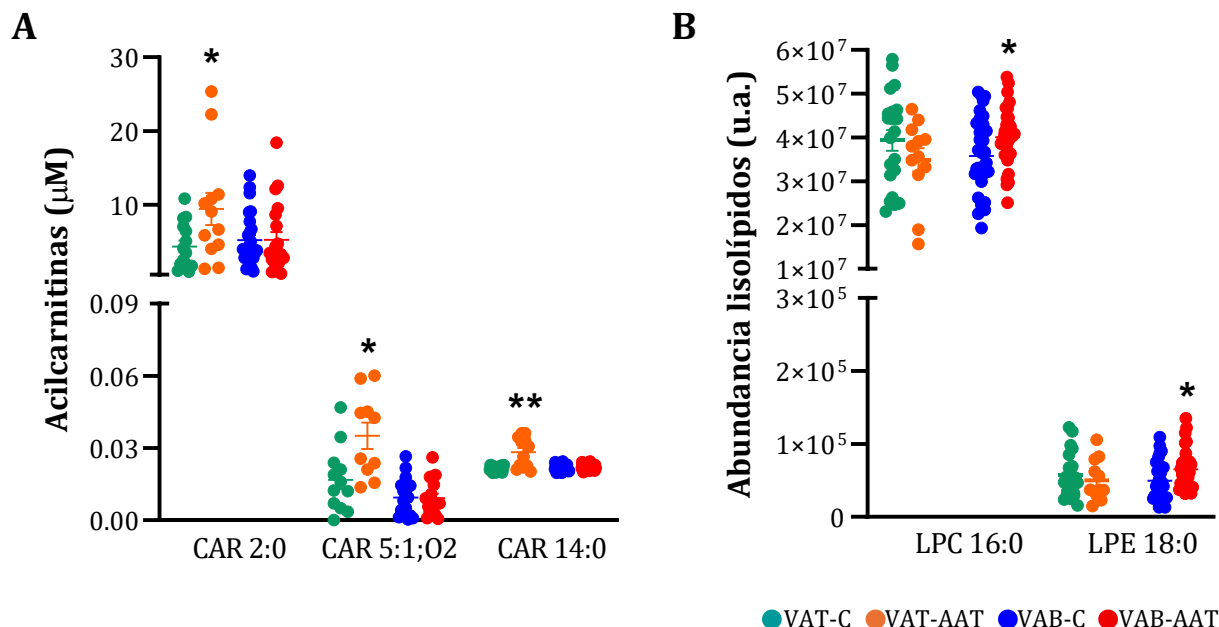


Figura 35. Las carnitinas CAR 2:0, CAR 5:1;O2 y CAR 14:0 están aumentadas en VAT-AAT. La LPC 16:0 y la LPE 18:0 lo están en el aneurisma de VAB. A. Concentración de acilcarnitinas en el plasma de una cohorte independiente mediante SRM-LC-MS/MS. **B.** Abundancia de lisoglicerofosfolípidos analizados en el plasma de una cohorte independiente mediante SRM-LC-MS/MS. En ambos casos se confirman los datos de metabolómica no dirigida. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$.

Al evaluar la asociación de estos metabolitos con las variables clínicas confusoras, no se encontró significación en ninguno de los casos.

2. Los marcadores plasmáticos del AAT asociado a VAB y VAT tienen capacidad diagnóstica

Con el objetivo de proponer un panel molecular diagnóstico del AAT para cada tipo valvular, llevamos a cabo un análisis de curvas ROC de los biomarcadores plasmáticos identificados en el AAT asociado a VAT y VAB, evaluando así su sensibilidad y especificidad (Tabla 11). Adicionalmente, estudiamos la correlación de sus niveles plasmáticos con la dilatación aórtica.

Tabla 11. Evaluación diagnóstica de los marcadores plasmáticos, incluyendo el análisis de curvas ROC y la correlación de la concentración metabólica con el diámetro aórtico.

		Metabolito/Panel	ROC	Correlación	
			AUC (95% CI)	R	Valor p
VAT	Metabolito	CAR 2:0	0,717 (0,508-0,926)	0,240	0,187
		CAR 5:1;O2	0,792 (0,600-0,983)	0,388	0,074
		CAR 14:0	0,833 (0,659-1,000)	0,458	0,0074
	Panel	CAR 2:0+ CAR 14:0	0,708 (0,496-0,921)	-	-
		CAR 2:0 + CAR 5:1;O2	0,750(0,521-0,979)	-	-
		CAR 5:1;O2+ CAR 14:0	0,880 (0,727-1,000)	-	-
		CAR 2:0 + CAR 5:1;O2 + CAR 14:0	0,744 (0,512-0,977)	-	-
VAB	Metabolito	LPE 18:0	0,671 (0,534-0,808)	0,227	0,0785
		LPC 16:0	0,635 (0,496-0,775)	0,228	0,0722
	Panel	LPE 18:0 + LPC 16:0	0,647 (0,507-0,788)	-	-

En el caso del AAT asociado a VAT, la CAR 5:1;O2 (AUC = 0,792) y la CAR 14:0 (AUC = 0,833) mostraron el mejor rendimiento a la hora de distinguir entre pacientes C y AAT. La combinación de estos dos biomarcadores mejoró ligeramente la clasificación (AUC = 0,880). En el caso de la CAR 14:0, correlacionó positivamente con el diámetro aórtico (p = 0,0074), sirviendo, por lo tanto, como marcador de progresión en un fluido accesible como el plasma (Figura 36).

Los lisoglicerofosfolípidos asociados al aneurisma con VAB mostraron un rendimiento diagnóstico moderado como biomarcadores de VAB-AAT (AUC < 0,7) (Tabla 11). No se observó ninguna correlación significativa con el diámetro aórtico.

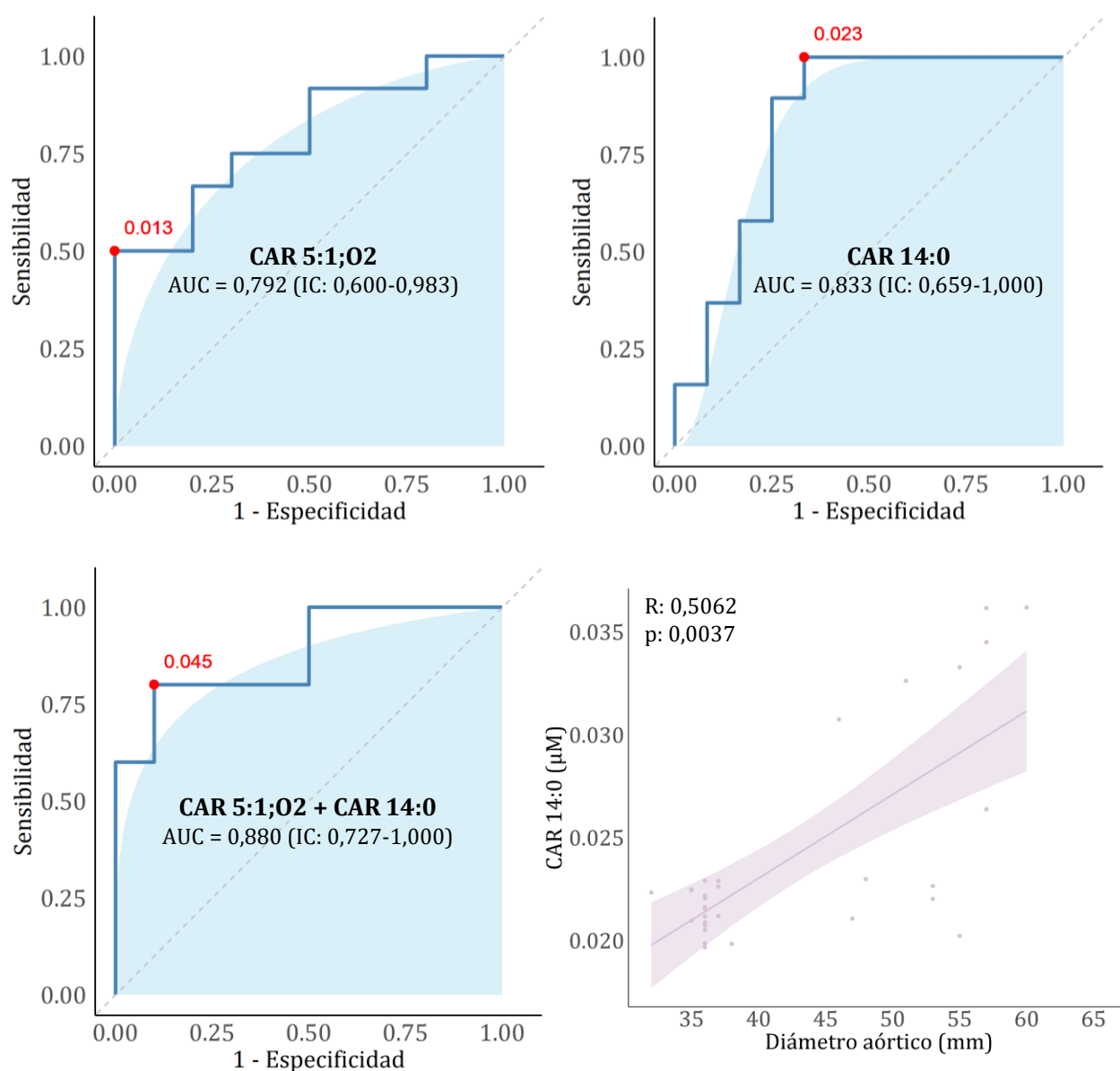


Figura 36. La carnitina CAR 14:0 es un marcador con potencial diagnóstico y de progresión del aneurisma en pacientes con VAT. Se incluyen el análisis de la curva ROC de ambas carnitinas de manera individual y combinada y la correlación de la concentración de la CAR 14:0 con el diámetro aórtico.

3. El metabolismo de la glucosa es distinto en pacientes con AAT asociado a VAT y VAB

Las alteraciones metabólicas identificadas en el plasma sugieren patrones distintos de utilización de la glucosa en los aneurismas asociados a las diferentes válvulas. Para comprobar este posible uso diferencial de la glucosa, evaluamos el metabolismo del glucógeno, la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato (PPP) y la ruta biosintética de las hexosaminas (HBP) en tejido aórtico de pacientes con AAT y C y ambos tipos valvulares.

3.1. Metabolismo del glucógeno

El glucógeno sirve como fuente de glucosa y, a la vez, como almacenamiento de la misma, adaptando su metabolismo a las diferentes necesidades. Para explorar el sentido del metabolismo del glucógeno, examinamos la expresión génica de tres de sus enzimas: *PYGM*, *UGP2* y *GYS1* (Figura 37), así como el contenido intracelular de glucógeno (Figura 38).

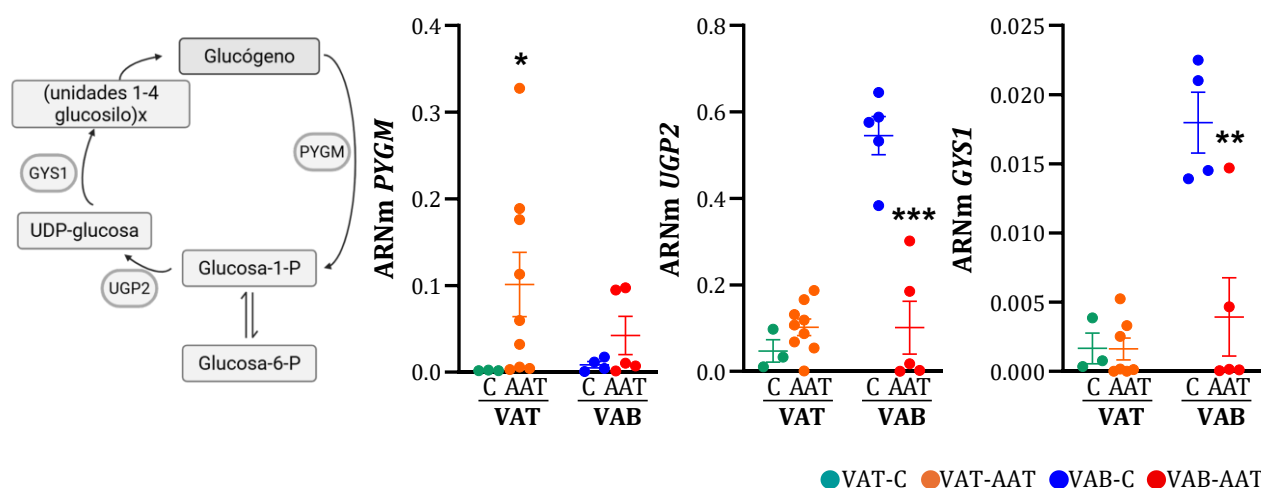


Figura 37. Metabolismo del glucógeno. Expresión génica de las enzimas *PYGM*, *UGP2* y *GYS1* en el AAT asociado a VAT y VAB. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$; *** valor $p \leq 0,001$.

La expresión de *PYGM* fue significativamente mayor en el grupo VAT-AAT que en el grupo VAT-C ($p = 0,0283$), lo que sugiere un aumento de la degradación del glucógeno (glucogenólisis) para proporcionar intermediarios glucolíticos. Por el contrario, la expresión de *UGP2* ($p = 0,0004$) y *GYS1* ($p = 0,0072$) fue menor en el grupo VAB-AAT que en el grupo VAB-C. Esto, acompañado de menores depósitos de glucógeno ($p = 0,0159$), sugiere un uso activo de la glucosa y no un almacenamiento en forma de glucógeno en pacientes con AAT y VAB.

Ninguna de las enzimas o productos finales mostró asociación con las variables clínicas o la medicación de los pacientes.

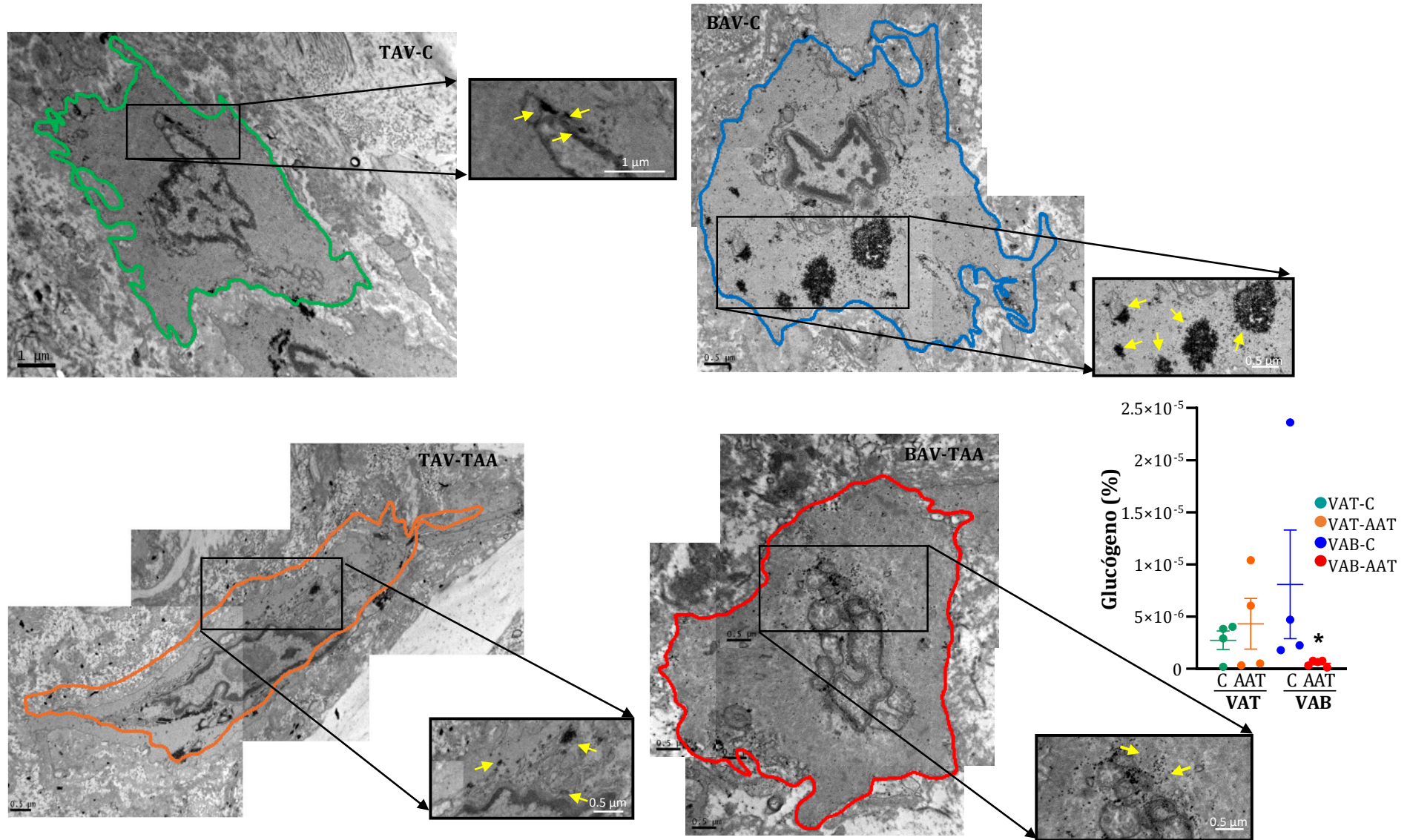


Figura 38. Depósitos de glucógeno dentro de las células del tejido aórtico. Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión del contenido de glucógeno intracelular (flechas amarillas) dentro de las CMLVs (contorno celular marcado) de los cuatro grupos clínicos. Evaluación *in-situ* por comparación de pacientes con y sin dilatación asociados a VAT y VAB. *Valor $p \leq 0,05$.

3.2. Glucólisis

La glucólisis descompone la glucosa en piruvato o lactato a través de diferentes intermediarios glucolíticos que se utilizan como bloques de construcción para la producción de biomasa. Para investigar la vía glucolítica, medimos la actividad de las enzimas irreversibles HK, PFK y PK. Además, evaluamos la actividad de la LDH en dirección lactato a piruvato y la concentración tisular del lactato (Figura 39).

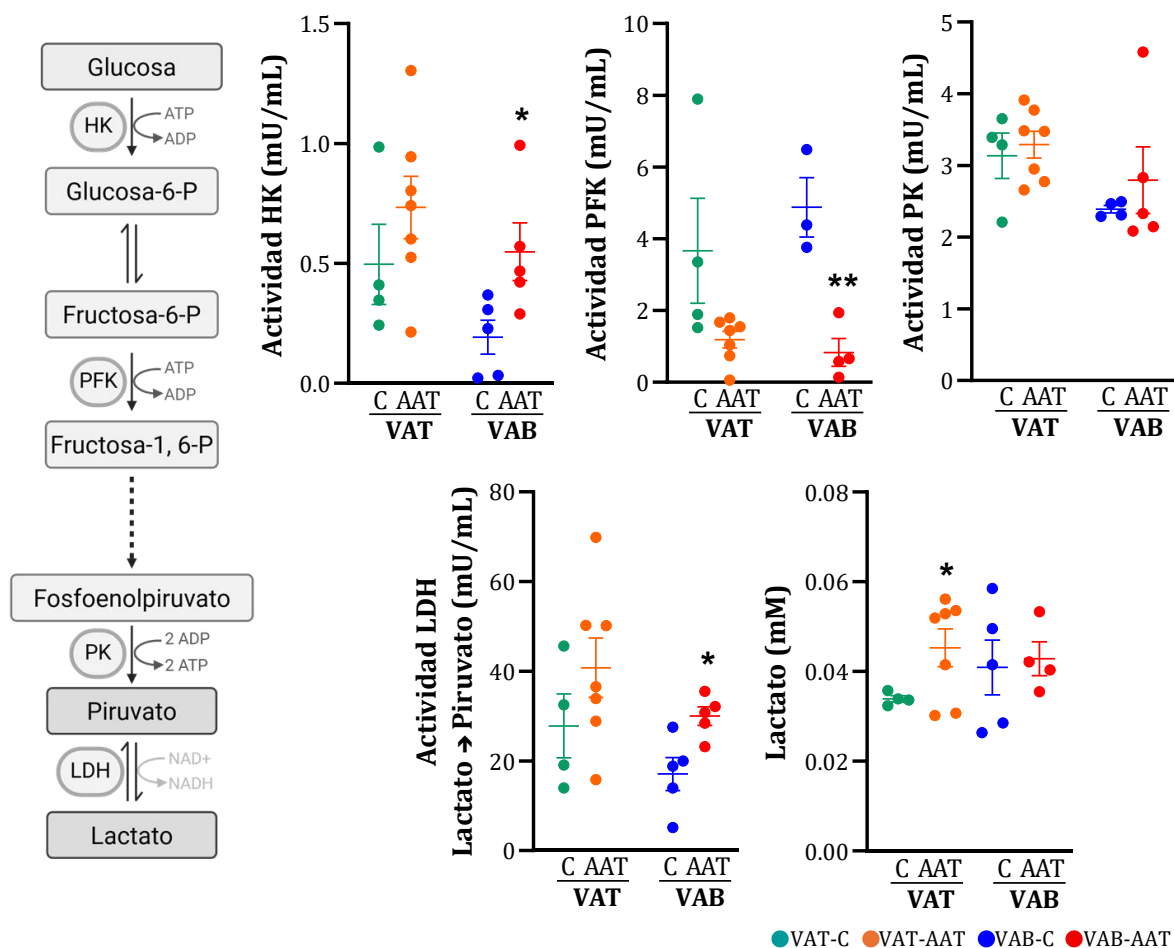


Figura 39. Glucólisis. Actividad enzimática de las enzimas HK, PFK, PK y LDH (en dirección: lactato a piruvato) y concentración aórtica de lactato en el AAT asociado a VAT y VAB. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$.

No encontramos cambios significativos en la actividad enzimática en las muestras aórticas de pacientes con VAT. Sin embargo, observamos que los niveles de lactato eran más elevados en el grupo VAT-TAA que en VAT-C ($p = 0,0355$). Por el contrario, la actividad de la HK fue mayor en el grupo VAB-AAT que en el grupo VAB-C ($p = 0,0334$), lo que favorece la producción de glucosa-6-fosfato, mientras que la actividad de la PFK fue menor ($p = 0,0045$), lo que limita la conversión de fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bifosfato, indicando el uso de la glucosa, pero no hacia el final de la glucólisis. Además, investigamos la conversión de lactato en piruvato y descubrimos que la actividad de la LDH era mayor en el grupo VAB-AAT vs. VAB-C ($p = 0,0157$).

3.3. Ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato es una vía metabólica estrechamente relacionada con la glucólisis que utiliza la glucosa para generar ribosa 5-fosfato para la síntesis de nucleótidos y NADPH. El paso inicial y limitante de esta vía, la conversión de glucosa-6-fosfato en 6-fosfogluconolactona, es catalizado por la enzima G6PD, que utiliza NADP⁺ como cofactor y produce NADPH (Figura 40). Los ensayos de actividad realizados de esta enzima y la cuantificación del ratio NADP⁺/NADPH no mostraron cambios significativos en la actividad enzimática de la G6PD, pero sí un aumento del ratio NADP⁺/NADPH en pacientes VAT-AAT vs. VAT-C ($p = 0,0317$). Esto concuerda con una reducción del flujo de la glucosa hacia la PPP en pacientes con AAT y VAT. Por el contrario, la actividad de la G6PD fue significativamente mayor en el grupo VAB-AAT que en el grupo VAB-C ($p = 0,0147$), acompañada de una disminución en la relación NADP⁺/NADPH ($p = 0,0040$), lo que sugiere una mayor actividad de la PPP en los pacientes con AAT y VAB.

