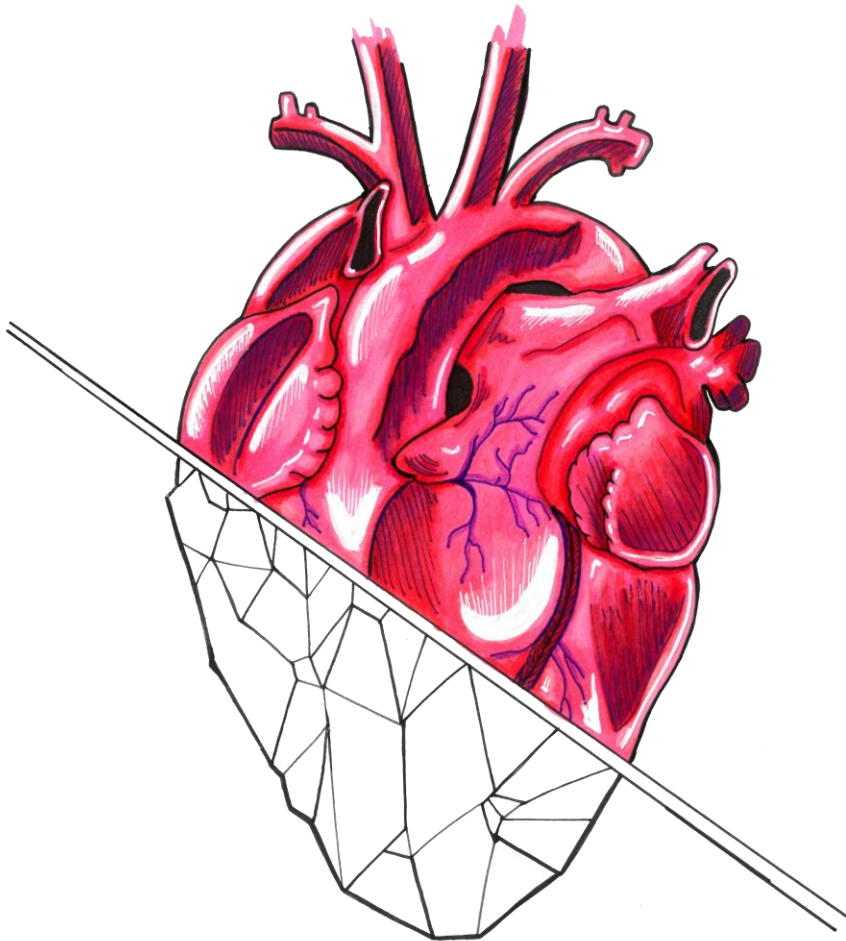




UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

**Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones**

**Etiofisiopatología de la enfermedad de la válvula aórtica  
bicúspide en modelos animales**



**María Teresa Soto Navarrete**

**2023**

**Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación Traslacional y  
Nuevas Tecnologías en Salud**

**Directores**


Dr. Borja Fernández Corujo

Dr. Miguel Such Martínez



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTORA: María Teresa Soto Navarrete

 <https://orcid.org/0000-0003-0825-4710>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN  
TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD  
Facultad de Medicina  
Universidad de Málaga**

**TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

**ETIOFISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE LA VÁLVULA  
AÓRTICA BICÚSPIDE EN MODELOS ANIMALES**

**María Teresa Soto Navarrete  
2023**

**Directores:**

**Borja Fernández Corujo  
Miguel Such Martínez**

**Tutor/a:**

**Manuel Jiménez Navarro**





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

***A mi familia.  
A mis padres.  
A Antonio.***



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

***"Hay tres maneras de hacer las cosas:  
la correcta, la incorrecta y la mía"***

Robert de Niro en *Casino* (Martin Scorsese, 1995)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

El Dr. Borja Fernández Corujo, Profesor Titular del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, el Dr. Miguel Such Martínez, Profesor Colaborador Honorífico en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, y el Dr. Manuel Jiménez Navarro, Catedrático/a del Departamento de Medicina y Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA/N Que D/D<sup>a</sup>. María Teresa Soto Navarrete

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: "Etiofisiopatología de la enfermedad de la válvula aórtica bicúspide en modelos animales", que consideramos tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al Grado de Doctor, con la mención Doctor Internacional.

Y que las publicaciones en coautoría que avalan la presentación de esta tesis por compendio y cuya referencias son:

**Publicación 1:** Soto-Navarrete, M. T., López-Unzu, M. Á., Durán, A. C., Fernández, B. (2020). Embryonic development of bicuspid aortic valves. *Progress in cardiovascular diseases*, 63(4), 407-418.

**Publicación 2:** Fernández, B., Soto-Navarrete, M. T., López-García, A., López-Unzu, M. Á., Durán, A. C., Fernández, M. C. (2020). Bicuspid aortic valve in 2 model species and review of the literature. *Veterinary pathology*, 57(2), 321-331.