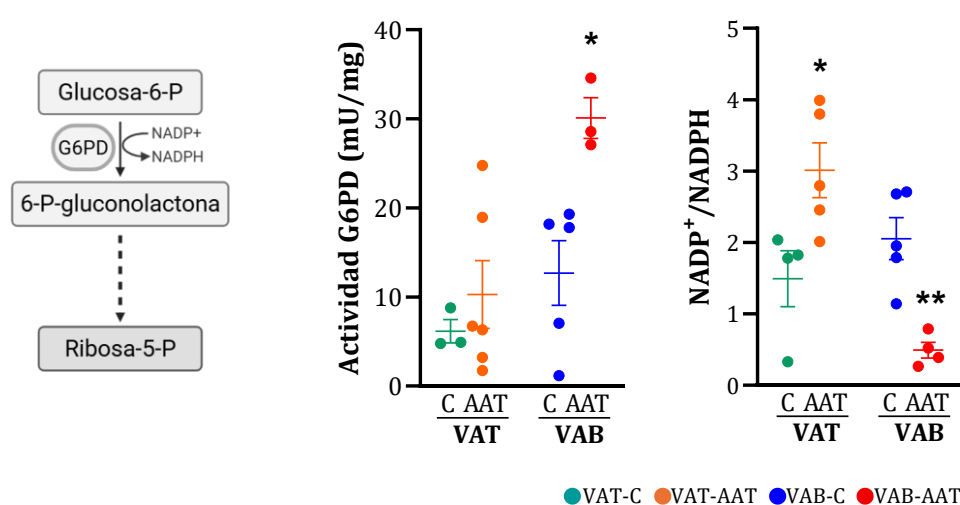


Figura 40. Ruta de las pentosas fosfato. Actividad enzimática de la enzima G6PD y niveles del ratio NADP⁺/NADPH en el AAT asociado a VAT y VAB. * Valor $p \leq 0,05$; ** valor $p \leq 0,01$.

3.4. Ruta biosintética de las hexosaminas

La glucosa-6-fosfato puede derivar en el intermedio metabólico fructosa-6-fosfato que, a su vez, puede metabolizarse por dos vías principales dentro de la HBP. La primera vía conduce a la producción de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (vía de novo), que se utiliza para la glicosilación y la síntesis de glicoproteínas, gangliósidos y GAGs. Alternativamente, la fructosa-6-fosfato puede interactuar con el metabolismo de la glutamina para generar NADPH y responder a las demandas biosintéticas. La enzima inicial y limitante de la vía de novo de las hexosaminas es la GFPT y el paso final de la vía, la conversión de N-acetil-glucosamina 1-fosfato en UDP-GlcNAc para la síntesis de GAGs, está catalizado por la enzima UAP1 (Figura 41). La expresión génica tanto de *GFPT2* como de *UAP1* fue significativamente mayor en el grupo VAT-AAT que en el grupo VAT-C ($p = 0,0487$ y $p = 0,0086$, respectivamente) (Figura 41A). El análisis del producto final, los GAGs, mostró además una acumulación en la capa media de las aortas en el grupo VAT-AAT vs. VAT-C ($p = 0,0026$) (Figura 41B). En los pacientes con VAB, la expresión de *GFPT2* y *UAP1* también fue significativamente mayor en el grupo VAB-AAT que en el grupo VAB-C ($p = 0,0082$ y $p = 0,0231$, respectivamente) (Figura 41A), pero no se encontró un aumento significativo en la acumulación de GAGs en la pared aórtica de los pacientes con AAT

(Figura 41B). Esto probablemente sea debido a la presencia de depósitos de GAGs en los tejidos control de este grupo de pacientes con VAB. Esto, junto al aumento de NADPH observado (disminución del ratio $NADP^+/NADPH$) en los pacientes con AAT y VAB, apunta a un papel de la HBP y al metabolismo de la glutamina en estos pacientes.

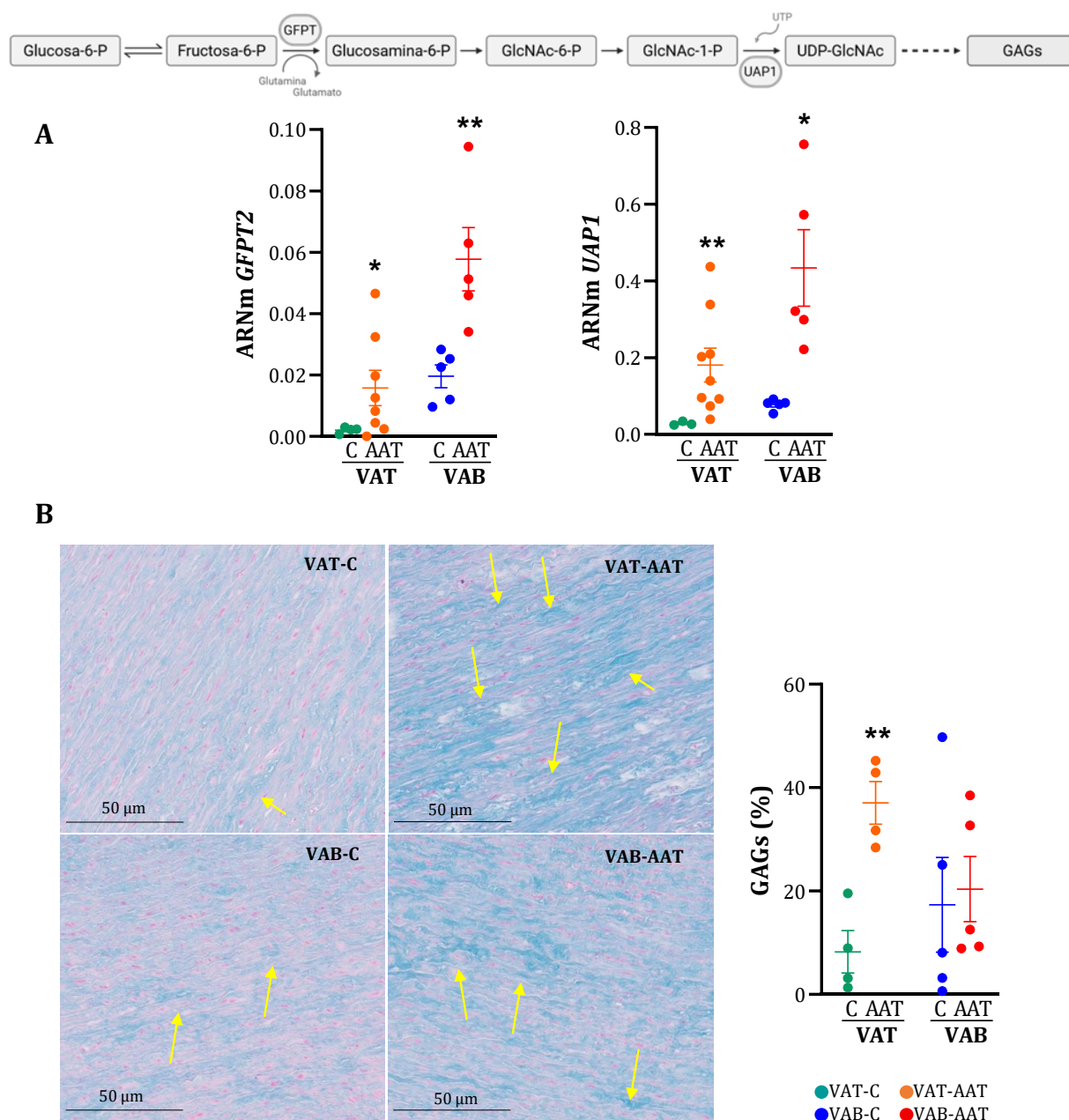


Figura 41. Ruta biosintética de las hexosaminas. Expresión génica de las enzimas *GFPT2* y *UAP1* y depósitos de GAGs y sus niveles en tejidos aórticos en el AAT asociado a VAT y VAB. * Valor $p \leq 0,05$; ** Valor $p \leq 0,01$.

En general, los datos enzimáticos y de productos finales indican que la presencia de VAB, independientemente de la dilatación aórtica, puede promover la actividad de la HBP y la consiguiente acumulación de GAGs. Por el contrario, el desarrollo de un aneurisma aórtico en pacientes con VAT parece favorecer dicha acumulación de GAGs.

En ningún caso, encontramos asociación ni de la expresión de las enzimas, ni de su actividad ni de la concentración de sus productos finales con las variables clínicas ni la medicación de los pacientes.

DISCUSIÓN

1. Las CMLVs en el desarrollo del AAT asociado a VAT y VAB

El estudio molecular de las CMLVs, en cada una de las formas de AAT, la asociada a VAT y la asociada a VAB, es esencial para descubrir las diferencias subyacentes en cada forma de AAT y determinar los procesos que tienen lugar en la aorta asociada a VAB que la hacen ser más susceptible al desarrollo de AAT. Este estudio es clave para identificar posibles dianas terapéuticas que puedan conducir al desarrollo de fármacos como alternativa a la cirugía profiláctica. Además, los estudios traslacionales en plasma reflejan cambios tisulares y pueden dar lugar a posibles marcadores diagnósticos que permitan llevar a cabo un seguimiento preventivo. Los resultados de esta tesis evidencian diferencias en el AAT en función del tipo valvular del paciente y justifican un diagnóstico y un tratamiento diferencial del AAT según esté asociado a VAT o VAB.

1.1. Efecto del flujo diferencial en la aorta de pacientes con AAT asociado a VAB

El tipo de válvula aórtica modula el patrón de flujo sanguíneo en la aorta ascendente, lo que determina un estrés hemodinámico diferente en los pacientes con VAB. El patrón de flujo que tiene lugar en estos pacientes genera una tensión de cizallamiento anómala; una característica distintiva de los pacientes con VAB frente a VAT¹³⁰. En una comparativa de aortas con VAB (biopsias de íntima y media) y VAT, independientemente de la dilatación, se identificaron alteraciones en la expresión de 44 genes asociados al flujo, entre los que se encuentran *CEBPD* y *PKD2*¹³¹. *PKD2* es un sensor de la tensión de cizallamiento cuya expresión diferencial en la aorta de VAB se había atribuido hipotéticamente a las CMLVs en dicha comparación. A pesar de que la expresión de ARNm no tiene por qué correlacionarse con la expresión proteica, nuestros datos confirman, por un lado, una variación significativa de *PKD2* a nivel proteico en los pacientes con AAT y VAB y, por otro, el papel de las CMLVs en esta alteración proteica (Tabla S1). Del mismo modo, asociado a las CMLVs y en relación con el estrés mecánico, se ha visto que este induce estrés del RE, el cual participa en la aparición y formación del AAT¹³². En esta tesis, se ha observado un aumento del miembro 3 de la subfamilia C de los homólogos de *DnaJ* (*DNAJC3*), marcador de estrés del RE, así como un aumento de la abundancia de proteínas del RE en las CMLVs de pacientes con AAT y VAB, de acuerdo con un aumento de los niveles de estrés del RE (Tabla S6). Esto apunta a que el estrés del RE desempeña un papel clave en el AAT asociado a VAB.

Sin embargo, y a pesar de que nuestro análisis celular detectó 20 de los 44 genes asociados al flujo reportados en el estudio comparativo descrito anteriormente, la expresión proteica de los 24 genes restantes en las CMLVs no resultó variada significativamente en función del tipo valvular. Esto puede deberse al propio mecanismo de traducción, pero también puede evidenciar que no todas las fuerzas mecánicas que actúan sobre el endotelio afectan a la media y a su principal componente celular y que existen alteraciones moleculares en el vaso que no pueden atribuirse a las fuerzas mecánicas.

1.2. Fenotipo de estrés, homeostasis proteica y señalización celular en el AAT asociado a VAB

En esta tesis, hemos observado una respuesta al estrés diferente en pacientes con AAT asociado a VAB respecto al asociado a VAT. Nuestros datos muestran que las CMLVs de pacientes con AAT y VAB presentan niveles elevados de proteínas de respuesta al estrés relacionadas principalmente con la homeostasis proteica. Este es el caso de las proteínas de choque térmico

HSP70, HSPA1B y HSPA1L, que garantizan el correcto plegamiento de las proteínas y la eliminación de las proteínas defectuosas. Además, la combinación de HSPB8 y su chaperona DNAJB14 también resultó aumentada en pacientes con AAT y VAB. Estas dos proteínas trabajan juntas para promover el plegamiento de proteínas, previniendo su agregación y degradando las proteínas mal plegadas. En conjunto, los pacientes VAB-AAT parecen estar regulando la homeostasis proteica a través de un mecanismo que puede estar mediado por las CMLVs. En esa misma línea, un estudio centrado en amiloidosis en el que se comparó tejido aórtico aneurismático de pacientes con VAT y VAB concluyó que los pacientes con VAB no presentaban agregación proteica significativa, mientras que los pacientes VAT-AAT sí¹³³. Esto confirma un mecanismo diferencial en ambas formas de AAT.

El plegamiento proteico se relaciona directamente con el estrés oxidativo, que, a su vez, vimos aumentado en pacientes con AAT y VAB. En ellos observamos una reducción significativa de la enzima catalasa (CAT). La catalasa desempeña un papel clave en la protección de las células frente al daño mediado por ROS: el aumento de la expresión de catalasa en las CMLVs protege frente al AAA¹³⁴, mientras que su deficiencia está relacionada con el estrés oxidativo y las enfermedades asociadas al envejecimiento¹³⁵. Es por ello por lo que la disminución registrada en los pacientes VAB-AAT sugiere un defecto de las CMLVs en la neutralización de ROS. El aumento del estrés oxidativo se relaciona con la activación de una señalización celular en la que las proteínas G desempeñan un papel clave^{136,137}. Tanto las GTPasas pequeñas como las proteínas G heterodiméricas mostraron una mayor abundancia en las CMLVs de los pacientes VAB-AAT frente a los VAT-AAT. Por un lado, el incremento de las proteínas G heterodiméricas (GNB1, GNB4, GNAI1 y GNA12) sugiere un desequilibrio en la actividad GTPasa. Por otro, detectamos un aumento general de los miembros Ras, Rho, Rap y Rab de la superfamilia Ras de proteínas G pequeñas. La sobreactivación de las GTPasas de la familia Ras se ha relacionado previamente con enfermedades del sistema cardiovascular y, en particular, las Rho GTPasas (RAC1, RAC2 y RAC3) se relacionan con la producción de ROS durante la formación de aneurismas aórticos, mediando en la migración y acumulación de CMLVs en la capa media y adventicia de la pared arterial^{138,139}.

1.3. Estrés oxidativo, daño en el ADN, arresto del ciclo y muerte celular en el AAT asociado a VAB

El estrés oxidativo procedente de los procesos de homeostasis proteica y las alteraciones en la capacidad antioxidante, así como resultados anteriores que muestran un aumento del estrés oxidativo en VAB-AAT¹⁴⁰, se vieron confirmados al estudiar globalmente las alteraciones proteicas de las CMLVs relacionadas con estrés oxidativo, tanto por las variaciones proteicas individuales como por las respuestas coordinadas identificadas.

El RE, junto con la mitocondria, son los dos mayores productores de ROS en la célula. Las proteínas ERP29, DNJC3 y DNJB6 están relacionadas con la homeostasis proteica y la respuesta al estrés del RE. Sin embargo, un aumento en estas proteínas, como observamos en nuestros resultados en las CMLVs, puede finalmente conllevar a la generación de estrés oxidativo y apoptosis celular¹⁴¹. La proteína BAX y su inhibidor (BI1) juegan un papel esencial en el control de los niveles de ROS y la disfunción mitocondrial¹⁴². El aumento de la proteína BAX y la disminución de BI1 que observamos en nuestros resultados pueden relacionarse con una acumulación de ROS en las CMLVs de VAB-AAT. En línea con los datos obtenidos en esta tesis, una mayor expresión de BAX se ha observado en CMLVs de pacientes con AAT en comparación con pacientes control, lo que se asocia con un aumento de apoptosis de estas células¹⁴³. Esto

indica un posible papel de BAX/BI1 en el remodelado vascular y en la progresión del AAT en estos pacientes. La disminución de la catalasa mencionada anteriormente, junto con el aumento de los sistemas antioxidantes y de detoxificación (TRXR1, PRDX5, GSTM2, GSTO1, FRIH, FRIL, COMT y APOD), es un indicador de altos niveles de estrés oxidativo en las CMLVs de los pacientes VAB-AAT. Además, también detectamos un aumento de las proteínas RAC1, RAC2 y RAC3, las cuales regulan la activación de la NADPH oxidasa, la principal fuente de ROS en la membrana plasmática¹⁴⁴. Un aumento en la proteína RAC1 exacerba la generación de ROS, induce estrés en el RE y da lugar a un remodelado patológico del miocardio vía NADPH oxidasa¹⁴⁵, lo que está en consonancia con nuestros resultados. La señalización de las GTPasas pequeñas RHOQ, RAP1A, RAP1B y HRAS está modulada por ROS. Estas proteínas juegan un papel doble: su activación está modulada por ROS y a la vez activan vías que generan estrés oxidativo mediante la NADPH oxidasa¹⁴⁶. El incremento aquí observado de estas proteínas en las CMLVs indica nuevamente unos niveles de ROS elevados en los pacientes VAB-AAT.

La evaluación de la extensión del estrés oxidativo al ADN, extraído de las CMLVs y en la orina, evidenció que el daño oxidativo en el ADN era mayor en los pacientes con AAT y VAB. Este daño activa una respuesta en las células, lo que parece ser uno de los mecanismos clave en estos pacientes. En concreto, observamos que las CMLVs se detienen en la fase S del ciclo celular, la cual está asociada a la replicación del ADN, en un proceso donde las histonas de esta fase son esenciales. En este contexto, encontramos una disminución generalizada de histonas y proteínas relacionadas. Una disminución en la disponibilidad de histonas y proteínas relacionadas con ellas compromete la replicación del ADN y lo expone a daños¹⁴⁷. En este sentido, observamos que marcadores de progresión del ciclo celular también están disminuidos en VAB. Concretamente, observamos disminuidos ANAPC1 y PDGR1. ANAPC1 es la subunidad más grande de la E3 ubiquitina ligasa APC y orquesta la progresión del ciclo celular hacia las fases S y G2-M¹⁴⁸. PDGR1 también está asociada con el daño al ADN y el progreso celular: estudios en líneas celulares tumorales destacan que su silenciamiento promueve la muerte celular programada y la detención del ciclo¹⁴⁹. También observamos una mayor abundancia de proteínas asociadas con la muerte celular en las CMLVs de pacientes con AAT y VAB. HSPB1, que actúa junto con HSPB8, y CRYAB contribuyen a la regulación de la muerte celular; HSPA12A interviene en la senescencia celular; y DNAJC3 y HSPA1B participan en la apoptosis. Esto concuerda con la disminución del número de células descrita en estos pacientes¹⁵⁰ y con el aumento de la apoptosis inducida por daño que hemos evidenciado en nuestros estudios. Los resultados observados en esta tesis evidencian que la pérdida de CMLVs es más pronunciada en los pacientes con AAT y VAB con respecto a los pacientes con VAT, lo que probablemente favorezca una degradación más rápida de la aorta.

1.4. El plasma refleja las variaciones proteicas identificadas en las CMLVs y evidencia un diagnóstico diferencial de los pacientes con AAT

Nuestro análisis molecular de las CMLVs evidencia la existencia de diferentes mecanismos operantes en la dilatación de la aorta torácica en pacientes con VAT y VAB, al igual que las formas solubles de las proteínas de interés mostraron un reflejo de esos mecanismos en plasma. En concreto, hemos hallado un aumento de los niveles de BGN, C1QTNF5, CCDC80, FAP, LAMA2, SERPINE2 y THBS3 en las CMLVs y una disminución de sus concentraciones en el plasma de los pacientes con AAT y VAB vs. AAT y VAT. Cuando evaluamos la capacidad diagnóstica de estas proteínas en pacientes VAB-AAT y VAT-AAT, en comparación con sus respectivos controles, encontramos a la proteína FAP en pacientes VAT-AAT y a la proteína C1QTNF5 en pacientes

VAB-AAT como potenciales marcadores de diagnóstico. Además, sirven como marcadores de seguimiento, ya que su concentración correlaciona con el diámetro aórtico.

En los tejidos, un aumento de BGN actúa como señal de peligro de estrés¹⁵¹. En condiciones fisiológicas, BGN permanece en la matriz, pero en condiciones inflamatorias, se libera a la sangre¹⁵², de forma similar a CCDC80, que también aumenta su secreción en condiciones inflamatorias¹⁵³. Estos mayores niveles de las formas solubles de BGN y CCDC80 en el plasma de VAT-AAT apuntan a un mayor estado inflamatorio en el AAT asociado a VAT, en consonancia con análisis proteómicos previos en el tejido aórtico, que concluyen que los aneurismas de VAT están mediados por la inflamación¹⁵⁴.

La proteína FAP es un regulador negativo de la reparación cardíaca y su inhibición mejora dicha reparación. Tras una lesión cardíaca, se observa un aumento del nivel de FAP en las células cardíacas y una disminución de su concentración en el plasma¹⁵⁵; unos resultados similares a los nuestros en pacientes con AAT y VAB. Este aumento en las células y disminución en la sangre que observamos apunta a una pobre capacidad de reparación de la pared aórtica del VAB. La remodelación celular hiperplásica es una respuesta adaptativa al estrés de la pared y es una característica conocida de las arterias con VAB^{156,157}. En este contexto, LAMA2 se ha encontrado sobreexpresada en la hiperplasia y nuestros resultados van en la misma línea.

La evaluación en esta tesis del estrés al que están sometidas las CMLVs mostró una respuesta del RE al mismo. En esta línea, observamos un aumento de los niveles de FAP y THSB3 en las CMLVs. Por un lado, la expresión de FAP se ha asociado a la respuesta al estrés del RE¹⁵⁸ y, por otro lado, se ha observado que THSB3 aumenta en las enfermedades cardíacas en relación con el estrés del RE y con el objetivo de disminuir la acumulación de proteínas mal plegadas¹⁵⁹. En el plasma, la concentración de THSB3 está, por el contrario, disminuida en los pacientes con infarto agudo de miocardio. Esto es similar a lo que encontramos aquí para los pacientes VAB-AAT, lo que confirma el aumento del estrés y la desregulación de la homeostasis proteica. Además, SERPINE2 (también GDN o PN-1) tiene una función protectora para mantener o restaurar la homeostasis durante el daño o el estrés¹⁶⁰. En el desarrollo del aneurisma, se produce una remodelación intensa mediada por un desequilibrio a favor de la degradación proteolítica de la matriz extracelular¹⁶¹. Se ha demostrado que SERPINE2 está sobreexpresada en las CMLVs humanas de pacientes con AAT a través de su activación por reprogramación epigenética mantenida en las células. Esta sobreexpresión modula la actividad de las proteinasas, favoreciendo su acción crónica progresiva en un proceso relacionado en parte con cambios en la mecanotransducción¹⁶². En esta tesis encontramos SERPINE2 aumentada en las CMLVs y disminuida en el plasma en VAB-AAT, lo que podría estar relacionado con el marcado desequilibrio de proteínas G de las CMLVs encontrado y con la conocida retención de GAGs de SERPINE2 en la superficie celular, respectivamente¹⁶³.

Nuestro análisis de las CMLVs evidencia una alteración significativa del estrés oxidativo como rasgo distintivo del AAT en pacientes con VAB. En particular, en estos pacientes observamos un aumento del estrés oxidativo, del daño asociado al ADN y de la respuesta al daño del ADN con detención del ciclo celular. Estos procesos de reparación del daño en el ADN son dependientes de ATP y en condiciones de bajos niveles celulares de ATP, la vía de señalización AMPK α se activa por una sobreexpresión de C1QTNF5, tal y como observamos en las CMLVs de pacientes con AAT y VAB, como mecanismo compensatorio destinado a aumentar el nivel de ATP¹⁶⁴. En plasma, encontramos niveles reducidos de C1QTNF5, lo que muestra de nuevo una tendencia contraria a la observada en las CMLVs. Investigaciones previas muestran tendencias

plasmáticas diferentes en distintas cohortes cardiovasculares^{165,166}, lo que sugiere una acción local primaria.

1.5. Perspectivas clínicas de los pacientes con VAB

Los resultados presentados aquí muestran cómo la fisiopatología del AAT difiere según el tipo de válvula aórtica, revelando mecanismos y proteínas que podrían constituir la base de un manejo del paciente diferencial para estas entidades clínicas y destacando, en particular, la necesidad de tratamientos específicos para pacientes con VAT o VAB (Figura 42).

Los cambios en la homeostasis de las proteínas, la detención del ciclo celular y la disponibilidad limitada de ATP vemos que son más prominentes en los pacientes VAB-AAT y son procesos que han sido relacionados con el envejecimiento^{167,168}. Los grupos de pacientes incluidos no muestran una diferencia significativa en la edad, por lo que estos hallazgos apuntan a una pared aórtica prematuramente envejecida en los pacientes con VAB. Nuestros resultados complementan investigaciones previas que hallaron telómeros acortados en las CMLVs de sujetos VAB-AAT, concluyendo, al igual que nosotros, que el envejecimiento es un factor relevante en los pacientes con AAT y VAB^{140,169}. Un estudio reciente demostró que el envejecimiento modula el proteoma aórtico de los AAT y sugirió que el tratamiento de estos pacientes debería modificarse en función de la edad¹⁷⁰. Nuestros resultados pueden hacer extensiva esta recomendación a los pacientes con VAB, los cuales deberían ser tratados como si tuvieran una edad biológica mayor a la de su edad cronológica.

Los mecanismos diferenciales evidenciados en nuestros estudios apuntan a la necesidad de terapias específicas para ambas formas de AAT. En la actualidad, no existen tratamientos establecidos para frenar la dilatación aórtica ni para prevenir la disección; los tratamientos farmacológicos de primera línea no están definidos y los pacientes con VAB se deberían considerar un grupo clínico con necesidades terapéuticas particulares. Debido a su capacidad para disminuir la fuerza hemodinámica a través de las unidades contráctiles de elastina, los betabloqueantes son la recomendación terapéutica tradicional para frenar la dilatación y reducir el riesgo de disección. Los betabloqueantes y los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina también podrían ayudar a reducir el daño del ADN inducido por ROS¹⁷¹, por lo que estarían especialmente indicados para los pacientes con AAT y VAB, de acuerdo con nuestros resultados. Se ha descrito que las estatinas inhiben el AAT y la disección a través de diferentes mecanismos^{21,172}. Concretamente, las estatinas pueden aumentar la regulación de pequeñas proteínas G específicas que protegen contra el cambio de fenotipo¹⁰⁷ y reducen el daño oxidativo del ADN¹⁷¹, lo que podría ser beneficioso para los pacientes con AAT y VAB. Las estatinas también revierten el aumento de las proteínas de MCM en la enfermedad aórtica¹⁷³. En nuestra cohorte, los niveles de MCM2, MCM3, MCM4 y MCM5 disminuyeron en las CMLVs de estos pacientes en comparación con aquellos con VAT. Así pues, el tratamiento con estatinas puede estar contraindicado para los pacientes con AAT y VAB.

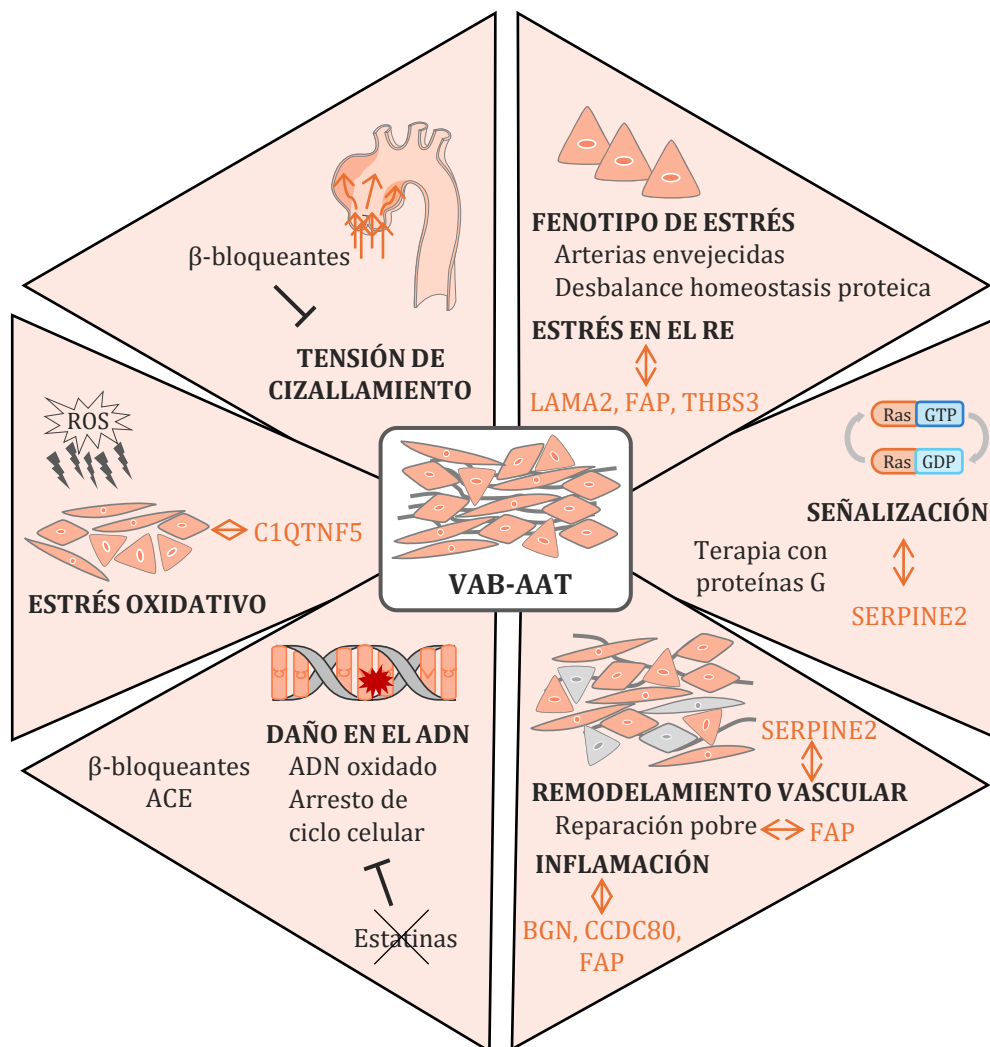


Figura 42. Vías biológicas alteradas en VAB-AAT que podrían ser dianas terapéuticas. La pared aórtica está sujeta a una mayor tensión de cizallamiento en VAB-AAT que en VAT-AAT. Esto va acompañado de una exposición a un estrés oxidativo más severo, lo que da lugar a un mayor daño oxidativo del ADN. La respuesta al daño del ADN es uno de los mecanismos más evidentes que operan en VAB-AAT según nuestro análisis de las CMLVs humanas. Los tratamientos utilizados en otras afecciones cardiovasculares limitan el daño en el ADN y, por lo tanto, pueden ayudar en el tratamiento de pacientes VAB-AAT. El análisis plasmático de la forma soluble de las proteínas alteradas de CMLVs confirmó un aumento del fenotipo de estrés (LAMA2, FAP y THBS3) y un aumento del estrés oxidativo (C1QTNF5) en pacientes VAB-AAT. La remodelación vascular es una característica distintiva de los aneurismas en general. THSB3, FAP, BGN, CCDC80 y SERPINE 2 evidencian la remodelación vascular diferencial en la aorta durante el AAT, lo que apunta a inflamación en VAT-AAT y a homeostasis proteica y reparación disminuida en sujetos VAT-AAT. Nuestro análisis revela remodelación vascular, homeostasis proteica, detención del ciclo celular y aumento de la muerte celular, mediada en parte por las proteínas G. Dado que las proteínas G intervienen en tantos procesos, su uso como objetivos terapéuticos es complicado y requiere más investigación.

2. El papel de la mitocondria en el desarrollo del AAT asociado a VAT y VAB

La mitocondria es el orgánulo implicado en la producción de energía, pero también desempeña un papel fundamental en procesos esenciales que regulan la supervivencia, la diferenciación y la muerte celular, además del crecimiento, el mantenimiento y el envejecimiento de los organismos mediante distintos procesos de señalización. Alteraciones en las funciones mitocondriales son un factor clave en el desarrollo del aneurisma en el síndrome de Marfan¹⁰⁸ y en el AAT hereditario¹⁷⁴. Su estudio en el contexto del AAT no sindrómico asociado a VAT y VAB es esencial para determinar su papel en la degeneración de la media aórtica en el AAT en ambos tipos valvulares.

2.1. Reprogramación metabólica y adaptación estructural

El análisis del proteoma mitocondrial en los dos tipos de AAT, el asociado a VAT y a VAB comparados con sus respectivos controles, reveló una afectación diferencial entre ambos en las principales funciones mitocondriales. El patrón de alteración que observamos en las proteínas implicadas en el paso final de la respiración mitocondrial apunta a una alteración de la cadena respiratoria, lo que se correlaciona con disfunción mitocondrial. La disfunción mitocondrial es un proceso conocido en el síndrome de Marfan, asociado a una alteración bioenergética y apoptosis de las CMLVs, así como una remodelación patológica de la MEC en aortas murinas y en pacientes con este AAT sindrómico¹⁰⁸. En modelos murinos de AAT hereditario también se ha descrito como un mecanismo clave¹⁷⁴. Alteraciones en la expresión y fragmentación de los complejos de la cadena respiratoria se han descrito en aortas ascendentes procedentes de ratones con AAT¹⁷⁵, que además presentaban un daño mitocondrial persistente con senescencia de las CMLVs¹⁷⁶. El estudio de 97 genes que codifican los complejos de la fosforilación oxidativa en el tejido aórtico de pacientes con AAT ascendente mostró una disminución en su expresión y disfunción mitocondrial¹⁷⁷.

En nuestros resultados, observamos que en el AAT asociado a VAT, en comparación con los pacientes VAT-C, hay una desorganización parcial de la cadena respiratoria que se acompaña con la disminución de la proteína SFXN3, esencial para la organización interna de la membrana y la homeostasis metabólica, lo que podría ser clave en el mantenimiento de la integridad de los complejos mitocondriales. Esta disminución de SFXN3 se ha observado en procesos neurodegenerativos caracterizados por amiloidosis¹⁷⁸, un proceso que habíamos visto ya alterado en el estudio de las CMLVs¹⁷⁹.

A nivel metabólico, en los pacientes VAT-AAT encontramos un aumento de proteínas implicadas en la β -oxidación de ácidos grasos (HSD17B4, MMUT) y una alteración en el metabolismo de los carbohidratos (ACLY, PDHB), sugiriendo ambos cambios una reprogramación metabólica hacia una mayor dependencia lipídica en detrimento del metabolismo glucídico (ciclo glucosa-ácidos grasos o ciclo de Randle). Este desplazamiento hacia la β -oxidación de ácidos grasos se ha descrito en modelos murinos de AAT como un mecanismo para compensar la demanda energética alterada de la aorta aneurismática¹⁷⁵. Las CMLVs sintéticas presentan una flexibilidad metabólica hacia una mayor oxidación lipídica para obtener una mayor cantidad de energía que posibilite una rápida proliferación y migración celular, así como para la síntesis y secreción de MEC¹⁸⁰. Sin embargo, en pacientes con alteración pulmonar se ha observado que el mantenimiento de este flujo metabólico de manera persistente conlleva al riesgo de fibrosis y aceleración del daño vascular¹⁸¹. El ciclo de Randle fue descrito por primera vez en músculos oxidativos, como el músculo esquelético y el corazón, y juega un papel esencial en la homeostasis metabólica y en patologías cardiovasculares^{182,183}.

En línea con estos resultados, este mecanismo podría ser un rasgo característico del AAT asociado a VAT. Por otro lado, la activación de la síntesis de proteínas mitocondriales mediante el aumento de las subunidades ribosómicas (MRPL28, MRPL37, MRPS15, MRPS27) sugiere un esfuerzo para sostener la traducción mitocondrial, aunque esta traducción podría no ser eficiente o estar limitada, ya que el correcto ensamblaje proteico podría estar comprometido, como se observa con la disminución de la chaperonina HSPD1 y la proteína MRPL12. Otras proteínas de esta familia, como MRPL14 o MRPL33 se han relacionado con disfunción mitocondrial, degeneración vascular y desarrollo de aneurisma aórtico y disección^{184,185}.

En los pacientes con AAT asociado a VAB, la afectación predominante parece estar produciéndose en la estructura y biogénesis mitocondrial. El sistema de importación de proteínas a la mitocondria es un importante contribuyente a la biogénesis mitocondrial, que además relaciona la homeostasis mitocondrial y celular¹⁸⁶. El aumento que observamos de las proteínas TOMM5 y TIMM44, componentes esenciales de los complejos de importación TOM y TIM23¹⁸⁷, refleja una activación de la maquinaria importadora y el ensamblaje de proteínas mitocondriales en los pacientes VAB-AAT en comparación con los pacientes VAB-C. Recientemente, este sistema de importación también se ha visto que actúa como sensor del estrés celular, de manera que tiene una doble función: actúa como sensor para detectar la disfunción mitocondrial e induce vías de respuesta al estrés¹⁸⁸. En este contexto, nuestros resultados podrían indicar que, a pesar de ser un mecanismo necesario para la homeostasis mitocondrial, su activación sostenida podría resultar perjudicial para la célula al inducir vías de respuesta al estrés mitocondrial y estrés oxidativo, favoreciendo el desarrollo del AAT en los pacientes con VAB. Esto, junto con el aumento que observamos en nuestros resultados de proteínas clave en la dinámica de fusión mitocondrial (OPA1) y la protección del ADNmt (TFAM), indica una respuesta adaptativa de la célula para mantener la integridad estructural de la mitocondria y aumentar su capacidad de biogénesis. Una pérdida de los niveles de expresión de TFAM en aortas de pacientes con síndrome de Marfan acelera la formación de AAT por apoptosis de las CMLVs y pérdida de homeostasis energética¹⁰⁸, mientras que su sobreexpresión protege frente al remodelado vascular patológico durante el fallo cardíaco¹⁸⁹. Asimismo, la activación de OPA1 se ha descrito como un mecanismo adaptativo que favorece la integridad de las crestas mitocondriales y la eficiencia de la fosforilación oxidativa en situaciones de estrés oxidativo¹⁹⁰. En este contexto, nuestro estudio molecular de las CMLVs evidenciaba que los pacientes con AAT asociado a VAB presentan un estrés oxidativo elevado que produce daño en el ADN. Este daño por estrés oxidativo podría ser extensible a la mitocondria, ya que el daño en el ADNmt es un proceso estrechamente relacionado con el estrés oxidativo⁶⁷. El aumento de TFAM observado en las mitocondrias de pacientes VAB-AAT en comparación con pacientes VAB-C podría ser un mecanismo para proteger al ADNmt de ese daño oxidativo. En este tipo de AAT, nuestros resultados muestran un aumento en la proteína GLS, lo que sugiere una mayor dependencia del metabolismo de la glutamina en los pacientes VAB-AAT. El catabolismo de la glutamina puede contribuir a la generación de NADPH, un cofactor con alto poder reductor que, además de participar en la defensa antioxidante, resulta esencial para la biosíntesis de macromoléculas¹⁹¹. Esta utilización de la glutamina ha sido descrita en células tumorales para la obtención de precursores biosintéticos para la síntesis de proteínas y nucleótidos¹⁹². La glutamina protegía a modelos murinos de AAA del desarrollo de aneurisma, inhibiendo la apoptosis de las CMLVs, el estrés oxidativo y la degradación de la MEC¹⁹³. Por tanto, según nuestros resultados, el incremento en la utilización de glutamina podría constituir un rasgo distintivo de los pacientes con AAT y VAB, facilitando la generación de poder reductor que atenúe el estrés oxidativo presente en estos pacientes, así como la síntesis de macromoléculas. En conjunto, nuestros resultados sugieren que las mitocondrias de

los pacientes con AAT y VAB tratan de adaptarse a un entorno con altos niveles de estrés, acorde con nuestros datos previos del estudio de las CMLVs en los pacientes VAB-AAT. Esta adaptación podría consistir en la restauración o el mantenimiento de la homeostasis proteica y estructural, a través de la fusión mitocondrial, aunque las mitocondrias acaban dejando de ser funcionales debido a un contexto de alta demanda oxidativa.

En global, estos resultados apuntan a que las mitocondrias del AAT asociado a VAT sufren una reorganización de la cadena respiratoria y del metabolismo energético, mientras que el AAT asociado a VAB se caracteriza por la activación de rutas de importación y biogénesis mitocondrial con el objetivo de adaptarse al entorno estresado en el que se encuentran. Esta divergencia sugiere que la asociación del AAT a VAT o VAB condiciona los mecanismos operantes en la dilatación.

2.2. Remodelado morfológico mitocondrial y localización respecto al núcleo celular

La morfología mitocondrial es un reflejo del estado bioenergético y redox de la célula: el número y tamaño de las mitocondrias reflejan el equilibrio fusión/fisión y la biogénesis¹⁹⁴; la proximidad al núcleo modula la señalización transcripcional y el daño del ADN¹⁹⁵; y las crestas son el sustrato estructural de la fosforilación oxidativa, por lo que su pérdida compromete la respiración¹⁹⁶.

Comparando la morfología mitocondrial de las CMLVs de pacientes VAT-AAT con pacientes sin dilatación y VAT observamos más mitocondrias por célula, aunque de menor tamaño, además de un cambio en el perfil de sus crestas. Detectamos una pérdida de mitocondrias con muchas crestas, aunque el perfil de las remanentes se asemeja a los controles. Esto podría reflejar un mecanismo compensatorio que mantiene la capacidad de generar ATP. Un mayor número de mitocondrias de menor tamaño y con un patrón de crestas alterado se ha observado en CMLVs de tejidos aórticos de pacientes con AAT¹⁹⁷. Sin embargo, en este estudio, no hay una clasificación de los pacientes por tipo valvular. Por tanto, según nuestros resultados, este patrón podría ser característico del AAT asociado a VAT.

Por su parte, en el AAT asociado a VAB respecto a VAB-C, encontramos menos mitocondrias, de mayor tamaño, más próximas al núcleo y, de nuevo, una pérdida de mitocondrias con muchas crestas, aunque, en este caso, las remanentes muestran además un perfil con menos crestas que las de VAB-C. El aumento del tamaño mitocondrial, junto con el aumento en OPA1 que observamos en nuestros resultados y que ha sido mencionado anteriormente, sugiere un patrón de fusión mitocondrial incrementado en estos pacientes. La acumulación de las mitocondrias alrededor del núcleo se ha relacionado con la generación y aumento de ROS en la célula y con la reprogramación transcripcional en condiciones de estrés^{195,198}. Una de las causas de esta localización perinuclear puede relacionarse con la activación de la respuesta al choque térmico; una respuesta defensiva para paliar el estrés oxidativo. Las proteínas de choque térmico inducen la agrupación perinuclear de las mitocondrias en las células de mamíferos para la activación de la respuesta y asegurar el correcto plegamiento de las proteínas. Sin embargo, esta agrupación da lugar a un aumento de ROS en el núcleo de la célula¹⁹⁹. Estos resultados en células de mamífero están en línea tanto con la agrupación perinuclear que observamos en nuestro análisis morfológico de las mitocondrias como en nuestros resultados moleculares de las CMLVs, donde encontramos un aumento de las proteínas de choque térmico HSPA1B, HSPA1L, HSPA12A y HSPB1 en pacientes con AAT asociado a VAB. La reducción en el número de crestas en este grupo clínico indica que la cadena respiratoria es ineficiente o que las mitocondrias presentan un fenotipo más biosintético que energético²⁰⁰. Dado que las crestas

sostienen el empaquetamiento de los complejos respiratorios, su reducción está asociada con un menor acoplamiento y una mayor propensión a la generación de ROS²⁰¹. En conjunto, las mitocondrias de los pacientes con AAT asociado a VAB parecen tener mitocondrias con una fosforilación oxidativa poco eficiente y, en parte, responsables del ambiente de estrés oxidativo exacerbado de este grupo clínico.

2.3. Disfunción mitocondrial y mecanismos compensatorios mitocondriales

Tanto las características morfológicas como moleculares de las mitocondrias en los dos tipos de AAT indican disfunción mitocondrial. Quisimos confirmar este resultado evaluando diferentes parámetros funcionales mitocondriales, que son, a su vez, marcadores directos del estado bioenergético y redox de la mitocondria en CMLVs.

El AAT asociado a VAT muestra, respecto a los pacientes con VAT sin dilatación, un aumento en el número de copias de ADNmt, un descenso del potencial de membrana y ausencia de cambios en la capacidad glucolítica y la respiración mitocondrial. En conjunto, por lo tanto, las mitocondrias de estos pacientes muestran un patrón en el que la célula aumenta el número de mitocondrias para sostener la síntesis de sus proteínas y preservar el rendimiento energético pese a una pérdida del potencial de membrana. La caída del potencial de membrana indica disfunción subyacente, pero la estabilidad en los niveles de superóxido mitocondrial y el perfil respiratorio, que no se diferencia del de los pacientes control, sugiere que, en VAT-AAT, se logra mantener la capacidad mitocondrial efectiva.

Cuando estudiamos el AAT asociado a VAB respecto a los pacientes con VAB sin dilatación, detectamos un potencial de membrana disminuido y un aumento en la producción de superóxido mitocondrial. Esto es coherente con mitocondrias estresadas, las cuales suelen despolarizarse, pero, a su vez, acaban generando más ROS²⁰². Además, observamos una mayor respiración basal, una mayor fuga de protones, una mayor producción de ATP y un menor acoplamiento. Estos hechos están en consonancia con un estado de estrés mitocondrial, donde la célula intenta sostener la eficiencia energética aumentando la actividad respiratoria, pero a costa de un mayor desacoplamiento. En línea con nuestros resultados, CMLVs aisladas de biopsias humanas de AAA mostraron un aumento de superóxido mitocondrial, una menor capacidad antioxidante y más daño en el ADN en comparación con CMLVs procedentes de donantes sanos, evidenciando un fenotipo mitocondrial estresado²⁰³.

La fuga de protones y la generación de ROS están estrechamente relacionados: un aumento en la producción de ROS induce un desacoplamiento parcial de la cadena respiratoria, lo que, a su vez, reduce la producción de ROS, sugiriendo que existe un bucle positivo que protege frente a los efectos del elevado estrés oxidativo. Este mecanismo es clave en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, como en la lesión por reperfusión isquémica, la diabetes o la aterosclerosis²⁰⁴. De acuerdo con nuestros resultados, las mitocondrias del AAT asociado a VAB parecen incrementar el flujo electrónico para mantener la producción de ATP en un ambiente estresado mediante un desacoplamiento parcial y un aumento en la fuga de protones. En principio, esto puede limitar la formación de ROS al reducir el potencial de membrana, en un mecanismo conocido como “desacoplamiento para sobrevivir”, que es esencial para la adaptación mitocondrial mediante la regulación del estrés oxidativo y la supervivencia celular^{205,206}. No obstante, en nuestros resultados observamos un incremento de superóxido mitocondrial y de fuga de protones, lo que sugiere la existencia de un bucle patológico de generación de ROS en el que el estrés oxidativo y la pérdida de acoplamiento se retroalimentan y resultan finalmente deletéreos en los pacientes con AAT y VAB, donde, a pesar de todos los

mecanismos de adaptación mitocondrial, estas acaban siendo disfuncionales. El hecho de que la respiración máxima sea similar a la respiración basal y que observemos una mayor respiración basal indica que las células ya están funcionando cerca de su límite en condiciones basales, lo que sugiere que el problema en VAB-AAT no es de capacidad máxima, sino del modo de acoplamiento y la eficiencia en el estado basal.

De nuevo, nuestros datos apoyan dos mecanismos operantes divergentes ante el AAT en ambos tipos valvulares: el VAT-AAT presenta un perfil compensatorio, con un aumento del número de mitocondrias que mantienen la capacidad respiratoria de manera efectiva, lo que otros grupos han relacionado con protección parcial de las CMLVs²⁰⁷. En cambio, las mitocondrias de VAB-AAT exhiben una adaptación frente a un ambiente más oxidativo a través del remodelamiento y la estructuración mitocondrial (fusión) que acaba siendo perjudicial y predispone a estos pacientes al desarrollo de AAT (Figura 43).

Los resultados moleculares, morfológicos y funcionales observados refuerzan la idea de que la disfunción mitocondrial constituye un eje central en la patogenia del AAT, con mecanismos diferenciales en presencia de VAT o VAB. Esta divergencia, donde el VAT activa mecanismos de compensación, mientras que el VAB, a pesar de sus intentos de adaptación a un ambiente oxidativo exacerbado, presenta una disfunción oxidativa más marcada, aporta nuevas claves para comprender la heterogeneidad clínica y molecular del AAT y abre la puerta a plantear estrategias terapéuticas dirigidas a modular la biogénesis, la dinámica y el estrés oxidativo mitocondrial en función de la válvula aórtica del paciente.