**Publicación 3:** Soto-Navarrete, M. T., Pozo-Vilumbrales, B., López-Unzu, M. Á., Rueda Martínez, C., Fernández, M. C., Durán, A. C., Pavón-Morón, F. J., Rodríguez-Capitán, J., Fernández, B. (2022). Experimental evidence of the genetic hypothesis on the etiology of bicuspid aortic valve aortopathy in the hamster model. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2153.

**Publicación 4:** Fernández, M. C., Soto-Navarrete, M. T., Durán, A. C., Sans-Coma, V., Fernández, B. (2019). The Bicuspid Condition of the Aortic Valve Does Not Alter the Incidence of Accessory Coronary Artery Ostia in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of comparative pathology*, 166, 9-16.

no han sido utilizadas en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Málaga, 13 de abril de 2023.

Firmado:

Dr. Borja Fernández Corujo Director	Dr. Miguel Such Martínez Director	Dr. Manuel Jiménez Navarro Tutor





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña MARÍA TERESA SOTO NAVARRETE

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ETIOFISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE LA VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE EN MODELOS ANIMALES

Realizada bajo la tutorización de MANUEL JIMÉNEZ NAVARRO y dirección de BORJA FERNÁNDEZ CORUJO Y MIGUEL SUCH MARTÍNEZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 13 de ABRIL de 2023

Fdo.: MARÍA TERESA SOTO NAVARRETE Doctorando/a	Fdo.: MANUEL JIMÉNEZ NAVARRO Tutor/a
Fdo.: BORJA FERNÁNDEZ CORUJO Y MIGUEL SUCH MARTÍNEZ Director/es de tesis	





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Agradecimientos



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Agradecimientos

Como dice mi madre, y haciendo uso del refranero español, “es de bien nacido ser agradecido”. Por eso, en estas líneas quiero dar las gracias a todas las personas que, de una forma u otra, han formado parte de esta gran aventura que culmina con la presentación de esta memoria.

A mi director de tesis, el Dr. Borja Fernández. Gracias por haberme transmitido tu entusiasmo por la ciencia y enseñarme todo lo que sabes. Lo que no, lo hemos aprendido juntos. Gracias por no poner límites a mi crecimiento personal y desarrollo profesional, por ese orden, y demostrar siempre que te importan las personas con las que trabajas. Gracias por valorarme y apostar por mí desde el principio. Gracias por todas las veces que me has hecho ver que estaba tomando el camino equivocado, aunque me pudiese la frustración y el enfado. Te aseguro que han sido las lecciones más valiosas. Gracias por empujarme siempre a sacar lo mejor de mí y no soltarme de la mano. En definitiva, gracias por ser como eres y por formar parte de mi vida. Además de un amigo, eres un referente para mí, un espejo en el que mirarse. Sin duda, no habría llegado hasta aquí sin ti.

A mi otro director, el Dr. Miguel Such, y a mi tutor, el Dr. Manuel Jiménez, por vuestra amabilidad y buena disposición para ayudarme siempre en todo lo que he necesitado durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por vuestro buen hacer, por vuestro trabajo docente y asistencial y por mostrarme el valor e importancia de la investigación clínica.

A la Dra. Ana Carmen Durán. Gracias por tu cariño y consejos, por tratarme como a una hija y por ayudarme e implicarte siempre sin dudar. Gracias por todas las veces que has sacado tiempo para mí aunque no lo tuvieras. Gracias por enseñarme el valor de los detalles y la importancia de las cosas bien

## Agradecimientos

hechas. Será difícil alcanzar tu nivel de perfección, aunque te prometo que seguiré intentándolo.

Al Dr. Valentín Sans, uno de los mejores profesores que han pasado por mi vida académica. Un ejemplo de verdadera vocación por la docencia y la investigación, una mente prodigiosa. Gracias por abrirme las puertas del grupo y despertar en mí la curiosidad por el mundo científico. La oportunidad que me diste me permitió dar mis primeros pasos en investigación. Esto supuso, sin saberlo, el comienzo de esta aventura.

A las Drs. Mamen Fernández, Cristina Rodríguez y Agustina Torres, y al Dr. Alejandro López. Gracias a vosotros di mis primeros pasos en el laboratorio del grupo. Os agradezco vuestro apoyo y paciencia durante esta primera etapa y vuestra participación en la formación de la profesional que hoy soy. A Xete Ruiz, Ángela Machuca, Andrea Linares, Ismael Reyes y Ale Tamayo, gracias por hacer más divertidos aquellos comienzos.

A todos los alumnos que han pasado por el grupo durante este tiempo, en especial, a Violeta, Juanan, Desi, Ana e Iván. Gracias a todos vosotros he descubierto mi vocación docente. Aunque a veces sois un desastre y me sacáis de quicio, resulta muy satisfactorio veros progresar. Gracias a todos por las risas, los cafés y los cotilleos. Habéis hecho esta experiencia mucho más amena.