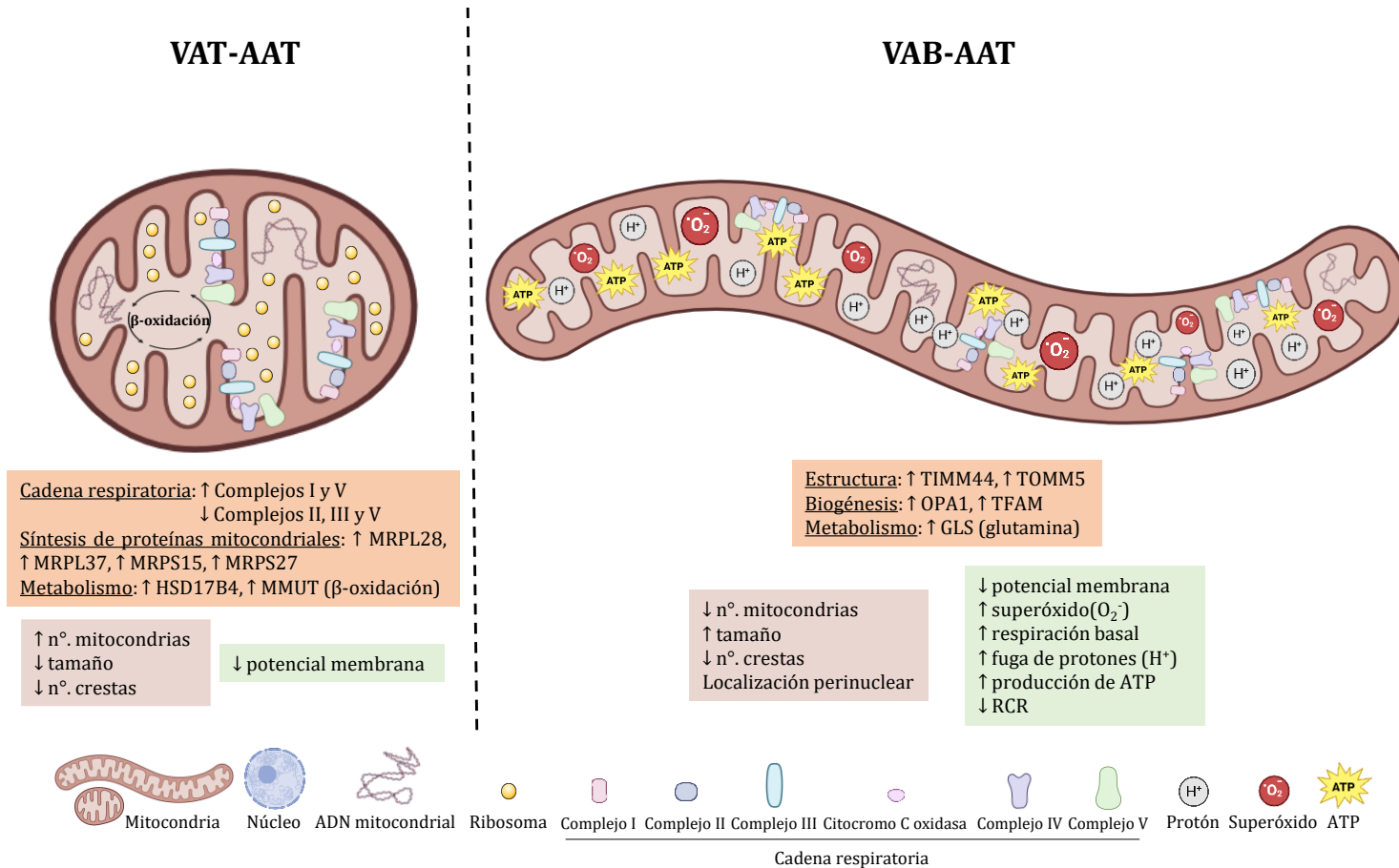


Figura 43. Disfunción mitocondrial en el AAT en comparación con los pacientes sin dilatación. El VAT-AAT presenta alteraciones proteicas en la cadena respiratoria y un aumento de proteínas ribosómicas mitocondriales en un intento de reforzar la síntesis proteica, junto a una reprogramación metabólica caracterizada por un aumento de la β-oxidación lipídica. Además, se observa un mayor número de mitocondrias de menor tamaño. Estas mitocondrias pierden número de crestas frente a los controles, pero su perfil mitocondrial de pocas crestas es similar al de las mitocondrias de los pacientes VAT-C. Funcionalmente, estas alteraciones se asocian con una disminución del potencial de membrana sin incremento significativo de ROS. En VAB-AAT, se observa un incremento de proteínas relacionadas con la importación y biogénesis mitocondrial, con un metabolismo más relacionado con la glutamina. Además, se detectan menos mitocondrias, más grandes, con localización perinuclear y menor número de crestas. A nivel funcional, se observa una disminución en el potencial de membrana, un aumento en la producción de superóxido mitocondrial, un aumento de la respiración basal, de la fuga de protones y de la producción de ATP, junto con una disminución del RCR. Estos hallazgos sugieren que, mientras que en VAT-AAT predomina una estrategia compensatoria, en VAB-AAT se aprecia una disfunción oxidativa con desacoplamiento parcial en un intento de sostener la homeostasis estructural y funcional. Creada con BioRender.com.

3. Perfil metabólico diferencial en el AAT asociado a VAT y VAB

A través del análisis metabólico no dirigido, identificamos diferencias metabólicas plasmáticas entre aneurismas aórticos torácicos asociados a VAT y VAB, las cuales fueron confirmadas mediante espectrometría de masas dirigida en una cohorte mayor e independiente. Nuestros hallazgos han revelado perfiles metabólicos distintos en los AAT asociados a cada tipo de válvula, evidenciando una utilización diferencial de la glucosa en estas dos formas de aneurisma. Para investigar más a fondo estas diferencias plasmáticas, examinamos directamente en tejido aórtico el uso de la glucosa en el metabolismo del glucógeno, la glucólisis, la vía biosintética de las hexosaminas (HBP) y la ruta de las pentosas fosfato (PPP). Este análisis *in-situ* confirmó una utilización diferencial de la glucosa en pacientes con AAT asociado a VAT y VAB, lo que evidencia que existen vías metabólicas distintas operantes en estos dos tipos de AAT.

3.1. Las acilcarnitinas en pacientes con VAT y los lisofosfolípidos en pacientes con VAB definen las huellas metabólicas plasmáticas del AAT

El análisis metabólico del AAT identificó un aumento de acilcarnitinas en el AAT asociado a VAT y de lisoglicerofosfolípidos en el AAT asociado a VAB.

El aumento de las acilcarnitinas plasmáticas se ha asociado a una disfunción mitocondrial²⁰⁸ y a un aumento de la señalización inflamatoria¹⁶⁹, en consonancia con nuestros resultados mitocondriales y de las CMLVs en pacientes VAT-AAT, y acorde a la bibliografía^{108,209}. Un aumento de las acilcarnitinas se relaciona con la oxidación incompleta de ácidos grasos y alteraciones en la glucólisis, y sus niveles plasmáticos sirven como marcador fiable para monitorizar estos procesos²¹⁰. También sirven como marcadores de trastornos metabólicos y predictores de un mayor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares graves^{211,212}. Aquí mostramos un incremento de los niveles plasmáticos de acetilcarnitina, glutarilcarnitina y miristoilcarnitina en el grupo VAT-AAT frente al grupo VAT-C. La acetilcarnitina es la acilcarnitina plasmática más común y sus niveles se correlacionan con los niveles intracelulares, reflejando inflexibilidad metabólica cuando están aumentados²¹⁰. La miristoilcarnitina es una acilcarnitina de cadena larga. La función principal de este tipo de acilcarnitinas es facilitar el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria. Dambrova *et al.* concluyeron en una detallada revisión que la reducción de la capacidad de fosforilación oxidativa afecta directamente al metabolismo de los ácidos grasos, lo que conduce a la producción de carnitinas de cadena larga²¹². La miristoilcarnitina se ha encontrado elevada en el plasma de pacientes con defectos en enzimas mitocondriales y de pacientes con enfermedad cardiovascular y diabetes o enfermedad renal crónica^{213,214}. Estos cambios previamente reportados en los niveles de acilcarnitinas se alinean con nuestros datos y pueden indicar una alteración del flujo de glucosa en pacientes con VAT.

Tanto la acetilcarnitina, como la glutarilcarnitina y la miristoilcarnitina, muestran potencial como marcadores para el diagnóstico de AAT. Particularmente, la miristoilcarnitina mostró el mejor rendimiento para el diagnóstico de AAT y VAT, correlacionando positiva y significativamente con el diámetro aórtico, lo que evidencia su potencial como marcador de seguimiento del riesgo de rotura aórtica en estos pacientes con VAT.

Los pacientes con AAT y VAB experimentan un mayor estrés oxidativo y daño en el ADN, tal y como mostramos en nuestros resultados previos y acorde a la bibliografía¹⁷⁹, lo que conduce a

elevadas demandas biosintéticas y de homeostasis redox. Esto puede estar mediado por un cambio en el uso de la glucosa²¹⁵. A su vez, este cambio en el uso de la glucosa se relaciona con un aumento de los lisoglicerofosfolípidos^{216,217}, tal y como se muestra aquí con el aumento de LPE 18:0, LPE 18:2, LPC 16:0, LPC 18:2, y LPC 20:5. Los lisoglicerofosfolípidos son cruciales para la proliferación celular y, concretamente, los LPE y los LPC son componentes esenciales de la membrana celular. Los LPEs son componentes minoritarios, mientras que los LPCs y, particularmente el LPC 16:0, son componentes mayoritarios. Las concentraciones plasmáticas elevadas de LPE 18:0 y LPE 18:2 se han asociado a una mala salud cardiovascular²¹⁸. Paralelamente, el aumento observado en los niveles plasmáticos de LPC 16:0 concuerda con hallazgos previos que relacionan un incremento de LPC 16:0 libre con el deterioro de la reactividad vascular²¹⁹. Por su parte, los niveles plasmáticos elevados de LPC poliinsaturados, como LPC 18:2 o LPC 20:5, se asocian con su posible captación y utilización tisular ante una mayor demanda, donde se pueden emplear para la síntesis de fosfolípidos de membrana²²⁰. Esto sugiere que los LPC plasmáticos que encontramos aumentados en pacientes con AAT y VAB podrían estar contribuyendo activamente a los procesos que operan en el AAT dentro del tejido aórtico, además de reflejar cambios locales. Un incremento en la demanda de síntesis de estos lípidos se satisface parcialmente mediante la interacción entre el metabolismo de la glutamina y la glucosa. Esta combinación metabólica proporciona fuentes de carbono y nitrógeno, así como NADPH^{221,222}, que es esencial para contrarrestar las ROS, aumentadas en pacientes con AAT y VAB.

3.2. Uso de la glucosa a través de la vía biosintética de las hexosaminas en el aneurisma aórtico torácico asociado a VAT

Al estudiar el AAT en pacientes con VAT en comparación con pacientes del mismo tipo valvular y sin dilatación (VAT-C), observamos una mayor utilización del glucógeno como fuente de glucosa y niveles elevados de lactato, lo que sugiere una glucólisis activa. También encontramos que la HBP estaba favorecida y la PPP parecía silenciada (Figura 44; VAT-AAT).

Encontramos un aumento de la expresión de *PYGM*, lo que apunta a una preferencia por la degradación del glucógeno a glucosa como combustible para la producción de ATP; similar a la respuesta del corazón frente a una mayor demanda de energía²²³. Esto da lugar a una mayor acumulación de lactato, lo que refleja la elevada demanda de ATP en la célula para la contracción²²⁴. Se sabe que las CMLVs presentan una elevada tasa de producción de lactato en condiciones fisiológicas. En base a nuestros datos, esto es lo que ocurre en pacientes con AAT y VAT²²⁵. En conjunto, estas observaciones (utilización de glucógeno y producción de lactato) indican que las CMLVs funcionan de forma óptima y responden adecuadamente a las necesidades energéticas en el AAT a través de las vías de glucólisis establecidas.

Por otro lado, observamos un aumento de las enzimas limitantes y de los productos finales de la vía HBP en pacientes con AAT y VAT, lo que sugiere una desviación del metabolismo de la glucosa hacia esta vía. Específicamente, encontramos un aumento de la expresión génica de *GFPT*, la enzima inicial de la HBP, y de *UAP1*, la enzima implicada en uno de los últimos pasos de la formación de GAGs, junto con niveles elevados de GAGs en la media aórtica. La acumulación de GAGs es una característica distintiva de los AAT y es infrecuente en otros tipos de aneurisma (AAA o intracraneal)²²⁶. La producción de GAGs se ha descrito como un mecanismo protector vinculado a una activación de la respuesta al estrés para restaurar la proteostasis y la homeostasis celular, situación característica del AAT asociado a VAT^{133,227}. Sin embargo, esta acumulación podría ser un mecanismo impulsor del AAT en el caso de los

asociados a VAT, según nuestros resultados, ya que la acumulación de estos GAGs en depósitos tiene consecuencias perjudiciales en la media aórtica al incrementar el estrés intramural, provocando alteraciones en las interacciones célula-matriz, cambios en el fenotipo y envejecimiento vascular^{49,228,229}. Además, la acumulación de GAGs se asocia a disecciones aórticas al comprometer las fibras elásticas y las CMLVs^{226,230}.

3.3. Uso de la glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato y la vía biosintética de las hexosaminas en pacientes con aneurisma aórtico torácico y VAB

En el estudio realizado en CMLVs demostramos que los pacientes con AAT y VAB experimentan un estrés oxidativo masivo, una detención del ciclo celular durante la fase S y una elevada respuesta al daño del ADN¹⁷⁹. Estos procesos pueden verse influidos por cambios en el uso de la glucosa²³¹ y, de hecho, identificamos aquí un aumento en el uso de la glucosa en pacientes VAB-AAT, caracterizado por una mayor actividad de la HK y la rama oxidativa de PPP, así como de la vía HBP (Figura 44; VAB-AAT).

Durante la fase S del ciclo celular, la fosforilación oxidativa se detiene para minimizar el daño del ADN mediado por ROS¹⁰⁴. Otro mecanismo de defensa celular implica la producción de NADPH, un agente reductor crucial. Las células pueden aumentar la producción de NADPH mediante dos estrategias principales: la inhibición de la glucólisis para desviar el uso de la glucosa hacia la PPP y el aumento del metabolismo de la glutamina a través de la HBP^{222,227}. En consonancia con esto, observamos en el AAT asociado a VAB un uso preferente de la glucosa a través de la PPP, evidenciado por el aumento de la actividad de la enzima limitante G6PD y el aumento de la producción local del cofactor NADPH. Además, se observó una mayor participación de la vía HBP, a través del metabolismo de la glutamina, evidenciada por el aumento de la expresión de GFPT y la producción de NADPH. La disminución de la actividad de la PFK que observamos se corresponde con una reducción de la glucólisis. En este sentido, también encontramos un aumento en la conversión de lactato en piruvato (actividad LDH), lo que sugiere un intento de restaurar el ciclo del ácido tricarbóxico y la fosforilación oxidativa y promover así la proliferación celular. Sin embargo, la oxidación de lactato a piruvato mediada por LDH puede generar ROS, lo que conduce a daño oxidativo e incluso daño celular irreversible²²⁴. De esta manera, el predominio de HBP y PPP, junto con una disminución de la glucólisis, es crucial para la generación de NADPH; esencial para generar poder reductor que apoye la biosíntesis de lípidos y nucleótidos^{227,232}. La activación de estos procesos biosintéticos está estrechamente relacionada con el ciclo del ácido tricarbóxico, ya que este proporciona sustratos para su uso en las vías biosintéticas, de manera que el éxito de esta actividad sintética depende de la generación de NADPH^{221,227}.

Anteriormente hemos comentado cómo, en el AAT asociado a VAT, se usa preferencialmente la glucosa a través de la HBP conduciendo a una acumulación de GAGs que contribuye a la dilatación arterial. En las aortas VAB-AAT, también encontramos acumulación de GAGs, pero sin alteración significativa respecto a los pacientes sin dilatación, como se ha observado anteriormente en pacientes con VAB sin dilatación aórtica²²⁶, lo que indica que el daño subyacente ya está presente en los sujetos con VAB-C. Además, el uso preferencial de la glucosa hacia la vía HBP parece estar relacionada con la interacción de la ruta con la glutamina, como demuestra el aumento de la producción de NADPH y la expresión de GFPT. Estas vías metabólicas interconectadas podrían estar reduciendo los productos finales de HBP, mitigando potencialmente el impacto de la acumulación de GAGs en la dilatación aórtica en estos pacientes. Las alteraciones del metabolismo de la glucosa en el AAT asociado a VAB están

influidas por el estrés oxidativo y las demandas biosintéticas, según nuestros resultados, y el uso de glucosa se centra principalmente en cubrir estas necesidades celulares. Aunque estos mecanismos se activan inicialmente con fines protectores, pueden tener consecuencias no deseadas, como una escasa supervivencia celular, un aumento de ROS o el compromiso de la integridad arterial. De hecho, el exceso de uso de la glucosa a través de la PPP y la HBP se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares²²³.

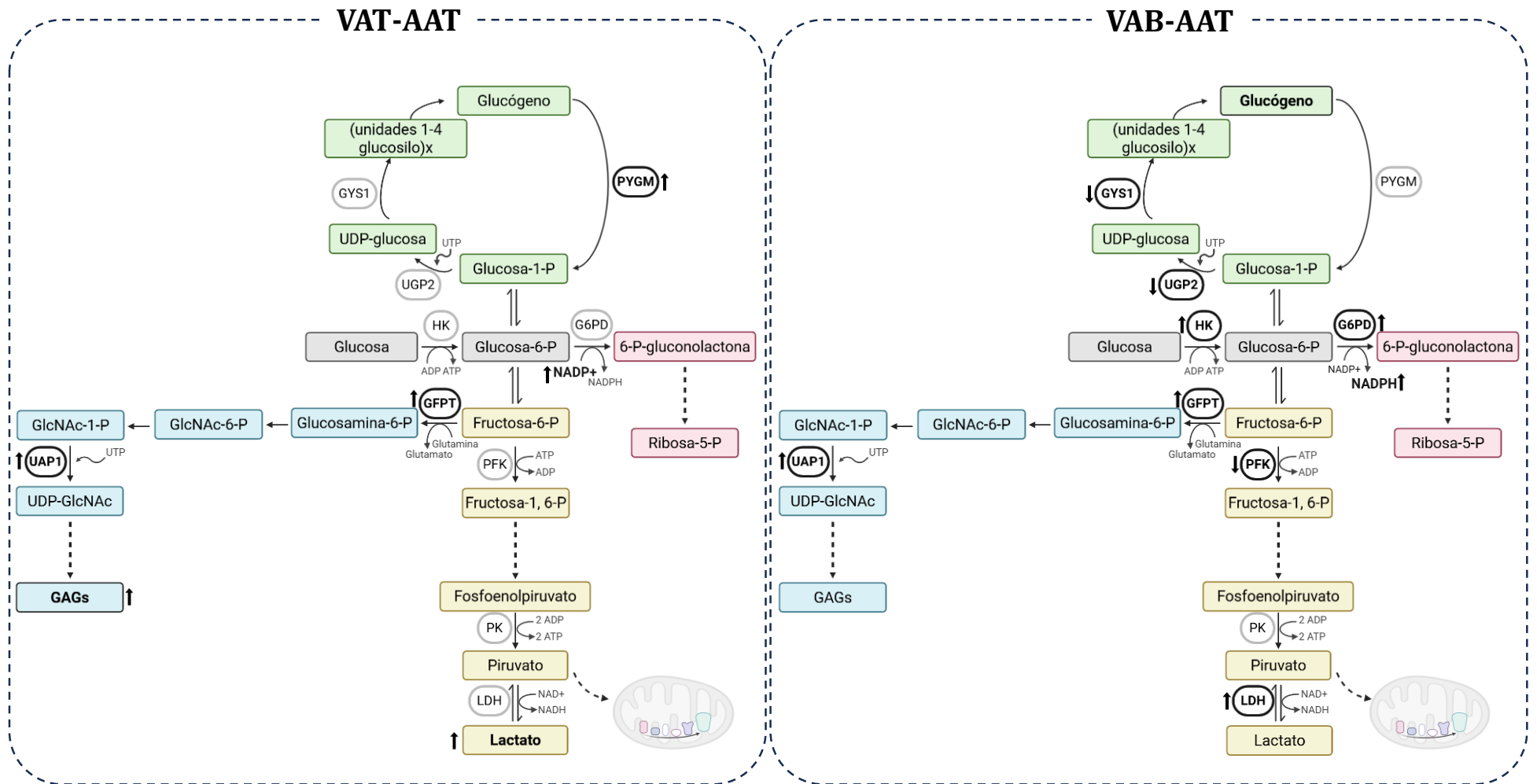


Figura 44. Flexibilidad metabólica en el AAT. Alteraciones en el uso de la glucosa en el AAT en comparación con C, asociados con VAT y VAB. Se evaluaron directamente en el tejido aórtico del paciente el metabolismo del glucógeno, la glucólisis, la PPP y la HBP. En el AAT asociado a VAT existe una glucólisis activa, con un aumento en el uso del glucógeno (aumento de la expresión de *PYGM*) y niveles elevados de lactato, así como una deriva hacia la vía HBP (aumento en la expresión de *GFPT* y *UAP1* y elevados niveles de GAGs) con un silenciamiento de la PPP (incremento en el ratio $NAD^+/NADPH$). En el AAT asociado a VAB, se favorece la rama oxidativa de la PPP (aumento en la expresión de *G6PD* y en la producción de $NADPH$) y la HBP (aumento en la expresión de *GFPT* y *UAP1*) sobre la glucólisis (actividad disminuida de *PFK*) y el almacenamiento del glucógeno (disminución de la expresión de *UGP2* y *GYS1*). En negrita, las enzimas y productos finales con diferencias significativas y su correspondiente alteración (marcada con flechas) en AAT vs. C en cada tipo de aneurisma. Creada con BioRender.com.

4. Mecanismos subyacentes al AAT asociado a VAT y VAB y posibles dianas terapéuticas

El AAT no sindrómico no es una entidad única: su desarrollo y progresión responden a mecanismos biopatológicos heterogéneos que están fuertemente asociados al tipo valvular (VAT o VAB). La integración de los resultados obtenidos en el análisis proteómico, metabólico y funcional de tejido aórtico, CMLVs, mitocondrias y plasma muestra que, aunque ambos subtipos comparten un núcleo patogénico, como es el daño celular que lleva a una pérdida y/o reprogramación de las CMLVs y con ello un remodelado extracelular patológico, las rutas protagonistas en cada tipo de aneurisma y las claves moleculares son diferentes.

4.1. Aneurisma aórtico torácico asociado a VAT

La desviación del uso de la glucosa hacia la vía HBP y la mayor actividad de rutas biosintéticas observadas en esta tesis doctoral favorecen la síntesis de GAGs. Aunque inicialmente la HBP puede activarse como respuesta protectora modulando la respuesta al estrés, la acumulación crónica de los GAGs, que se depositan en balsas en la capa media y rompen la arquitectura elástica, aumenta el estrés intramural y la fragilidad mecánica de la pared aórtica. En el AAT asociado a VAT, la evidencia sugiere que este mecanismo además contribuye al fenotipo degenerativo “inflamatorio” que favorece una dilatación progresiva y la disección^{233,234}. La inflamación crónica descrita en el AAT asociado a VAT es un eje central de la patología. Como marcadores de esta inflamación operante detectamos un aumento de BGN y CCDC80 a nivel celular y en el plasma, junto con un aumento de las acilcarnitinas plasmáticas.

El uso de la glucólisis como vía para la obtención de lactato parece ser otro rasgo característico de estos pacientes, tal y como observamos con el aumento de esta molécula en el tejido de los pacientes VAT-AAT. El lactato sirve como sustrato para aumentar la capacidad de reserva máxima en la mitocondria, que es la diferencia entre la capacidad respiratoria máxima y la respiración basal. Cuando la demanda energética supera la oferta, la capacidad de reserva es una fuente de suministro de energía, lo que evita la “crisis de ATP” y se asocia con una supervivencia celular prolongada²³⁵. Mediante el aumento de lactato que hemos observado en esta tesis doctoral en los pacientes con AAT asociado a VAT, la glucólisis promueve la proliferación de las CMLVs²³⁶. Además de la glucosa, los ácidos grasos también son una fuente de energía para las CMLVs y, particularmente, la oxidación de los ácidos grasos genera más energía que la glucosa, aunque también necesita más ATP²³⁷. En las CMLVs, la oxidación de los ácidos grasos está integrada con el metabolismo de la glucosa: la energía generada por la glucólisis puede alimentar la β -oxidación de los ácidos grasos y, a su vez, la actividad de la glucólisis puede ser regulada por la retroalimentación de los productos generados en la oxidación lipídica²³⁸. Sin embargo, el ambiente inflamatorio presente en el AAT asociado a VAT podría ser el responsable de una saturación parcial de la β -oxidación y con ello una oxidación incompleta de las acilcarnitinas, que se acumulan en el plasma y promueven un estado metabólico proinflamatorio²³⁹. Estudios en pacientes con resistencia a la insulina, enfermedades cardiovasculares y regeneración de miocardio confirman que las acilcarnitinas se acumulan cuando la fosforilación oxidativa está saturada, generando un exceso de intermediarios al plasma que, en último término, dan lugar a inflamación y rigidez vascular²⁴⁰⁻²⁴².

Las mitocondrias de los pacientes VAT-AAT presentan alteraciones proteicas de la cadena respiratoria que, junto con el incremento en plasma de acilcarnitinas, apuntan a una disfunción mitocondrial. Esta disfunción podría estar siendo contrarrestada con el incremento en el

número de mitocondrias por célula, junto con el aumento de ADNmt, así como la activación de la síntesis de proteínas mitocondriales mediante el aumento de las subunidades ribosómicas. Este patrón morfológico y energético ha sido descrito en otras enfermedades cardiovasculares, tales como isquemia, fallo cardíaco e hipertrofia, donde se mantiene la viabilidad celular a expensas de una flexibilidad metabólica que, a largo plazo, favorece la rigidez y fragilidad vascular, así como la inflamación²⁴³⁻²⁴⁶. Según los resultados de esta tesis, todos estos procesos podrían ser los responsables de la pérdida de integridad elástica en la pared aórtica y del desarrollo del AAT en los pacientes con VAT (Figura 45).

Estrategias dirigidas a controlar la síntesis y evitar la acumulación de GAGs mediante la regulación de la HBP, a reducir la inflamación crónica a través de moduladores metabólicos para la β -oxidación y antiinflamatorios selectivos, y a optimizar la función mitocondrial podrían ser estrategias terapéuticas para el tratamiento del AAT asociado a VAT. En este sentido, el Odiparcil y la genisteína son moléculas que inhiben la síntesis de GAGs y reducen su depósito en pacientes con mucopolisacaridosis^{247,248}. La inhibición de la HBP con el fármaco 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, un antagonista de la glutamina con alta afinidad por la enzima GFPT, revirtió la dilatación aórtica y la degeneración de la pared en modelos murinos de Marfan²⁴⁹. El receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α) es un factor transcripcional que regula la expresión de genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos y tiene efectos antiinflamatorios vasculares en modelos metabólicos y cardiovasculares²⁵⁰. Agonistas del PPAR α son capaces de disminuir la inflamación y la fibrosis en pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico²⁵¹. En cuanto a la función mitocondrial, el fármaco Elamipretide es un péptido sintético que actúa estabilizando las mitocondrias al unirse a la cardiolipina en su membrana interna. Este fármaco mejora la producción de ATP, reduce la formación de ROS y protege a las células del estrés oxidativo, así como mejora la función mitocondrial y protege las crestas en pacientes con fallo cardíaco²⁵². Todas estas líneas de tratamiento están en consonancia con nuestros resultados y podrían ser útiles para el tratamiento de los pacientes VAT-AAT.

En esta tesis, proponemos a la proteína FAP y a la miristoilcarnitina como marcadores plasmáticos de progresión del AAT no sindrómico asociado a pacientes con VAT, ya que, además de presentar concentraciones diferenciales en plasma entre pacientes con y sin dilatación en la aórtica torácica, la concentración correlaciona con el diámetro aórtico de los pacientes.

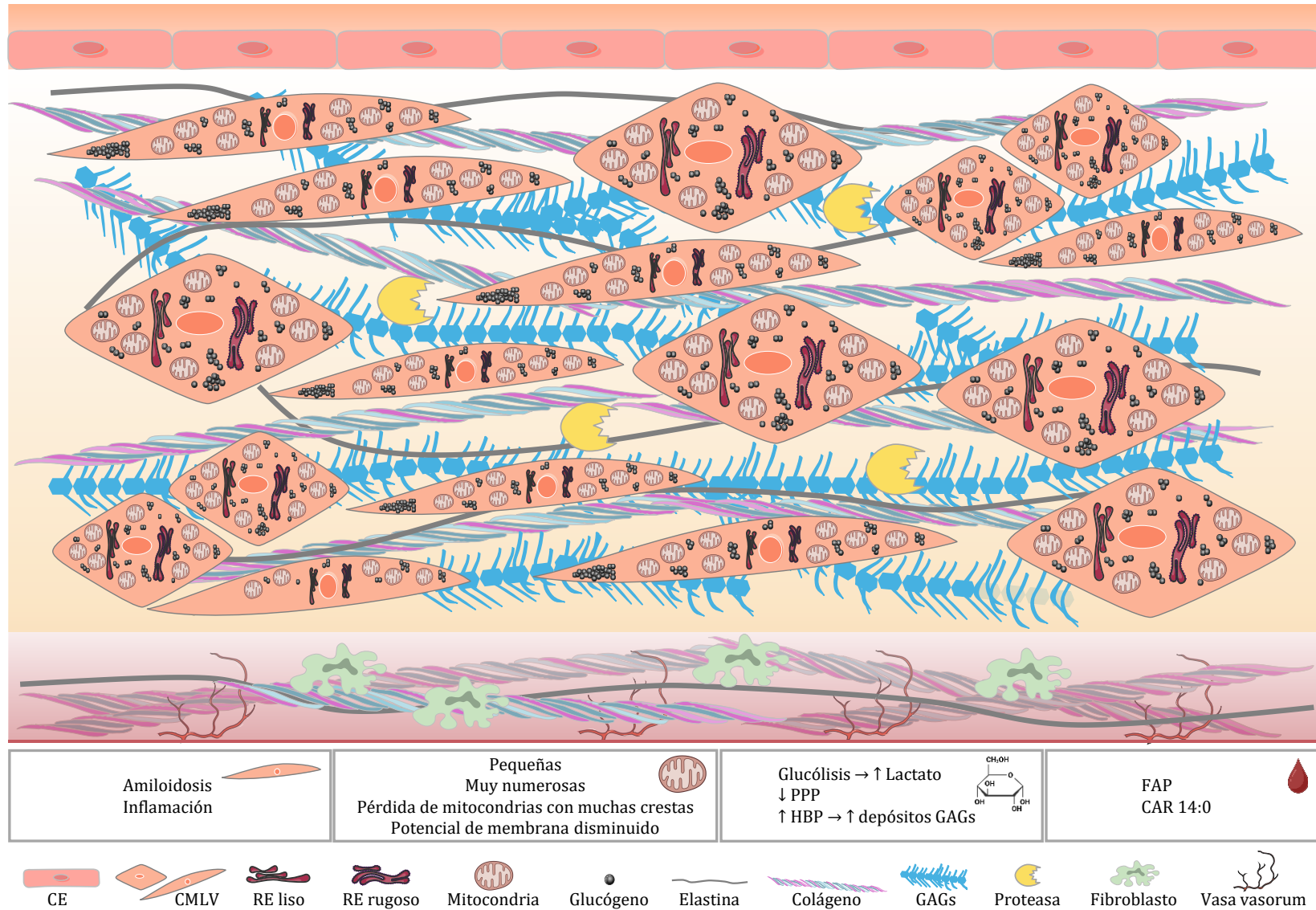


Figura 45. Aneurisma aórtico torácico asociado a una válvula aórtica tricúspide. El VAT-AAT está caracterizado por un eje inflamatorio-alteración de la MEC; disfunción mitocondrial con mitocondrias pequeñas y numerosas; aumento de lactato y HBP, con acumulación de GAGs; y la CAR 14:0 y FAP como marcadores de dilatación.

4.2. Aneurisma aórtico torácico asociado a VAB

La presencia de una VAB en sí misma genera patrones de flujo sanguíneo alterados, ocasionando una tensión de cizallamiento anómala en la pared arterial de estos pacientes. Estos patrones actúan sobre la pared aórtica ascendente y desencadenan procesos de mecanotransducción, induciendo respuestas en el endotelio y en las CMLVs de la capa media. Sin embargo, este componente hemodinámico no es suficiente para explicar el desarrollo del AAT en estos pacientes.

Todos los estudios que se recogen en esta tesis doctoral ponen de manifiesto una situación excepcional de estrés oxidativo exacerbado en el contexto del AAT asociado a VAB. Los estudios en CMLVs evidenciaron un entorno de mayor estrés oxidativo en estos pacientes, que se manifiesta con un aumento de los antioxidantes TXNRD1, GSTM2, GSTO1, la disminución de CAT y el aumento de C1QTNF5. Esta proteína aumenta cuando hay un mayor estrés oxidativo y energético y se acumula en la MEC, donde interactúa con otras proteasas, retroalimentando la generación de ROS²⁵³. Además, encontramos un aumento en el estrés del RE de estos pacientes. La comunicación RE-mitocondria es clave en la homeostasis celular, ya que es el lugar donde se produce el intercambio de Ca^{2+} para activar enzimas de la cadena respiratoria y la producción de ATP; de lípidos, para la síntesis de membranas mitocondriales; y de señales de estrés. Para mantener la homeostasis proteica y evitar la acumulación de proteínas mal plegadas, el RE se activa para mantener el correcto plegamiento de las proteínas y las mitocondrias se acercan al núcleo para sostener la respuesta. Nuestro análisis mitocondrial evidenció una elevada cercanía entre las mitocondrias y el núcleo, lo que podría tener un doble filo: por un lado parece favorecer la respuesta al mal plegamiento proteico y el desacoplamiento de la cadena respiratoria como mecanismo protector frente a los altos niveles de estrés oxidativo, pero, por otro lado, esto al final parece llevar a un aumento de ROS y apoptosis de las CMLVs, convirtiendo a las mitocondrias en “puntos de generación de ROS” alrededor del núcleo; un proceso descrito en otras patologías cardiovasculares²⁵⁴. La mayor generación de superóxido mitocondrial se relaciona con un fenotipo de hipermetabolismo desacoplado, en el que la maquinaria respiratoria trabaja para sostener la producción del ATP a costa de una mayor fuga de protones y la producción de ROS, propagando el daño al RE y a la MEC. Nuestro análisis metabolómico también evidenció dicho aumento del ambiente oxidativo a través de un redireccionamiento del uso de la glucosa hacia PPP y HBP; vías que producen NADPH, como potente agente reductor, y que sostienen procesos biosintéticos de nucleótidos y lípidos. Estas macromoléculas facilitan la reparación y proliferación celular a corto plazo, pero su activación crónica favorece alteraciones redox persistentes. Este ambiente oxidativo demostramos que llega a tal extensión que afecta al ADN nuclear y, muy posiblemente, también al ADNmt por su proximidad a la fuente de ROS, su falta de histonas y su alta tasa de replicación con sistemas de reparación limitados.

El exceso de ROS puede oxidar bases nitrogenadas, frenar horquillas de replicación y amplificar la respuesta al daño del ADN²⁵⁵, como observamos con el aumento del estrés genotóxico en el ADN de las CMLVs y la orina de estos pacientes. Esta carga de estrés oxidativo sostenido en el ADN es coherente con la activación de vías de daño en el ADN y el arresto celular en la fase S del ciclo. El aumento coordinado de chaperonas, junto a señales de estrés oxidativo, enlaza directamente con la activación de la maquinaria de daño y reparación del ADN: el estrés de replicación que provoca escasez de histonas y sobrecarga de la maquinaria de replicación promueve roturas de ADN y detención en la fase S; un fenómeno descrito cuando disminuye el suministro de histonas o se deprimen complejos MCM^{256,257}. El aumento de proteínas de importación mitocondrial (TOM/TIM), de OPA1 y TFAM y el mayor tamaño de las mitocondrias

en este tipo de AAT son el reflejo de una respuesta de biogénesis/fusión orientada a preservar la integridad del ADNmt y la arquitectura interna mitocondrial para adaptarse así a una situación de estrés crónico.

El redireccionamiento a PPP y HBP encontrado en esta tesis doctoral junto con el aumento en plasma de lípidos de membrana (lisoglicerofosfolípidos) indica la existencia de procesos biosintéticos de nucleótidos y lípidos que facilitan la reparación y proliferación celular a corto plazo. Sin embargo, la activación crónica de estas vías puede culminar en apoptosis o senescencia cuando las demandas superan la capacidad de reparación^{233,258,259}. Estos lisoglicerofosfolípidos mantienen la integridad de la membrana mitocondrial interna, esencial para el empaquetamiento de los complejos respiratorios y la arquitectura de las crestas¹²⁸⁻¹³⁰. El aumento plasmático de lisoglicerofosfolípidos puede deberse a que cuando hay una disminución de las crestas mitocondriales, como encontramos en estos pacientes, se intenta remodelar/resintetizar membranas dañadas en procesos de biogénesis mitocondrial, pero esto termina liberando LPCs al plasma²⁶⁰. Este desequilibrio entre la producción y la utilización de estos metabolitos parece, por tanto, consecuencia del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la alta activación del metabolismo biosintético; señal de una mitocondria con membranas inestables y biogénesis activa, pero sometida a un entorno oxidativo que precipita apoptosis y pérdida de CMLVs. De esta manera se sincroniza la síntesis proteica, el estrés oxidativo y genotóxico en el ADN, la biosíntesis y la apoptosis. Según los resultados que encontramos en esta tesis en los pacientes VAB-AAT, todos estos procesos podrían ser los responsables del debilitamiento de la pared arterial, mediado en gran medida por la apoptosis de las CMVLs. El aumento del estrés en el RE que encontramos en estos pacientes con el objetivo de mantener la homeostasis proteica se retroalimenta con daño oxidativo, agravando la disfunción celular, que culmina con la apoptosis de las CMLVs en pacientes con calcificación vascular²⁶¹. Esta combinación de estrés de replicación nuclear, arresto celular y disfunción mitocondrial, pese a aumentar sus herramientas adaptativas, llevan a daño persistente que sitúa a las CMLVs en una trayectoria de apoptosis y fragilidad de la pared aórtica²⁶², que bien podría relacionarse con un envejecimiento celular en estos pacientes que podría aumentar la vulnerabilidad al desarrollo del AAT.

En conjunto, los resultados de esta tesis doctoral indican que en el AAT asociado a VAB existe una pérdida de CMVLs como consecuencia de una respuesta a un estrés oxidativo exacerbado, el cual incluye daños en el ADN nuclear y mitocondrial y a la detención del ciclo celular en la fase S, produciendo la apoptosis de las CMLVs con la correspondiente disminución de la capacidad de reparación tisular. Los intentos de adaptación a este ambiente por parte de las mitocondrias mediante la fusión mitocondrial y la biosíntesis; mecanismos que a priori son protectores, resultan insuficientes y dejan una pared debilitada y más vulnerable. Esto se manifiesta con un aumento de marcadores asociados al estrés oxidativo, como C1QTNF5; estrés en el RE, como THBS3 y FAP; un remodelamiento de la MEC alterado, con el aumento de SERPINE2; y reparación defectuosa, como se observa con el aumento de LAMA2 en CMLVs, además del aumento plasmático de C1QTNF5, LAMA2, LPCs y LPEs (Figura 46).

Las dianas terapéuticas más plausibles para este tipo de AAT son aquellas que rompan el círculo ROS-estrés en el RE-daño en el ADN-disfunción mitocondrial.

En los últimos años, los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias han suscitado un gran interés, ya que pueden suprimir directamente el daño oxidativo en su origen. MitoQ, un derivado de la coenzima Q10, es uno de los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias más populares, ya que permite mantener y restaurar la función mitocondrial. La suplementación

con MitoQ podría reducir el daño al ADN nuclear y al ADN mitocondrial, como se observa en el músculo esquelético de pacientes tras la realización de ejercicio²⁶³. Este compuesto también podría mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes en las mitocondrias y aliviar el estrés oxidativo, como ocurre en pacientes con daño y degeneración testicular y en pacientes hipertensos^{264,265}. También tiene efectos beneficiosos en la función cardiovascular de personas mayores sanas²⁶⁶ y alivia la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica en ratas con diabetes tipo 2²⁶⁷. Reducir los niveles de ADN mitocondrial cuando hay un estrés oxidativo exacerbado podría ser una estrategia para reducir la producción de ROS. El factor de transcripción HIF-1 α podría ser una molécula terapéutica en este caso, ya que inhibe la cadena respiratoria, evitando la sobreproducción de ROS y aliviando el estrés oxidativo²⁶⁸. La nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH) es la materia prima para la producción de superóxido en las mitocondrias. Los suplementos de NAD son beneficiosos para mejorar el metabolismo energético, mantener la función mitocondrial, ayudar a la reparación del ADN y combatir el envejecimiento. Algunos estudios han demostrado que los suplementos orales de ribósido de nicotinamida (RN), una forma de vitamina B3 que actúa como precursor del NAD⁺, favorecen la producción de energía y la salud celular²⁶⁹. La administración oral de RN aumenta el metabolismo del NAD y con ello una mejora clínica en pacientes con Parkinson²⁷⁰. En modelos murinos de hipertensión pulmonar, el ácido 4-fenilbutírico y el ácido tauroursodeoxicólico son capaces de disminuir los indicadores de estrés en el RE de CMLVs de arteria pulmonar, mejoran la función mitocondrial, reducen el remodelado vascular patológico y favorecen la proliferación de estas células²⁷¹, luego podrían ser una herramienta terapéutica efectiva para los pacientes con AAT y VAB. En este contexto, compuestos como la curcumina, masoprocol y salubrinal también reducen el estrés del RE en condiciones de estrés oxidativo mediante la modulación del eje PERK/eIF2 α ²⁷² que, además, es una de las vías principales de la respuesta a proteínas mal plegadas. En el contexto de la enfermedad cardiovascular, se observa una disminución de la apoptosis de los cardiomiocitos inducida por estrés del RE, una mejora en la función del mismo y protección frente al daño oxidativo cuando se le administra a ratones con infarto de miocardio compuestos como el salubrinal o activadores de la sirtuina 1, como el resveratrol. Este compuesto incrementa la actividad de la sirtuina 1, que actúa como “sensor metabólico” respondiendo a los niveles de NAD⁺ y ajustando la actividad celular para promover la supervivencia de las células bajo condiciones de estrés²⁷³. Los fármacos antihiperlipémicos, como la metformina, agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) o inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) reducen el estrés oxidativo y disminuyen el estrés del RE en modelos relacionados con riesgo cardiovascular²⁷⁴.

Una combinación optimizada de todas estas aproximaciones podría servir como terapia para los pacientes con AAT asociado a VAB. En este grupo de pacientes, tras los resultados obtenidos en esta tesis, proponemos a C1QTNF5 como marcador plasmático de progresión del AAT en estos pacientes, ya que, además de presentar una concentración diferencial en plasma entre pacientes con y sin dilatación en la aorta torácica, la concentración correlaciona con el diámetro aórtico de los pacientes.

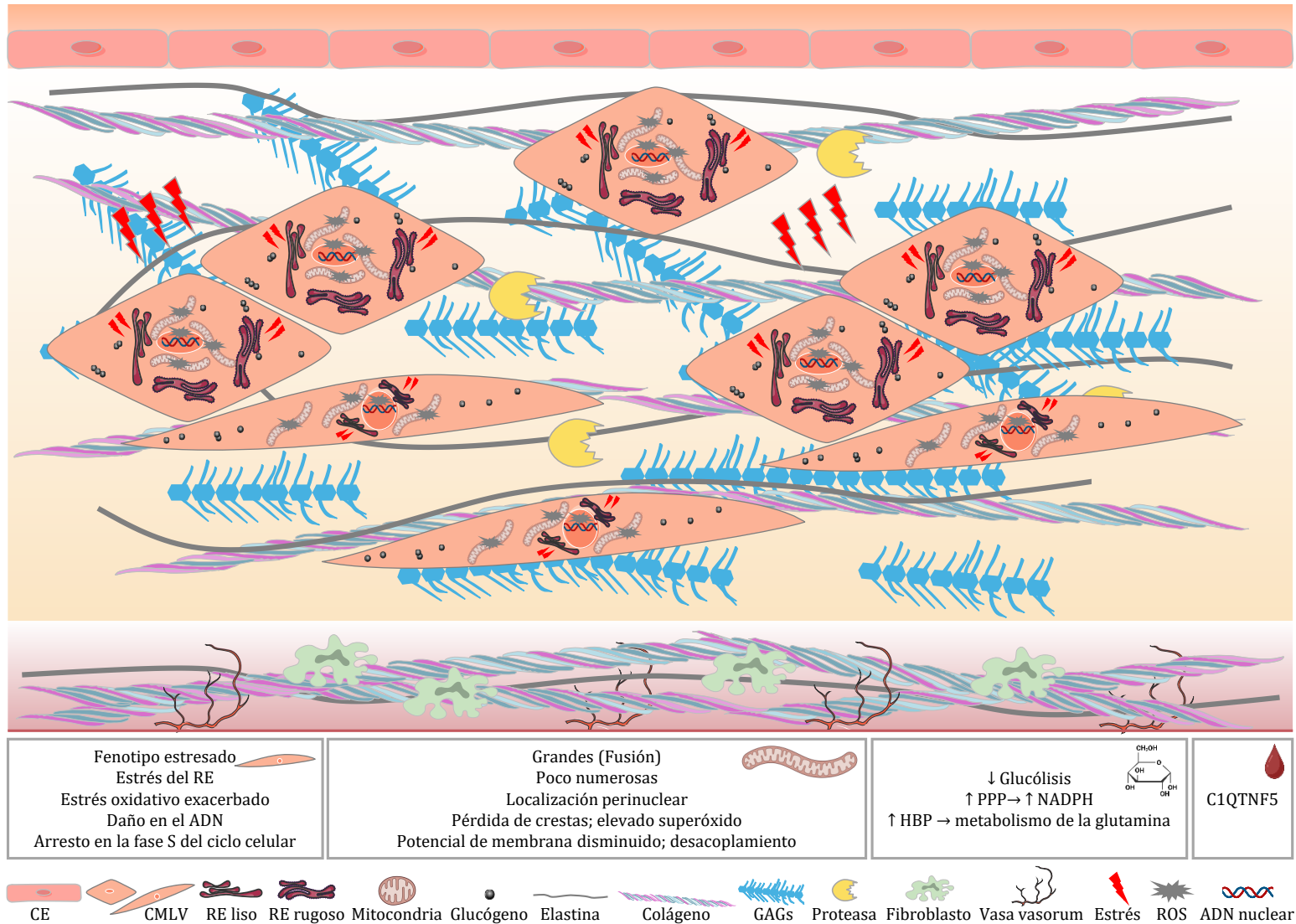


Figura 46. Aneurisma aórtico torácico asociado a una válvula aórtica bicúspide. El VAB-AAT se caracteriza por tener CMLVs con un fenotipo estresado, estrés en el RE, un ambiente de estrés oxidativo exacerbado, daño en el ADN de las CMLVs y apoptosis; disfunción mitocondrial con mitocondrias grandes y poco numerosas, estresadas y con desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP; reprogramación PPP/HBP; y C1QTNF5 como marcador de dilatación.

Los datos integrados en esta tesis demuestran que el AAT no sindrómico se desarrolla sobre una base común de desbalance entre reparación/capacidad compensatoria y daño persistente, pero que las trayectorias moleculares y metabólicas difieren sustancialmente según el tipo valvular. El VAT-AAT está dominado por un eje inflamatorio-alteración de la MEC (aumento de HBP, acumulación de GAGs; acilcarnitinas y FAP en plasma), mientras que el VAB-AAT se caracteriza por un ambiente de estrés oxidativo exacerbado, con estrés del RE, daño en el ADN de las CMLVs, disfunción mitocondrial y reprogramación PPP/HBP, que lleva al aumento de C1QTNF5, LAMA2, LPCs y LPEs en plasma y, finalmente, a la apoptosis de las CMLVs. Estas diferencias ponen de manifiesto la necesidad de estratificar a los pacientes de AAT en función del tipo valvular para llevar a cabo intervenciones terapéuticas dirigidas y específicas, que podrían ir desde moduladores de la síntesis de GAGs y antiinflamatorios específicos en VAT-AAT, hasta terapias anti-ROS, protectoras de la mitocondria y agentes que mitiguen el estrés del RE en VAB-AAT.

CONCLUSIONES

1. Las CMLVs de pacientes con AAT no sindrómico asociado a VAB muestran un fenotipo de estrés relacionado con homeostasis proteica y un estrés oxidativo exacerbado al que responden con una activación de la respuesta al daño del ADN, detención en la fase S del ciclo celular y apoptosis.
2. Las mitocondrias de pacientes con AAT y VAT muestran una reprogramación metabólica con un efecto compensatorio que mantiene la producción de ATP. Las mitocondrias del AAT asociado a VAB sufren un remodelado como respuesta adaptativa al elevado estrés oxidativo ambiental que, sin embargo, es perjudicial a largo plazo.
3. Los pacientes con AAT utilizan la glucosa a través de la vía biosintética de las hexosaminas, independientemente de la válvula aórtica. En pacientes con VAT, esto deriva en una acumulación de GAGs en la capa media aórtica que compromete la integridad arterial. Los pacientes con VAB muestran, además, un uso de la glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato con fines antioxidantes y biosintéticos.
4. La proteína FAP y el lípido miristoilcarnitina se proponen como marcadores de diagnóstico y seguimiento del AAT asociado a VAT. La proteína C1QTNF5 para los pacientes con AAT y VAB.
5. Se proponen fármacos dirigidos a evitar la acumulación de GAGs y a disminuir la inflamación en pacientes con AAT y VAT. En pacientes con AAT y VAB podría ser beneficioso el tratamiento con antioxidantes mitocondriales, terapias que disminuyan el estrés del retículo endoplásmico y estrategias que favorezcan una disminución del estrés oxidativo en general.
6. Los resultados de esta tesis doctoral evidencian que el AAT se desarrolla de modo diferente en pacientes con VAT y VAB. Es esencial estratificar el AAT en función del tipo valvular y considerar a estos pacientes como dos entidades clínicas independientes para un diagnóstico y terapia acertados en una medicina personalizada.

LIMITACIONES

La principal limitación de esta tesis doctoral coincide con uno de sus mayores valores: el empleo de tejido aórtico humano. Trabajar con aortas humanas supone un número limitado de muestras disponibles. Además, es limitante el tamaño de las biopsias, especialmente cuando provienen de pacientes sin dilatación aórtica (controles).

En el caso de los análisis realizados en las CMLVs, el tamaño de la biopsia ha condicionado el aislamiento de CMLVs para la obtención de cultivos primarios, limitando el tamaño muestral. Para minimizar esta limitación, se han empleado técnicas proteómicas de alto rendimiento y flujos de trabajo establecidos, se han incluido cohortes de pacientes independientes en los análisis a lo largo del estudio y se han realizado análisis funcionales que confirman los datos ómicos no dirigidos. La investigación con células incluye otra limitación y es que no pueden excluirse por completo las alteraciones propias del cultivo celular. Para minimizarlas, las CMLVs analizadas se encontraban en el menor pase posible, siendo este homogéneo entre todas las muestras de estudio.

En el estudio mitocondrial, la principal limitación ha sido obtener un rendimiento suficiente de mitocondrias a partir del reducido tamaño de la biopsia aórtica humana de origen. Además, el enriquecimiento mitocondrial se realizó en tejido congelado, debido a la imposibilidad de hacerlo en fresco, lo que, en principio, podría afectar a la integridad y supervivencia de la mitocondria. Estos problemas se han contrarrestado mediante la optimización del protocolo de aislamiento y el empleo de una metodología y condiciones de almacenamiento de las muestras de tejido iguales en todos los casos, haciendo que el tejido se viese afectado de la menor manera posible y con el mayor grado de similitud entre todas las muestras almacenadas. Además, se han realizado controles del protocolo de extracción mediante dos técnicas diferentes: Western blot y microscopía electrónica. Al igual que en el caso anterior, el limitado número de muestras empleadas en la investigación sin sesgo se contrarrestó con el uso de cohortes independientes complementarias en estudios funcionales que confirmaron los datos ómicos y presentaron consistencia entre las distintas cohortes analizadas.

En el caso de los análisis metabólicos, también existió una disponibilidad limitada de muestras aórticas humanas y se recurrió al análisis de cohortes independientes en los distintos ensayos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En esta tesis doctoral, se han realizado estudios *in-situ*, superando la dificultad de trabajar con aortas humanas para tener una información local de los mecanismos operantes. Una visión complementaria y avanzada de los resultados que se muestran la proporcionaría un estudio con resolución espacial. Esta es cada día más importante en el marco de la investigación clínica.

Una de las vías para este tipo de análisis es realizar estudios de microdissección láser dirigidos por histología, seguidos de estudios moleculares sin sesgo en equipos de alta resolución. Mediante dos estancias como investigadora predoctoral en la Unidad de Histopatología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y en el laboratorio de Proteómica Cardiovascular del CNIC, he llevado a cabo la microdissección de las capas media y adventicia de aortas humanas y su posterior análisis por espectrometría de masas para la identificación de cambios proteicos clave en el desarrollo del AAT en pacientes con VAT y VAB, localizados específicamente en estas áreas particulares. Los datos obtenidos, en los cuales nos encontramos actualmente trabajando, arrojarán luz sobre el desarrollo de la enfermedad y pondrán de manifiesto potenciales dianas terapéuticas en su localización arterial. Esta línea de trabajo se complementa con estudios en marcha por espectrometría de masas de imagen en colaboración con el M4I Maastricht MultiModal Molecular Imaging Institute y la Universidad de Maastricht.

Por otro lado, esta tesis doctoral refleja un papel clave de la mitocondria en el desarrollo del AAT no sindrómico a través de su implicación en la homeostasis de la pared arterial. El estudio en detalle de sus capacidades energética y biosintética contribuirá a descifrar su funcionalidad en el AAT en función del tipo valvular del paciente.

Esta tesis doctoral ha supuesto el establecimiento de una nueva línea de investigación en el grupo. Este trabajo ha permitido confirmar la hipótesis de trabajo inicial, que planteaba la necesidad de estudiar de manera diferenciada las dos formas de aneurisma, la asociada a la válvula tricúspide y a la válvula bicúspide. Los resultados obtenidos han sentado las bases para el desarrollo de nuevos proyectos, actualmente financiados por el ISCIII, y constituyen el punto de partida para nuevos abordajes de investigación y tesis doctorales del grupo en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hallmann, R. *et al.* Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2004>.-Endothelial (2005) doi:10.1152/physrev.00014.2004.-Endothelial.
2. Yurchenco, P. D. Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–27 (2011).
3. Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P. & Laurent, S. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: Relevance in development, aging, and disease. *Physiol Rev* **97**, 1555–1617 (2017).
4. Ozsvar, J. *et al.* Tropoelastin and Elastin Assembly. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643110> (2021).
5. Clark, J. M. & Glagov, S. *Transmural Organization of the Arterial Media The Lamellar Unit Revisited*. <http://ahajournals.org>.
6. Tsamis, A., Krawiec, J. T. & Vorp, D. A. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: A review. *Journal of the Royal Society Interface* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1004> (2013).
7. Taghizadeh, H., Tafazzoli-Shadpour, M., Shadmehr, M. B. & Fatouraei, N. Evaluation of biaxial mechanical properties of aortic media based on the lamellar microstructure. *Materials* **8**, 302–316 (2015).
8. Karimi, A. & Milewicz, D. M. Structure of the Elastin-Contractile Units in the Thoracic Aorta and How Genes That Cause Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections Disrupt This Structure. *Canadian Journal of Cardiology* vol. 32 26–34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.11.004> (2016).
9. Wang, R., Yu, X. & Zhang, Y. Mechanical and structural contributions of elastin and collagen fibers to interlamellar bonding in the arterial wall. *Biomech Model Mechanobiol* **20**, 93–106 (2021).
10. Wang, X. & Khalil, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. in *Advances in Pharmacology* vol. 81 241–330 (Academic Press Inc., 2018).
11. Beenakker, J. W. M., Ashcroft, B. A., Lindeman, J. H. N. & Oosterkamp, T. H. Mechanical properties of the extracellular matrix of the aorta studied by enzymatic treatments. *Biophys J* **102**, 1731–1737 (2012).
12. Stenmark, K. R. *et al.* The adventitia: Essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual Review of Physiology* vol. 75 23–47 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802> (2013).
13. Majesky, M. W. Adventitia and perivascular cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 35 e31–e35 Preprint at <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306088> (2015).
14. Majesky, M. W., Dong, X. R., Hogg, V., Daum, G. & Mahoney, W. M. The adventitia: A progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs* **195**, 73–81 (2011).
15. Jolly, A. J. *et al.* Heterogeneous subpopulations of adventitial progenitor cells regulate vascular homeostasis and pathological vascular remodelling. *Cardiovascular*

- Research* vol. 118 1452–1465
Preprint at
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab174> (2022).
16. Czerny, M. *et al.* EACTS/STS Guidelines for diagnosing and treating acute and chronic syndromes of the aortic organ. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* vol. 65 Preprint at <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezad426> (2024).
 17. Avril, S. *Chapter 10: Aortic and Arterial Mechanics.* (2018).
 18. Fletcher, A. J., Syed, M. B. J., Aitman, T. J., Newby, D. E. & Walker, N. L. Inherited Thoracic Aortic Disease: New Insights and Translational Targets. *Circulation* vol. 141 1570–1587 Preprint at <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043756> (2020).
 19. Sherif, H. M. F. Heterogeneity in the Segmental Development of the Aortic Tree. *AORTA* **2**, 186–195 (2014).
 20. Chen, J. & Chang, R. Association of TGF- β Canonical Signaling-Related Core Genes With Aortic Aneurysms and Aortic Dissections. *Frontiers in Pharmacology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.888563> (2022).
 21. Mazzolai, L. *et al.* 2024 ESC Guidelines for the management of peripheral arterial and aortic diseases: Developed by the task force on the management of peripheral arterial and aortic diseases of the European Society of Cardiology (ESC Endorsed by the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS, the European Reference Network on Rare Multisystemic Vascular Diseases (VASCERN, and the European Society of Vascular Medicine (ESVM). *Eur Heart J* **45**, 3538–3700 (2024).
 22. Rylski, B. *et al.* Modeling of predissection aortic size in acute type A dissection: More than 90% fail to meet the guidelines for elective ascending replacement. in *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* vol. 148 944–948.e1 (2014).
 23. Pham, M. H. C. *et al.* Normal values of aortic dimensions assessed by multidetector computed tomography in the Copenhagen General Population Study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **20**, 939–948 (2019).
 24. Pinard, A., Jones, G. T. & Milewicz, D. M. Genetics of Thoracic and Abdominal Aortic Diseases: Aneurysms, Dissections, and Ruptures. *Circulation Research* vol. 124 588–606 Preprint at <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312436> (2019).
 25. Guo, D. C., Papke, C. L., He, R. & Milewicz, D. M. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. in *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1085 339–352 (Blackwell Publishing Inc., 2006).
 26. Wu, H. *et al.* Comparative analysis of thoracic and abdominal aortic aneurysms across the segment and species at the single-cell level. *Front Pharmacol* **13**, (2023).
 27. Gyftopoulos, A., Ziganshin, B. A., Elefteriades, J. A. & Ochoa Chara, C. I. Comparison of Genes Associated with Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *AORTA* vol. 11 125–134 Preprint at <https://doi.org/10.1055/s-0043-57266> (2022).
 28. Pace, W. A. *et al.* Ascending thoracic aortic aneurysm size at presentation

- and growth by diameter. *Clin Radiol* **78**, e1057–e1064 (2023).
29. Hagan, P. G. *et al.* *The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD) New Insights Into an Old Disease.* *JAMA* vol. 283 www.jama.com (2000).
 30. Obel, L. M. *et al.* The Nonsyndromic Ascending Thoracic Aorta in a Population-Based Setting: A 5-Year Prospective Cohort Study. *J Am Coll Cardiol* **85**, 818–831 (2025).
 31. Boczar, K. E. *et al.* Sex Differences in Thoracic Aortic Aneurysm Growth: Role of Aortic Stiffness. *Hypertension* **73**, 190–196 (2019).
 32. El-Hamamsy, I. & Yacoub, M. H. Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nature Reviews Cardiology* vol. 6 771–786 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.191> (2009).
 33. Verstraeten, A., Luyckx, I. & Loeys, B. Aetiology and management of hereditary aortopathy. *Nature Reviews Cardiology* vol. 14 197–208 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.211> (2017).
 34. Weinsaft, J. W. *et al.* *Aortic Dissection in Patients With Genetically Mediated Aneurysms Incidence and Predictors in the GenTAC Registry.* (2016).
 35. Faggion Vinholo, T., Zafar, M. A., Ziganshin, B. A. & Elefteriades, J. A. Nonsyndromic Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections—Is Screening Possible? *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* vol. 31 628–634 Preprint at <https://doi.org/10.1053/j.semctvs.2019.05.035> (2019).
 36. Martin-Blazquez, A., Heredero, A., Aldamiz-Echevarria, G., Martin-Lorenzo, M. & Alvarez-Llamas, G. Non-syndromic thoracic aortic aneurysm: cellular and molecular insights. *Journal of Pathology* vol. 254 229–238 Preprint at <https://doi.org/10.1002/path.5683> (2021).
 37. Elefteriades, J. A., Zafar, M. A. & Ziganshin, B. A. Genetics of aortic aneurysm disease: 10 key points for the practitioner. *JTCVS Open* vol. 21 58–63 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.xjon.2024.07.014> (2024).
 38. Renard, M. *et al.* Clinical Validity of Genes for Heritable Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *J Am Coll Cardiol* **72**, 605–615 (2018).
 39. Salmasi, M. Y. *et al.* High Wall Shear Stress can Predict Wall Degradation in Ascending Aortic Aneurysms: An Integrated Biomechanics Study. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, (2021).
 40. Manopoulos, C., Seferlis, K., Raptis, A., Kouerinis, I. & Mathioulakis, D. Mechanics of ascending aortic aneurysms based on a modulus of elasticity dependent on aneurysm diameter and pressure. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* **28**, 238–253 (2025).
 41. Kiema, M. *et al.* Wall Shear Stress Predicts Media Degeneration and Biomechanical Changes in Thoracic Aorta. *Front Physiol* **13**, (2022).
 42. Chung, J. *et al.* Energy loss, a novel biomechanical parameter, correlates with aortic aneurysm size and histopathologic findings. in *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* vol. 148 1082–1089 (Mosby Inc., 2014).

43. Yamashiro, Y. *et al.* Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans. *Circ Res* **123**, 660–672 (2018).
44. Pasta, S. *et al.* Shear Stress and Aortic Strain Associations With Biomarkers of Ascending Thoracic Aortic Aneurysm. *Annals of Thoracic Surgery* **110**, 1595–1604 (2020).
45. Rabkin, S. W. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm—comparison with and without bicuspid aortic valve: A meta-analysis. *Vasa - European Journal of Vascular Medicine* **43**, 433–442 (2014).
46. Humphrey, J. D., Schwartz, M. A., Tellides, G. & Milewicz, D. M. Role of mechanotransduction in vascular biology: Focus on thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation Research* vol. 116 1448–1461 Preprint at <https://doi.org/10.1161/CIRCRESA.HA.114.304936> (2015).
47. Shi, J., Yang, Y., Cheng, A., Xu, G. & He, F. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **319**, 613–631 (2020).
48. Barallobre-Barreiro, J. *et al.* Extracellular Matrix in Vascular Disease, Part 2/4: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 75 2189–2203 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.018> (2020).
49. Cikach, F. S. *et al.* Massive aggrecan and versican accumulation in thoracic aortic aneurysm and dissection. *JCI Insight* **3**, 1–16 (2018).
50. Rai, P. *et al.* Is There Enough Evidence to Support the Role of Glycosaminoglycans and Proteoglycans in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection?—A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms23169200> (2022).
51. Rombouts, K. B. *et al.* The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections. *European Journal of Clinical Investigation* vol. 52 Preprint at <https://doi.org/10.1111/eci.13697> (2022).
52. Liu, X., Ilseng, A., Prot, V., Skallerud, B. H. & Holzapfel, G. A. Swelling of interlamellar GAGs/PGs as an initiation mechanism for aortic dissection: constitutive modeling and numerical simulations. *Mech Soft Mater* **4**, (2022).
53. Fava, M. *et al.* Role of ADAMTS-5 in aortic dilatation and extracellular matrix remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 1537–1548 (2018).
54. Irace, F. G. *et al.* Role of Oxidative Stress and Autophagy in Thoracic Aortic Aneurysms. *JACC Basic Transl Sci* **6**, 719–730 (2021).
55. Pisano, C., Benedetto, U., Ruvolo, G. & Balistreri, C. R. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Aorta Diseases as a Source of Potential Biomarkers and Therapeutic Targets, with a Particular Focus on Ascending Aorta Aneurysms. *Antioxidants* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antiox11020182> (2022).

56. Branchetti, E. *et al.* Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm. *Cardiovasc Res* **100**, 316–324 (2013).
57. Gao, J. *et al.* The mechanism and therapy of aortic aneurysms. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01325-7> (2023).
58. Annesley, S. J. & Fisher, P. R. Mitochondria in health and disease. *Cells* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells8070680> (2019).
59. Gutierrez, P. S., Piubelli, M. L. M., Naal, K. G., Dias, R. R. & Borges, L. F. Mitochondria in aneurysms and dissections of the human ascending aorta. *Cardiovascular Pathology* **47**, (2020).
60. Marcos-Ríos, D. *et al.* Mitochondrial Dysfunction: A New Hallmark in Hereditary Thoracic Aortic Aneurysm Development. *Cells* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells14080618> (2025).
61. Kessler, K. *et al.* Angiogenesis and remodelling in human thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc Res* **104**, 147–159 (2014).
62. Suh, J. H., Yoon, J. S., Kim, H. W. & Jo, K. H. Adventitial fibroblast abnormality in thoracic aortic aneurysms and aortic dissections. *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **44**, 406–412 (2011).
63. van de Pol, V., Kurakula, K., DeRuiter, M. C. & Goumans, M. J. Thoracic aortic aneurysm development in patients with bicuspid aortic valve: What is the role of endothelial cells? *Frontiers in Physiology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00938> (2017).
64. Malashicheva, A. *et al.* Phenotypic and Functional Changes of Endothelial and Smooth Muscle Cells in Thoracic Aortic Aneurysms. *Int J Vasc Med* **2016**, (2016).
65. Billaud, M., Hill, J. C., Richards, T. D., Gleason, T. G. & Phillippi, J. A. Medial Hypoxia and Adventitial Vasa Vasorum Remodeling in Human Ascending Aortic Aneurysm. *Front Cardiovasc Med* **5**, (2018).
66. Jones, J. A. *et al.* Cellular phenotype transformation occurs during thoracic aortic aneurysm development. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **140**, 653–659 (2010).
67. Jones, J. A., Spinale, F. G. & Ikonomidis, J. S. Transforming growth factor-beta signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis. *J Vasc Res.* **46**, 119–137 (2009).
68. Tingting, T. *et al.* The TGF- β pathway plays a key role in aortic aneurysms. *Clinica Chimica Acta* vol. 501 222–228 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.042> (2020).
69. Saito, T. *et al.* Importance of endothelial NF- κ B signalling in vascular remodelling and aortic aneurysm formation. *Cardiovasc Res* **97**, 106–114 (2013).
70. Saeyeldin, A. A. *et al.* Thoracic aortic aneurysm: unlocking the “silent killer” secrets. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery* vol. 67 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11748-017-0874-x> (2019).

71. Siu, S. C. & Silversides, C. K. Bicuspid Aortic Valve Disease. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 55 2789–2800 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.12.068> (2010).
72. Kong, W. K. F. *et al.* Sex Differences in Phenotypes of Bicuspid Aortic Valve and Aortopathy: Insights from a Large Multicenter, International Registry. *Circ Cardiovasc Imaging* **10**, (2017).
73. Liu, T. *et al.* Bicuspid aortic valve: An update in morphology, genetics, biomarker, complications, imaging diagnosis and treatment. *Front Physiol* **10**, (2019).
74. Verma, S. & Siu, S. C. Aortic Dilatation in Patients with Bicuspid Aortic Valve. *New England Journal of Medicine* **370**, 1920–1929 (2014).
75. Park, K. H., Chung, S., Kim, D. J., Kim, J. S. & Lim, C. Natural history of moderately dilated tubular ascending aorta: Implications for determining the optimal imaging interval. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* **51**, 959–964 (2017).
76. Nissen, A. P. *et al.* Surgical repair of bicuspid aortopathy at small diameters: Clinical and institutional factors. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **159**, 2216–2226.e2 (2020).
77. Phillippi, J. A. *et al.* Mechanism of aortic medial matrix remodeling is distinct in patients with bicuspid aortic valve. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **147**, 1056–1064 (2014).
78. Verma, S. & Siu, S. C. Aortic Dilatation in Patients with Bicuspid Aortic Valve. *New England Journal of Medicine* **370**, 1920–1929 (2014).
79. Magouliotis, D. E. *et al.* Epigenetic Biomarkers in Thoracic Aortic Aneurysm, Dissection, and Bicuspid Aortopathy: A Comprehensive Review. *Biomolecules* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom15040568> (2025).
80. Harrison, O. J. *et al.* Defective NOTCH signalling drives smooth muscle cell death and differentiation in bicuspid aortic valve aortopathy. in *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* vol. 56 117–125 (European Association for Cardio-Thoracic Surgery, 2019).
81. Naito, S. *et al.* Bicuspid aortopathy—molecular involvement of microRNAs and MMP-TIMP. *Biomarkers* **25**, 711–718 (2020).
82. Maleki, S. *et al.* Endothelial/Epithelial Mesenchymal Transition in Ascending Aortas of Patients With Bicuspid Aortic Valve. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00182> (2019).
83. Freiholtz, D. *et al.* Bicuspid aortic valve aortopathy is characterized by embryonic endothelial to mesenchymal transition and endothelial instability. *Atherosclerosis* **379**, S54 (2023).
84. Guzzardi, D. G. *et al.* Valve-Related Hemodynamics Mediate Human Bicuspid Aortopathy Insights From Wall Shear Stress Mapping. (2015).
85. van de Pol, V., Kurakula, K., DeRuiter, M. C. & Goumans, M. J. Thoracic aortic aneurysm development in patients with bicuspid aortic valve: What is the role of endothelial cells? *Frontiers in Physiology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00938> (2017).

86. Singh, V., Kaur, R., Kumari, P., Pasricha, C. & Singh, R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clinica Chimica Acta* vol. 548 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117487> (2023).
87. Sucusky, P., Balachandran, K., Elhammali, A., Jo, H. & Yoganathan, A. P. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF- β 1-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 254–260 (2009).
88. Chiu, J. J. *et al.* Shear Stress Increases ICAM-1 and Decreases VCAM-1 and E-selectin Expressions Induced by Tumor Necrosis Factor- α in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 73–79 (2004).
89. Billaud, M. *et al.* Elevated oxidative stress in the aortic media of patients with bicuspid aortic valve. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **154**, 1756–1762 (2017).
90. Pozo-Vilumbrales, B. *et al.* Unraveling the molecular complexity of bicuspid aortopathy: Lessons from comparative proteomics. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1871**, (2025).
91. Antequera-González, B., Martínez-Micaelo, N. & Alegret, J. M. Bicuspid Aortic Valve and Endothelial Dysfunction: Current Evidence and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Physiology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01015> (2020).
92. Kuzmik, G. A., Sang, A. X. & Elefteriades, J. A. Natural history of thoracic aortic aneurysms. *J Vasc Surg* **56**, 565–571 (2012).
93. Sidloff, D. *et al.* Mortality from thoracic aortic diseases and associations with cardiovascular risk factors. *Circulation* **130**, 2287–2294 (2014).
94. Evangelista, A. *et al.* Multimodality imaging in thoracic aortic diseases: a clinical consensus statement from the European Association of Cardiovascular Imaging and the European Society of Cardiology working group on aorta and peripheral vascular diseases. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **24**, E65–E85 (2023).
95. Yao, J., Bai, T., Yang, B. & Sun, L. The diagnostic value of D-dimer in acute aortic dissection: a meta-analysis. *Journal of Cardiothoracic Surgery* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s13019-021-01726-1> (2021).
96. Sbarouni, E., Georgiadou, P., Marathias, A., Geroulanos, S. & Kremastinos, D. T. D-dimer and BNP levels in acute aortic dissection. *Int J Cardiol* **122**, 170–172 (2007).
97. Papakonstantinou, N. A. & Rorris, F. P. Elective replacement of the ascending aorta: Is the 5.5-cm threshold appropriate? The insidious, small aorta. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* vol. 59 554–561 Preprint at <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa387> (2021).
98. Pape, L. 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* **116**, 1120–1127 (2007).

99. Nienaber, C. A. *et al.* Gender-related differences in acute aortic dissection. *Circulation* **109**, 3014–3021 (2004).
100. Cheung, K. *et al.* Thoracic aortic aneurysm growth: Role of sex and aneurysm etiology. *J Am Heart Assoc* **6**, (2017).
101. Oladokun, D. *et al.* Systematic Review of the Growth Rates and Influencing Factors in Thoracic Aortic Aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* vol. 51 674–681 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2016.01.017> (2016).
102. Rylski, B. *et al.* Acute type A aortic dissection extending beyond ascending aorta: Limited or extensive distal repair. in *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* vol. 148 949–954 (2014).
103. Levine, G. N. *et al.* Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension* **71**, 1269–1324 (2018).
104. Williams, B. *et al.* 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* vol. 39 3021–3104 Preprint at <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339> (2018).
105. Janetzki, J. L. *et al.* Risk of aortic aneurysm or dissection following use of fluoroquinolones: a retrospective multinational network cohort study. *EClinicalMedicine* **81**, (2025).
106. Jovin, I. S. *et al.* Comparison of the effect on long-term outcomes in patients with thoracic aortic aneurysms of taking versus not taking a statin drug. *American Journal of Cardiology* **109**, 1050–1054 (2012).
107. Nogi, M. *et al.* Small GTP-Binding Protein GDP Dissociation Stimulator Prevents Thoracic Aortic Aneurysm Formation and Rupture by Phenotypic Preservation of Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation* **138**, 2413–2433 (2018).
108. Oller, J. *et al.* Extracellular Tuning of Mitochondrial Respiration Leads to Aortic Aneurysm. *Circulation* **143**, 2091–2109 (2021).
109. Mazzolai, L. *et al.* 2024 ESC Guidelines for the management of peripheral arterial and aortic diseases: Developed by the task force on the management of peripheral arterial and aortic diseases of the European Society of Cardiology (ESC Endorsed by the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Reference Network on Rare Multisystemic Vascular Diseases (VASCERN), and the European Society of Vascular Medicine (ESVM). *Eur Heart J* **45**, 3538–3700 (2024).
110. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* **6**, 359–362 (2009).
111. Orsburn, B. C. Proteome discoverer-a community enhanced data processing suite for protein informatics. *Proteomes* **9**, (2021).
112. Tabb, D. L. The SEQUEST Family Tree. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* vol. 26 1814–1819 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1201-3> (2015).
113. Wright, J. C. & Choudhary, J. S. DecoyPyrat: Fast Non-redundant Hybrid Decoy Sequence Generation for Large Scale Proteomics. *J Proteomics Bioinform* **09**, (2016).

114. Rodríguez, J. M. *et al.* iSanXoT: A standalone application for the integrative analysis of mass spectrometry-based quantitative proteomics data. *Comput Struct Biotechnol J* **23**, 452–459 (2024).
115. Trevisan-Herraz, M. *et al.* SanXoT: A modular and versatile package for the quantitative analysis of high-throughput proteomics experiments. *Bioinformatics* **35**, 1594–1596 (2019).
116. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. & Aebersold, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* **74**, 5383–5392 (2002).
117. Choi, H. & Nesvizhskii, A. I. False discovery rates and related statistical concepts in mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteome Research* vol. 7 47–50 Preprint at <https://doi.org/10.1021/pr700747q> (2008).
118. Bonzon-Kulichenko, E., Garcia-Marques, F., Trevisan-Herraz, M. & Vázquez, J. Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: Problems associated with the use of narrow mass precursor windows. *J Proteome Res* **14**, 700–710 (2015).
119. Navarro, P. *et al.* General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling. *J Proteome Res* **13**, 1234–1247 (2014).
120. García-Marqués, F. *et al.* A novel systems-biology algorithm for the analysis of coordinated protein responses using quantitative proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **15**, 1740–1760 (2016).
121. Huang, D. W. *et al.* Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Current Protocols in Bioinformatics* Preprint at <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1311s27> (2009).
122. Ritchie, M. E. *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**, e47 (2015).
123. Graille, M. *et al.* Urinary 8-isoprostane as a biomarker for oxidative stress. A systematic review and meta-analysis. *Toxicol Lett* **328**, 19–27 (2020).
124. Jenkins, B., West, J. A. & Koulman, A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease. *Molecules* vol. 20 2425–2444 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules20022425> (2015).
125. Li, Y. *et al.* Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Cell Populations and Differential Gene Expression Patterns in Control and Aneurysmal Human Aortic Tissue. *Circulation* **142**, 1374–1388 (2020).
126. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* vol. 461 1071–1078 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature08467> (2009).
127. Maréchal, A. & Zou, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).
128. Edelbrock, M. A., Kaliyaperumal, S. & Williams, K. J. DNA mismatch repair efficiency and fidelity are elevated during DNA synthesis in human cells. *Mutation Research - Fundamental and*

- Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **662**, 59–66 (2009).
129. Divakaruni, A. S. & Jastroch, M. A practical guide for the analysis, standardization and interpretation of oxygen consumption measurements. *Nature Metabolism* vol. 4 978–994 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00619-4> (2022).
 130. Barker, A. J. *et al.* Bicuspid aortic valve is associated with altered wall shear stress in the ascending aorta. *Circ Cardiovasc Imaging* **5**, 457–466 (2012).
 131. Maleki, S. *et al.* Identification of a novel flow-mediated gene expression signature in patients with bicuspid aortic valve. *J Mol Med* **91**, 129–139 (2013).
 132. Jia, L. X. *et al.* Mechanical stretch-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis and inflammation contribute to thoracic aortic aneurysm and dissection. *Journal of Pathology* **236**, 373–383 (2015).
 133. Davies, H. A. *et al.* Idiopathic degenerative thoracic aneurysms are associated with increased aortic medial amyloid. *Amyloid* **26**, 148–155 (2019).
 134. Parastatidis, I., Weiss, D., Joseph, G. & Taylor, W. R. Overexpression of catalase in vascular smooth muscle cells prevents the formation of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 2389–2396 (2013).
 135. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K. & Das, N. Role of Catalase in Oxidative Stress-And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, (2019).
 136. Afzal, M. S. G proteins: Binary switches in health and disease. *Central European Journal of Immunology* **45**, 364–367 (2021).
 137. Zhang, L., Yousefzadeh, M. J., Suh, Y., Niedernhofer, L. J. & Robbins, P. D. Signal transduction, ageing and disease. in *Subcellular Biochemistry* vol. 91 227–247 (Springer New York, 2019).
 138. Marei, H. & Malliri, A. Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms. *Small GTPases* vol. 8 139–163 Preprint at <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1211398> (2017).
 139. Loirand, G., Sauzeau, V. & Pacaud, P. Small G proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects. *Physiological and Pathological Aspects. Physiol Rev* **93**, 1659–1720 (2013).
 140. Blunder, S. *et al.* Targeted gene expression analyses and immunohistology suggest a pro-proliferative state in tricuspid aortic valve-, and senescence and viral infections in bicuspid aortic valve-associated thoracic aortic aneurysms. *Atherosclerosis* **271**, 111–119 (2018).
 141. Ong, G. & Logue, S. E. Unfolding the Interactions between Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Antioxidants* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antiox12050981> (2023).
 142. Lebeaupein, C., Blanc, M., Vallée, D., Keller, H. & Bailly-Maitre, B. BAX inhibitor-1: between stress and survival. *FEBS Journal* **287**, 1722–1736 (2020).
 143. Durdu, S. *et al.* Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cell Depletion via

- BCL2 Family of Proteins in Human Ascending Aortic Aneurysm and Dissection. *Cardiovasc Ther* **30**, 308–316 (2012).
144. Hordijk, P. L. Regulation of NADPH oxidases: The role of Rac proteins. *Circulation Research* vol. 98 453–462 Preprint at <https://doi.org/10.1161/01.RES.000.0204727.46710.5e> (2006).
145. Li, J. *et al.* Deficiency of Rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetes* **59**, 2033–2042 (2010).
146. Bokoch, G. M., Gianni, D., Kim, J. S. & Kao, Y. Y. Regulation of NADPH Oxidases by Rac GTPase. in *Handbook of Cell Signaling, Second Edition* vol. 2 1773–1780 (Elsevier, 2009).
147. Günesdogan, U., Jäckle, H. & Herzig, A. Histone supply regulates S phase timing and cell cycle progression. *Elife* **3**, e02443 (2014).
148. Alfieri, C., Zhang, S. & Barford, D. Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). *Open Biology* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rsob.170204> (2017).
149. Jiang, L. *et al.* PDRG1, a novel tumor marker for multiple malignancies that is selectively regulated by genotoxic stress. *Cancer Biol Ther* **11**, 567–573 (2011).
150. Blunder, S. *et al.* Characteristics of TAV- and BAV-associated thoracic aortic aneurysms-Smooth muscle cell biology, expression profiling, and histological analyses. *Atherosclerosis* **220**, 355–361 (2012).
151. Nastase, M. V., Young, M. F. & Schaefer, L. Biglycan: A Multivalent Proteoglycan Providing Structure and Signals. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **60**, 963–975 (2012).
152. Roedig, H., Nastase, M. V., Wygrecka, M. & Schaefer, L. Breaking down chronic inflammatory diseases: the role of biglycan in promoting a switch between inflammation and autophagy. *FEBS Journal* vol. 286 2965–2979 Preprint at <https://doi.org/10.1111/febs.14791> (2019).
153. Osorio-Conles, Ó. *et al.* Adipose tissue and serum CCDC80 in obesity and its association with related metabolic disease. *Molecular Medicine* **23**, 225–234 (2017).
154. Kjellqvist, S. *et al.* A combined proteomic and transcriptomic approach shows diverging molecular mechanisms in thoracic aortic aneurysm development in patients with tricuspid and bicuspid aortic valve. *Molecular and Cellular Proteomics* **12**, 407–425 (2013).
155. Sun, Y. *et al.* Inhibition of Fap Promotes Cardiac Repair by Stabilizing BNP. *Circ Res* **132**, 586–600 (2023).
156. Tierney, J. W. *et al.* Therapeutic MK2 inhibition blocks pathological vascular smooth muscle cell phenotype switch. *JCI Insight* **6**, (2021).
157. Tang, P. C. Y. *et al.* Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms. *Circulation* **112**, 1098–1105 (2005).
158. Osborne, B. *et al.* A rare variant in human fibroblast activation protein associated with ER stress, loss of enzymatic function and loss of cell surface localisation. *Biochim Biophys*

- Acta Proteins Proteom* **1844**, 1248–1259 (2014).
159. Chen, Y. *et al.* Correlation between Low THBS3 Expression in Peripheral Blood and Acute Myocardial Infarction. *Frontiers in Bioscience - Landmark* **27**, (2022).
 160. Bouton, M.-C. *et al.* Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. <https://doi.org/10.1182/blood> (2012) doi:10.1182/blood.
 161. Madjene, C., Boutigny, A., Bouton, M. C., Arocas, V. & Richard, B. Protease Nexin-1 in the Cardiovascular System: Wherefore Art Thou? *Frontiers in Cardiovascular Medicine* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.652852> (2021).
 162. Gomez, D. *et al.* Smad2-dependent protease nexin-1 overexpression differentiates chronic aneurysms from acute dissections of human ascending aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 2222–2232 (2013).
 163. Grover, S. P. & Mackman, N. Anticoagulant SERPINS: Endogenous Regulators of Hemostasis and Thrombosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.878199> (2022).
 164. Peng, M. *et al.* CTRP5-Overexpression Attenuated Ischemia-Reperfusion Associated Heart Injuries and Improved Infarction Induced Heart Failure. *Front Pharmacol* **11**, (2020).
 165. Majidi, Z. *et al.* The circulating levels of CTRP1 and CTRP5 are associated with obesity indices and carotid intima-media thickness (cIMT) value in patients with type 2 diabetes: a preliminary study. *Diabetol Metab Syndr* **13**, (2021).
 166. Li, C. *et al.* CTRP5 promotes transcytosis and oxidative modification of low-density lipoprotein and the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **278**, 197–209 (2018).
 167. David, D. C. Aging and the aggregating proteome. *Frontiers in Genetics* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00247> (2012).
 168. Miyoshi, N., Oubrahim, H., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. *Age-Dependent Cell Death and the Role of ATP in Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis and Necrosis*. <https://www.pnas.org> (2005).
 169. Blunder, S. *et al.* Characteristics of TAV- and BAV-associated thoracic aortic aneurysms-Smooth muscle cell biology, expression profiling, and histological analyses. *Atherosclerosis* **220**, 355–361 (2012).
 170. Tyrrell, D. J. *et al.* Aging Alters the Aortic Proteome in Health and Thoracic Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **42**, 1060–1076 (2022).
 171. Shah, N. R. & Mahmoudi, M. The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: A review. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* vol. 86 147–157 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2015.07.005> (2015).
 172. Angeloni, E., Vitaterna, A., Pirelli, M. & Refice, S. Effects of statin therapy on ascending aorta aneurysms growth: A propensity-matched analysis. *Int J Cardiol* **191**, 52–55 (2015).
 173. Liang, Z. *et al.* Analysis of mcm proteins' role as a potential target of

- statins in patients with acute type a aortic dissection through bioinformatics. *Genes (Basel)* **12**, (2021).
174. Marcos-Ríos, D., Rochano-Ortiz, A., Méndez-Barbero, N. & Oller, J. Defective Mitochondrial Respiration in Hereditary Thoracic Aneurysms. *Cells* **14**, (2025).
 175. Van Der Pluijm, I. *et al.* Decreased mitochondrial respiration in aneurysmal aortas of Fibulin-4 mutant mice is linked to PGC1A regulation. *Cardiovasc Res* **114**, 1776–1793 (2018).
 176. Stefens, S. J. M. *et al.* Increased vascular smooth muscle cell senescence in aneurysmal Fibulin-4 mutant mice. *npj Aging* **10**, (2024).
 177. Li, Y. *et al.* Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Cell Populations and Differential Gene Expression Patterns in Control and Aneurysmal Human Aortic Tissue. *Circulation* **142**, 1374–1388 (2020).
 178. Ledahawsky, L. M. *et al.* The mitochondrial protein Sideroflexin 3 (SFXN3) influences neurodegeneration pathways in vivo. *FEBS Journal* **289**, 3894–3914 (2022).
 179. Martin-Blazquez, A. *et al.* Analysis of Vascular Smooth Muscle Cells from Thoracic Aortic Aneurysms Reveals DNA Damage and Cell Cycle Arrest as Hallmarks in Bicuspid Aortic Valve Patients. *J Proteome Res* **23**, 3012–3024 (2024).
 180. Salabei, J. K. & Hill, B. G. Mitochondrial fission induced by platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle cell bioenergetics and cell proliferation. *Redox Biol* **1**, 542–551 (2013).
 181. Sun, W. *et al.* Fatty Acid Oxidation-Glycolysis Metabolic Transition Affects ECM Homeostasis in Silica-Induced Pulmonary Fibrosis. *Advanced Science* **12**, (2025).
 182. Randle, P. J., H. C. N., G. P. B., N. E. A. *The Glucose Fatty-Acid Cycle: Its Role in Insulin Sensitivity and the Metabolic Disturbances of Diabetes Mellitus.* (1963).
 183. Sugden, M. C. In appreciation of Sir Philip Randle: The glucose-fatty acid cycle. *British Journal of Nutrition* **97**, 809–813 (2007).
 184. Wang, L. *et al.* Causal relationship between mitochondrial proteins and risks of aortic aneurysms and aortic dissection: a Mendelian randomization study. *J Cardiothorac Surg* **20**, (2025).
 185. Abodulikemu, A., Li, L. & Juaiti, M. Causal role of mitochondrial proteins in aortic aneurysms: Evidence from Mendelian randomization, transcriptomic analysis, and experimental validation. *Medicine (United States)* **104**, e41757 (2025).
 186. Lionaki, E., Gkikas, I. & Tavernarakis, N. Mitochondrial protein import machinery conveys stress signals to the cytosol and beyond. *BioEssays* vol. 45 Preprint at <https://doi.org/10.1002/bies.202200160> (2023).
 187. Haastrup, M. O., Vikramdeo, K. S., Singh, S., Singh, A. P. & Dasgupta, S. The Journey of Mitochondrial Protein Import and the Roadmap to Follow. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms24032479> (2023).
 188. Pfanner, N., den Brave, F. & Becker, T. Mitochondrial protein import stress. *Nature Cell Biology* vol. 27 188–201

- Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01590-w> (2025).
189. Kunkel, G. H., Kunkel, C. J., Ozuna, H., Miralda, I. & Tyagi, S. C. TFAM overexpression reduces pathological cardiac remodeling. *Mol Cell Biochem* **454**, 139–152 (2019).
 190. Quintana-Cabrera, R. *et al.* Opa1 relies on cristae preservation and ATP synthase to curtail reactive oxygen species accumulation in mitochondria. *Redox Biol* **41**, (2021).
 191. Gong, T. *et al.* Glutamine metabolism in cancers: Targeting the oxidative homeostasis. *Frontiers in Oncology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.994672> (2022).
 192. Deberardinis, R. J. *et al.* *Beyond Aerobic Glycolysis: Transformed Cells Can Engage in Glutamine Metabolism That Exceeds the Requirement for Protein and Nucleotide Synthesis.* www.pnas.org/cgi/content/full/ (2007).
 193. Wang, J., Da, X., Chen, Y., Yuan, A. & Pu, J. Glutamine Protects against Mouse Abdominal Aortic Aneurysm through Modulating VSMC Apoptosis and M1 Macrophage Activation. *Int J Med Sci* **21**, 1414–1427 (2024).
 194. Videla, L. A., Marimán, A., Ramos, B., José Silva, M. & del Campo, A. Standpoints in mitochondrial dysfunction: Underlying mechanisms in search of therapeutic strategies. *Mitochondrion* vol. 63 9–22 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.12.006> (2022).
 195. Kim, K. H. & Lee, C. B. Socialized mitochondria: mitonuclear crosstalk in stress. *Experimental and Molecular Medicine* vol. 56 1033–1042 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01211-4> (2024).
 196. Joubert, F. & Puff, N. Mitochondrial cristae architecture and functions: Lessons from minimal model systems. *Membranes* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/membranes11070465> (2021).
 197. Gutierrez, P. S., Piubelli, M. L. M., Naal, K. G., Dias, R. R. & Borges, L. F. Mitochondria in aneurysms and dissections of the human ascending aorta. *Cardiovascular Pathology* **47**, (2020).
 198. Desai, R. *et al.* *Mitochondria Form Contact Sites with the Nucleus to Couple Prosurvival Retrograde Response.* *Sci. Adv* vol. 6 <https://www.science.org> (2020).
 199. Agarwal, S. & Ganesh, S. Perinuclear mitochondrial clustering, increased ROS levels, and HIF1 are required for the activation of HSF1 by heat stress. *J Cell Sci* **133**, (2020).
 200. Ryu, K. W. *et al.* Cellular ATP demand creates metabolically distinct subpopulations of mitochondria. *Nature* **635**, 746–754 (2024).
 201. Yang, Z. *et al.* Mitochondrial Membrane Remodeling. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.786806> (2022).
 202. Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., McQuibban, G. A. & Kim, P. K. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* **8**, 1462–1476 (2012).

203. Tavis, B. S., Peters, A. S., Böckler, D. & Dihlmann, S. Mitochondrial Dysfunction and Increased DNA Damage in Vascular Smooth Muscle Cells of Abdominal Aortic Aneurysm (AAA-SMC). *Oxid Med Cell Longev* **2023**, (2023).
204. Cheng, J. *et al.* Mitochondrial proton leak plays a critical role in pathogenesis of cardiovascular diseases. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 982 359–370 (Springer New York LLC, 2017).
205. Cheng, J. *et al.* Mitochondrial proton leak plays a critical role in pathogenesis of cardiovascular diseases. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 982 359–370 (Springer New York LLC, 2017).
206. Demine, S., Renard, P. & Arnould, T. Mitochondrial uncoupling: A key controller of biological processes in physiology and diseases. *Cells* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells8080795> (2019).
207. Xia, Y., Zhang, X., An, P., Luo, J. & Luo, Y. Mitochondrial Homeostasis in VSMCs as a Central Hub in Vascular Remodeling. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms24043483> (2023).
208. Zachery R. Jarrell, M. R. S. X. H. M. O. K. H. L. A. A. Q. D. P. J. Y.-M. G. Plasma acylcarnitine levels increase with healthy aging. *Aging* **12**, (2020).
209. Karalko, M. *et al.* Histopathological changes in dilated ascending aorta associated with aortic valve cuspidity. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* **59**, 1103–1108 (2021).
210. McCann, M. R., De la Rosa, M. V. G., Rosania, G. R. & Stringer, K. A. L-carnitine and acylcarnitines: Mitochondrial biomarkers for precision medicine. *Metabolites* vol. 11 1–21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/metabo11010051> (2021).
211. Makrecka-Kuka, M. *et al.* Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues. *Sci Rep* **7**, (2017).
212. Dambrova, M. *et al.* Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacological Reviews* vol. 74 506–551 Preprint at <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000408> (2022).
213. Zhao, S. *et al.* The Association Between Acylcarnitine Metabolites and Cardiovascular Disease in Chinese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, (2020).
214. Kalim, S. *et al.* A plasma long-chain acylcarnitine predicts cardiovascular mortality in incident dialysis patients. *J Am Heart Assoc* **2**, (2013).
215. Shimizu, I., Yoshida, Y., Suda, M. & Minamino, T. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metabolism* vol. 20 967–977 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.10.008> (2014).
216. Gonzalez-Granda, A., Damms-Machado, A., Basrai, M. & Bischoff, S. C. Changes in plasma acylcarnitine and lysophosphatidylcholine levels following a high-fructose diet: A targeted metabolomics study in healthy women. *Nutrients* **10**, (2018).
217. Wang, S. *et al.* Association of serum metabolites with impaired fasting glucose/diabetes and traditional risk factors for metabolic disease in

- Chinese adults. *Clinica Chimica Acta* **487**, 60–65 (2018).
218. Rivas Serna, I. M. *et al.* Lipidomic profiling identifies signatures of poor cardiovascular health. *Metabolites* **11**, (2021).
219. Rao, S. P. *et al.* Acyl Chain-Dependent Effect of Lysophosphatidylcholine on Endothelium-Dependent Vasorelaxation. *PLoS One* **8**, (2013).
220. Croset, M., Brossard, N., Polette, A. & Lagarde, M. *Characterization of Plasma Unsaturated Lysophosphatidylcholines in Human and Rat. Biochem. J* vol. 345 (2000).
221. Deberardinis, R. J. *et al.* *Beyond Aerobic Glycolysis: Transformed Cells Can Engage in Glutamine Metabolism That Exceeds the Requirement for Protein and Nucleotide Synthesis.* www.pnas.org/cgi/content/full/ (2007).
222. Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y. & Han, J. M. Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental and Molecular Medicine* vol. 52 1496–1516 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8> (2020).
223. Chen, S. *et al.* The role of glycolytic metabolic pathways in cardiovascular disease and potential therapeutic approaches. *Basic Research in Cardiology* vol. 118 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00395-023-01018-w> (2023).
224. Li, X. *et al.* Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01151-3> (2022).
225. Levin, M. *et al.* Mapping of ATP, glucose, glycogen, and lactate concentrations within the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1801–1807 (2003).
226. Humphrey, J. D. Possible mechanical roles of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection and associations with dysregulated transforming growth factor- β . *Journal of Vascular Research* vol. 50 1–10 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000342436> (2012).
227. Jiang, P., Du, W. & Wu, M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell* **5**, 592–602 (2014).
228. Roccabianca, S., Ateshian, G. A. & Humphrey, J. D. Biomechanical roles of medial pooling of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection. *Biomech Model Mechanobiol* **13**, 13–25 (2014).
229. Bunton, T. E. *et al.* *Phenotypic Alteration of Vascular Smooth Muscle Cells Precedes Elastolysis in a Mouse Model of Marfan Syndrome.* <http://www.circresaha.org> (2001).
230. Ghadie, N. M., St-Pierre, J. P. & Labrosse, M. R. The Contribution of Glycosaminoglycans/Proteoglycans to Aortic Mechanics in Health and Disease: A Critical Review. *IEEE Trans Biomed Eng* **68**, 3491–3500 (2021).
231. Butterfield, D. A. & Halliwell, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 20 148–160 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6> (2019).
232. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic

- requirements of cell proliferation. *Science* vol. 324 1029–1033 Preprint at <https://doi.org/10.1126/science.1160809> (2009).
233. Akella, N. M., Ciraku, L. & Reginato, M. J. Fueling the fire: Emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biology* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0671-3> (2019).
234. Saito, K. *et al.* Lipidomic signatures of aortic media from patients with atherosclerotic and nonatherosclerotic aneurysms. *Sci Rep* **9**, (2019).
235. Pflieger, J., He, M. & Abdellatif, M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis* **6**, (2015).
236. Perez, J., Hill, B. G., Benavides, G. A., Dranka, B. P. & Darley-Usmar, V. M. Role of cellular bioenergetics in smooth muscle cell proliferation induced by platelet-derived growth factor. *Biochemical Journal* **428**, 255–267 (2010).
237. Chen, X. *et al.* Oestrogen inhibition reverses pulmonary arterial hypertension and associated metabolic defects. *European Respiratory Journal* **50**, (2017).
238. Barron, J. T., Kopp, S. J., Tow, J. & Parrillo, J. E. *Fatty Acid, Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites, and Energy Metabolism in Vascular Smooth Muscle*. www.physiology.org/journal/ajpheart (1994).
239. Rutkowsky, J. M. *et al.* Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**, 1378–1387 (2014).
240. Makrecka-Kuka, M. *et al.* Altered mitochondrial metabolism in the insulin-resistant heart. *Acta Physiologica* vol. 228 Preprint at <https://doi.org/10.1111/apha.13430> (2020).
241. Gander, J. *et al.* Metabolic Impairment in Coronary Artery Disease: Elevated Serum Acylcarnitines Under the Spotlights. *Front Cardiovasc Med* **8**, (2021).
242. Kankuri, E. *et al.* Altered acylcarnitine metabolism and inflexible mitochondrial fuel utilization characterize the loss of neonatal myocardial regeneration capacity. *Exp Mol Med* **55**, 806–817 (2023).
243. Tang, Y., Mi, C., Liu, J., Gao, F. & Long, J. Compromised mitochondrial remodeling in compensatory hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rat. *Cardiovascular Pathology* **23**, 101–106 (2014).
244. Rudokas, M. W. *et al.* Mitochondrial network remodeling of the diabetic heart: implications to ischemia related cardiac dysfunction. *Cardiovascular Diabetology* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12933-024-02357-1> (2024).
245. Rosca, M. G., Tandler, B. & Hoppel, C. L. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* vol. 55 31–41 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.09.002> (2013).
246. Ren, J., Pulakat, L., Whaley-Connell, A. & Sowers, J. R. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Journal of*

- Molecular Medicine* vol. 88 993–1001 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0663-9> (2010).
247. Piotrowska, E. *et al.* Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *European Journal of Human Genetics* **14**, 846–852 (2006).
248. Guffon, N. *et al.* Oral treatment for mucopolysaccharidosis VI: Outcomes of the first phase IIa study with odiparcil. *J Inherit Metab Dis* **45**, 340–352 (2022).
249. Rochano-Ortiz, A. *et al.* Excessive glycosylation drives thoracic aortic aneurysm formation through integrated stress response. *Eur Heart J* <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaf556> (2025) doi:10.1093/eurheartj/ehaf556.
250. Bougarne, N. *et al.* Molecular actions of PPAR α in lipid metabolism and inflammation. *Endocrine Reviews* vol. 39 760–802 Preprint at <https://doi.org/10.1210/er.2018-00064> (2018).
251. Pawlak, M., Lefebvre, P. & Staels, B. *Molecular Mechanism of PPAR α Action and Its Impact on Lipid Metabolism, Inflammation and Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.*
252. Chatfield, K. C. *et al.* Elamipretide Improves Mitochondrial Function in the Failing Human Heart. *JACC Basic Transl Sci* **4**, 147–157 (2019).
253. Chekuri, A. *et al.* Late-onset retinal degeneration pathology due to mutations in CTRP5 is mediated through HTRA1. *Aging Cell* **18**, (2019).
254. Webster, K. A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: Roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiology* vol. 8 863–884 Preprint at <https://doi.org/10.2217/fca.12.58> (2012).
255. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084> (2019).
256. Ibarra, A., Schwob, E. & Mé, J. *Excess MCM Proteins Protect Human Cells from Replicative Stress by Licensing Backup Origins of Replication.* *PNAS* vol. 105 (2008).
257. Mejlvang, J. *et al.* New histone supply regulates replication fork speed and PCNA unloading. *Journal of Cell Biology* **204**, 29–43 (2014).
258. Loopmans, S. *et al.* The pentose phosphate pathway controls oxidative protein folding and prevents ferroptosis in chondrocytes. *Nat Metab* **7**, 182–195 (2025).
259. Zhu, X. *et al.* Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00646-9> (2021).
260. Hung, S. C. *et al.* Lysophosphatidylcholine Impairs the Mitochondria Homeostasis Leading to Trophoblast Dysfunction in Gestational Diabetes Mellitus. *Antioxidants* **13**, (2024).
261. Rao, Z. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress and Pathogenesis of Vascular

- Calcification. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.918056> (2022).
262. Samsul Arefin, A. L.-C. S. H. A. S. L. D. K. K. P. S. *Chapter 25-Cellular Mechanisms of Aging and Their Impact on the Aortic/Arterial Wall*. (2022).
263. Williamson, J., Hughes, C. M., Cogley, J. N. & Davison, G. W. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ, attenuates exercise-induced mitochondrial DNA damage. *Redox Biol* **36**, (2020).
264. Zhang, J. *et al.* MitoQ ameliorates testis injury from oxidative attack by repairing mitochondria and promoting the Keap1-Nrf2 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **370**, 78–92 (2019).
265. Masoumi-Ardakani, Y. *et al.* Effect of Combined Endurance Training and MitoQ on Cardiac Function and Serum Level of Antioxidants, NO, miR-126, and miR-27a in Hypertensive Individuals. *Biomed Res Int* **2022**, (2022).
266. Matthew J. Rossman, J. R. S.-P. C. A. C. S. N. Z. B. L. M. C. H. L. R. K. A. W. M. C. R. A. G.-R. M. P. M. D. R. S. Chronic supplementation with a mitochondrial antioxidant (MitoQ) improves vascular function in healthy older adults. *Hypertension* **71**, 1056–1063 (2018).
267. Ji, Y. *et al.* The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing PINK1/Parkin-mediated mitophagy in type 2 diabetic rats. *Cell Stress Chaperones* **27**, 353–367 (2022).
268. Li, H. S. *et al.* HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox Biol* **25**, (2019).
269. Elhassan, Y. S. *et al.* Nicotinamide Riboside Augments the Aged Human Skeletal Muscle NAD⁺ Metabolome and Induces Transcriptomic and Anti-inflammatory Signatures. *Cell Rep* **28**, 1717-1728.e6 (2019).
270. Brakedal, B. *et al.* The NADPARK study: A randomized phase I trial of nicotinamide riboside supplementation in Parkinson's disease. *Cell Metab* **34**, 396-407.e6 (2022).
271. Dromparis, P. *et al.* Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension. *Circulation* **127**, 115–125 (2013).
272. Amodio, G., Moltedo, O., Faraonio, R. & Remondelli, P. Targeting the endoplasmic reticulum unfolded protein response to counteract the oxidative stress-Induced endothelial dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2018 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2018/4946289> (2018).
273. Xin Wang, C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. <https://doi.org/10.1111/bph.v175.8/issuetoc> (2017) doi:10.1111/bph.v175.8/issuetoc.
274. Mooradian, A. D. & Haas, M. J. Cardioprotective antihyperglycemic drugs ameliorate endoplasmic reticulum stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* vol. 326 C89–C94 Preprint at <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00470.2023> (2024).

ANEXOS

El material suplementario de esta tesis doctoral puede descargarse a partir de este enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/12Nof0gvulxdszby2a2pXZDhqLX_NXJ28?usp=sharing

O escaneando el siguiente código QR:



Ambos contienen:

ANEXO A: ANÁLISIS DIFERENCIAL DE LAS CMLVs DE AORTA EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB Y TRASLACIÓN A BIOPSIA LÍQUIDA.

Tabla Suplementaria 1. Total de proteínas identificadas.

Tabla Suplementaria 2. Proteínas alteradas asociadas a los distintos fenotipos de las CMLVs.

Tabla Suplementaria 3. Proteínas más alteradas.

Tabla Suplementaria 4. Categorías funcionales con variación más consistente y sus proteínas asociadas.

Tabla Suplementaria 5. Proteínas secretadas extracelularmente.

Tabla Suplementaria 6. Proteínas subcelulares alteradas.

ANEXO B: ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB.

Tabla Suplementaria 7. Proteínas mitocondriales identificadas pertenecientes a la cadena respiratoria, síntesis de proteínas, estructura, biogénesis y metabolismo mitocondrial.

ANEXO C: ANÁLISIS DEL USO DIFERENCIAL DE LA GLUCOSA EN EL AAT ASOCIADO A VAT Y VAB.

Tabla Suplementaria 8. Metabolitos significativamente alterados identificados en la comparación entre VAT-AAT vs. VAT-C y VAB-AAT vs. VAB-C.

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Durante esta tesis doctoral se ha contribuido a la publicación de los siguientes **artículos científicos**:

Derivados de la tesis:

Martin-Blazquez A, Ruiz-Jimenez R, Donado A, Heredero A, García-Gil Maria L, Lopez JA, Villacampa A, Peiró C, Vazquez J, Aldamiz-Echevarria G, Alvarez-Llamas G*, Martin-Lorenzo M*. Mitochondrial dysfunction in non-syndromic thoracic aortic aneurysm associated to tricuspid and bicuspid aortic valves. (Manuscrito en preparación).

Martin-Blazquez A, Díaz C, deSancha-Maluenda M, Ruiz-Jimenez R, Mena García P, Donado A., Heredero A, García-Gil Maria.L., Aldamiz-Echevarría G, Martin-Lorenzo M., Alvarez-Llamas G. Differential glucose use in non-syndromic thoracic aortic aneurysm in patients with tricuspid and bicuspid aortic valves. (En revisión: JPATH-2025-274.R1).

Martin-Blazquez A*, Martin-Lorenzo M*, Santiago-Hernandez A, Heredero A, Donado A, Lopez JA, Anfaiha-Sanchez M, Ruiz-Jimenez R, Esteban V, Vazquez J, Aldamiz-Echevarria G, Alvarez-Llamas G. Analysis of Vascular Smooth Muscle Cells from Thoracic Aortic Aneurysms Reveals DNA Damage and Cell Cycle Arrest as Hallmarks in Bicuspid Aortic Valve Patients. J Proteome Res. 2024 Aug 2;23(8):3012-3024. doi: 10.1021/acs.jproteome.3c00649. Epub 2024 Apr 9. PMID: 38594816; PMCID: PMC11301675. Este artículo forma parte del número especial de la revista *Women in Proteomics and Metabolomics*.

Martin-Blazquez A, Heredero A, Aldamiz-Echevarria G, Martin-Lorenzo M*, Alvarez-Llamas G*. Non-syndromic thoracic aortic aneurysm: cellular and molecular insights. J Pathol. 2021 Jul;254(3):229-238. doi: 10.1002/path.5683. Epub 2021 May 24. PMID: 33885146; PMCID: PMC8251829.

*Autores con contribución equivalente

Otras publicaciones durante la tesis:

Anfaiha-Sanchez M, Santiago-Hernandez A, Lopez JA, Lago-Baameiro N, Pardo M, **Martin-Blazquez A**, Vazquez J, Ruiz-Hurtado G, Barderas MG, Segura J, Ruilope LM, Martin-Lorenzo M, Alvarez-Llamas G. Urinary extracellular vesicles as a monitoring tool for renal damage in patients not meeting criteria for chronic kidney disease. J Extracell Biol. 2024 Sep 17;3(9):e170. doi: 10.1002/jex2.170. PMID: 39290459; PMCID: PMC11406310.

Fernandez-Bravo S, Canyelles M, **Martín-Blázquez A**, Borràs C, Nuñez-Borque E, Palacio-García L, Rodríguez Del Rio P, Betancor D, Gómez-López A, Sabaté Brescó M, Laguna JJ, Méndez-Barbero N, Rotllan N, Escolà-Gil JC, Esteban V. Impaired high-density lipoprotein function and endothelial barrier stability in severe anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 2024 Sep;154(3):827-832. doi: 10.1016/j.jaci.2024.03.031. Epub 2024 May 6. PMID: 38718948.

Santiago-Hernandez A, Martin-Lorenzo M, Gómez-Serrano M, Lopez JA, **Martin-Blazquez A**, Vellosillo P, Minguez P, Martinez PJ, Vázquez J, Ruiz-Hurtado G, Barderas MG, Sarafidis P, Segura J, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. The Urinary Glycopeptide Profile Differentiates Early Cardiorenal Risk in Subjects Not Meeting Criteria for Chronic Kidney Disease. Int J Mol Sci. 2024 Jun 26;25(13):7005. doi: 10.3390/ijms25137005. PMID: 39000114; PMCID: PMC11241500.

Nuñez-Borque E, Betancor D, Pastor-Vargas C, Fernández-Bravo S, **Martin-Blazquez A**, Casado-Navarro N, López-Domínguez D, Gómez-López A, Rodríguez Del Rio P, Tramón P, Beitia JM, Moreno-Aguilar C, González-de-Olano D, Goikoetxea MJ, Ibáñez-Sandín MD, Laguna JJ, Cuesta-Herranz J, Esteban V. Personalized diagnostic approach and indirect quantification of extravasation in human anaphylaxis. *Allergy*. 2023 Jan;78(1):202-213. doi: 10.1111/all.15443. Epub 2022 Jul 27. PMID: 35841381; PMCID: PMC10087983.

Díaz C, González-Olmedo C, Díaz-Beltrán L, Camacho J, Mena García P, **Martín-Blázquez A**, Fernández-Navarro M, Ortega-Granados AL, Gálvez-Montosa F, Marchal JA, Vicente F, Pérez Del Palacio J, Sánchez-Rovira P. Predicting dynamic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a novel metabolomics approach. *Mol Oncol*. 2022 Jul;16(14):2658-2671. doi: 10.1002/1878-0261.13216. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35338693; PMCID: PMC9297806.

Santiago-Hernandez A, Martin-Lorenzo M, **Martin-Blazquez A**, Ruiz-Hurtado G, Barderas MG, Segura J, Ruilope LM, Alvarez-Llamas G. TCA Cycle and Fatty Acids Oxidation Reflect Early Cardiorenal Damage in Normoalbuminuric Subjects with Controlled Hypertension. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jul 9;10(7):1100. doi: 10.3390/antiox10071100. PMID: 34356333; PMCID: PMC8301016.

Martin-Lorenzo M, Ramos-Barron A, Gutierrez-Garcia P, **Martin-Blazquez A**, Santiago-Hernandez A, Rodrigo Calabria E, Gomez-Alamillo C, Alvarez-Llamas G. Urinary Spermidine Predicts and Associates with In-Hospital Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jun 2;10(6):896. doi: 10.3390/antiox10060896. PMID: 34199603; PMCID: PMC8229689.

Díaz-Beltrán L, González-Olmedo C, Luque-Caro N, Díaz C, **Martín-Blázquez A**, Fernández-Navarro M, Ortega-Granados AL, Gálvez-Montosa F, Vicente F, Pérez Del Palacio J, Sánchez-Rovira P. Human Plasma Metabolomics for Biomarker Discovery: Targeting the Molecular Subtypes in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 5;13(1):147. doi: 10.3390/cancers13010147. PMID: 33466323; PMCID: PMC7795819.

Nota de prensa

Parte de los resultados recogidos en esta tesis doctoral han dado lugar a la nota de prensa *La importancia de la terapia individualizada para tratar los problemas aórticos*, publicada el 13 de mayo de 2025 en el periódico elDiario.es.

Los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral han sido parcialmente presentados en los siguientes **congresos nacionales e internacionales**:

90 congreso de la Sociedad Europea de Aterosclerosis, celebrado del 22 de mayo al 25 de mayo de 2022. Presentación de póster: *Protein alterations in VSMCs reveal a defective repairment capacity in thoracic aortic aneurysm associated to BAV*. **A. Martin-Blazquez**, M. Martin-Lorenzo, A. Santiago-Hernandez, J. A. Lopez, A. Heredero, A. Donado, M. Anfaíha Sánchez, V. Esteban, J. Vazquez, G. Aldamiz-Echevarria, G. Alvarez-Llamas.

Segunda reunión conjunta de las Sociedades Española, Francesa y Portuguesa (ProteoVilamoura) celebrada del 11 al 13 de mayo de 2022 en Vilamoura (Portugal). Presentación oral: *Proteomic profiling of ascending aortic VSMC reveals alterations in DNA machinery and cell cycle dysregulation in thoracic aortic aneurysm associated with bicuspid aortic valve*. **A. Martin-Blazquez**, M. Martin-Lorenzo, A. Santiago-Hernandez, J. A. Lopez, A. Heredero, A. Donado, M. Anfaíha Sánchez, V. Esteban, J. Vazquez, G. Aldamiz-Echevarria, G. Alvarez-Llamas.

Nonagésimo primer congreso de la Sociedad Europea de Aterosclerosis, celebrado del 21 de mayo al 24 de mayo de 2023 en Mannheim (Alemania). Presentación de dos pósters: *In-depth analysis of human vascular smooth muscle cells from idiopathic thoracic aortic aneurysm patients evidences the mechanisms predisposing to aortic dilatation in bicuspid aortic valve*. Marta Martin-Lorenzo*, **Ariadna Martin-Blazquez***, Aranzazu Santiago-Hernandez, Angeles Heredero, Alicia Donado, Juan Antonio Lopez, Miriam Anfaíha-Sanchez, Vanesa Esteban, Jesus Vazquez, Gonzalo Aldamiz-Echevarria, Gloria Alvarez-Llama y *Lipidomics plasma analysis supports a differential thoracic aortic aneurysm diagnosis for bicuspid or tricuspid aortic valve patients*. **Ariadna Martin-Blazquez**, Marta Martin-Lorenzo, Alicia Donado, Angeles Heredero, Caridad Diaz-Navarro, Patricia Mena Garcia, Miriam Anfaíha-Sanchez, Aranzazu Santiago-Hernandez, Gonzalo Aldamiz-Echevarria, Gloria Alvarez-Llamas.

VII Meeting for Young Proteomics Researchers, celebrado los días 15 y 16 de febrero de 2023 en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares y organizado por la Sociedad Española de Proteómica. Presentación oral: *Deciphering VSMC molecular changes subjacent to thoracic aortic aneurysm associated to bicuspid aortic valve*. **A. Martin-Blazquez**, M. Martin-Lorenzo, A. Santiago-Hernandez, A. Heredero, A. Donado, J. A. Lopez, M. Anfaíha-Sanchez, V. Esteban, J. Vazquez, G. Aldamiz-Echevarria, G. Alvarez-Llamas.

Segunda conferencia internacional de la Sociedad Española de Metabolómica, celebrada los días 3 de junio al 5 de junio de 2024 en Sevilla (España). Presentación de póster: *Plasma glycerophospholipid and acylcarnitine profile reflect specific metabolic fingerprints of thoracic aortic aneurysm associated to bicuspid and tricuspid valves*. **Ariadna Martin-Blazquez**, Marta Martin-Lorenzo, Alicia Donado, Angeles Heredero, Caridad Diaz-Navarro, Patricia Mena Garcia, Miriam AnfaíhaSanchez, Aranzazu Santiago-Hernandez, Gonzalo Aldamiz-Echevarria, Gloria Alvarez-Llamas

Frontiers in Cardiovascular Biomedicine, celebrado los días 12 de abril al 14 de abril de 2024 en Ámsterdam (Países Bajos). Presentación de dos pósters: *Metabolic plasma signatures in thoracic aortic aneurysm associated to tricuspid and bicuspid aortic valves*. **A Martin-Blazquez**, M Martin-Lorenzo, A Donado, A Heredero, C DiazNavarro, P Mena-Garcia, M Anfaíha-Sanchez, A Santiago-Hernandez, G Aldamiz-Echevarria, G Alvarez-Llamas y *Spatially resolved metabolomics revealed specific nucleotide alterations within the media and adventitial layers in idiopathic thoracic aortic aneurysms associated with tricuspid and bicuspid valves*. Marta Martin-Lorenzo, **Ariadna Martin-Blazquez**, Alicia Donado, Angeles Heredero, Aranzazu Santiago-Hernandez, Ron M. A. Heeren, Gonzalo Aldamiz-Echevarria, Benjamin Balluff, Gloria Alvarez-Llamas

54 Congreso de la Sociedad Española de Nefrología-XI Congreso Iberoamericano de Nefrología e Hipertensión, celebrado los días 8, 9 y 10 de noviembre de 2024 en Valencia (España). Participación con póster: *Marcadores moleculares de riesgo cardiorrenal subclínico en orina y vesículas extracelulares*. M Anfaiha-Sanchez, A Santiago-Hernandez, A Martin-Blazquez, JA Lopez, N Lago-Baameiro, R Ruiz-Jimenez, J Segura, LM Ruilope, M Martin-Lorenzo, G Alvarez-Llamas.

FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida de:

Proyectos de investigación financiados en convocatoria pública competitiva:

- PI20/01103. Descifrando el metabolismo del aneurisma aórtico torácico mediante imagen molecular: desde el desarrollo silencioso hasta los marcadores diagnósticos. Financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y cofinanciado por la Unión Europea. IP: Gloria Álvarez Llamas.
- Ayuda CP22/00100. Aneurisma de aorta torácica: de los mecanismos aórticos *in-situ* a los marcadores plasmáticos de diagnóstico. Financiado por el ISCIII y cofinanciado por la Unión Europea. IP: Marta Martín Lorenzo.
- PI23/00100. Aneurisma aórtico torácico idiopático: interacción celular y medicina personalizada. Financiado por el ISCIII y cofinanciado por la Unión Europea. IP: Marta Martín Lorenzo.

Convocatorias competitivas de RRHH

- Ayudas para la contratación de investigadores predoctorales y posdoctorales: PEJD-2019-PRE/BMD-16992 (Comunidad de Madrid). IP: Marta Martín Lorenzo.
- Contrato predoctoral de formación en investigación en salud (Contrato PFIS): FI21/00128. Financiado por el ISCIII y cofinanciado por la Unión Europea. IP: Gloria Álvarez Llamas.

Colaboración empresarial:

- Getinge Group Spain SL. IPs: Gloria Álvarez Llamas y Gonzalo Aldamiz Echevarría.