A todos los profesores del Departamento de Biología Animal, por permitirme aprender de ellos durante mi periodo de formación como docente. Gracias a todos por interesaros por mi trabajo y tener siempre una palabra de aliento, sobre todo en el último tramo de esta extenuante carrera.

## Agradecimientos

A todos mis compañeros predoctorales del Departamento (Bárbara, Laura Martín, Ana Mari, Ernesto Marín, Adrián, Chema, Marina, Juan Diego, Olga, José Antonio, Ernesto), algunos de ellos ya doctores (Unzu, Laura Ariza, Sandra, Paul, Sara, Chispi, Darío, Lucrecia, Alisa). Habéis sido un apoyo muy importante durante todo este periodo. Resulta más llevadero poder compartir esta experiencia con personas que están en la misma situación. Gracias infinitas por vuestros ánimos y alguna que otra fiesta.

A todos los miembros actuales o que han pasado por el grupo de Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis, dirigido por los Drs. José María Pérez Pomares y Ramón Muñoz-Chapuli, ambos magníficos docentes e investigadores. Me habéis dado la oportunidad de aprender de vuestro trabajo en un grupo de referencia en el campo de la Biología del Desarrollo. Al Prof. Juan Antonio Guadix y al Dr. Adrián Ruiz Villalba, gracias por vuestros ánimos y consejos durante el desarrollo de esta tesis.

A las Drs. Rita Carmona, Laura Ariza y Sandra Díaz, y a Silvia Barrena, por tantas comidas y sobremesas juntas en las que hemos intentado arreglar el mundo, por las charlas interminables y los cotilleos. Definitivamente, han dado para mucho. No me gustaría terminar sin agradeceros vuestro cariño. A Laura y Silvia, gracias por vuestros abrazos mañaneros. Los he echado muchísimo de menos...

A la Dra. Eugenia Manjón. Para mí, una verdadera docente de vocación. La persona más organizada, práctica y eficiente que conozco. Gracias por los desayunos con conversación profunda incluida. Gracias por tu sabiduría y tus consejos cuando no sé qué hacer con mi vida. No te haces una idea de todo

## Agradecimientos

lo que he aprendido de ti, tanto en el ámbito profesional como personal. Vales oro.

A Inma Ruiz e Inmita. Gracias por vuestro cariño, por interesaros de verdad por cómo estoy y cómo me va y, por supuesto, Inma, gracias por los bizcochos. Me has endulzado la tesis. A Inmita, gracias siempre por tus abrazos y tu alegría.

A Luis Vida, por tu importante labor en el Departamento. Gracias por tu ayuda para preparar las prácticas, por tu amabilidad y echarme un cable siempre con una sonrisa.

A los técnicos de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga, Remedios Crespillo, David Navas, Gregorio Martín y Cristina Lucena. Gracias por vuestra paciencia e inestimable ayuda para obtener los resultados de mis experimentos.

To Dr. Hanjoong Jo, from Emory University. Thank you for welcoming me into your lab and giving me the opportunity to learn from your team. I would like to thank all the members of the group, especially Nico, Aitor and Cat for helping me and teaching me. Thank you for making me feel part of your team from the beginning.

A mi compañera Laura Martín, trabajadora incansable y cabezota a partes iguales. Gracias por tu franqueza, por estar siempre dispuesta a ayudar a los demás y por tu apoyo moral durante todo este tiempo. Gracias también por las noches de vino y queso en tu casa y las cervecitas después del trabajo. Esta experiencia no habría sido lo mismo sin ti.

## Agradecimientos

Al Dr. Miguel Ángel López-Unzu, mi Unzu. Las mejores amistades comienzan con un "tú al principio me caías mal". Míranos ahora... Hay pocas personas que puedan entender mejor que tú cómo ha sido este proceso. Sin duda, esta experiencia nos ha hecho crecer y madurar juntos. Gracias por hacer más llevaderas tantas horas de trabajo. Gracias por preocuparte siempre por mí y por los abrazos en los días complicados. Gracias también por hacerme reír con tu humor estúpido (malditos sean tus chistes malos...). Ha sido un verdadero placer trabajar contigo.

A Bárbara Pozo, mi mini yo. Fuiste mi primera alumna y mi favorita (para que veas que me permito dejarlo por escrito para la posteridad). Gracias por tu generosidad. Gracias por tu dulzura y estar dispuesta siempre a sacarme una sonrisa, lo que me hace recordar que tengo que ser menos borde contigo (o eso intento...). Gracias por tus opiniones sinceras y por ponerme los pies en la tierra cuando el estrés me sobrepasa. Siempre ves el lado bueno de las cosas. Gracias por las canciones, las horas interminables en el confocal, las peleillas de hermanas y la comunicación telepática. Gracias a ti esta etapa ha sido infinitamente más divertida. En definitiva, gracias por tu amistad porque eres una de las personas más importantes de mi vida. Esta tesis también es tuya.

A mis amigos, Eli Torres, Adrián Pintado, Malu Pérez y Tomás Santiago. Gracias por vuestro apoyo, y por escucharme y animarme cuando he necesitado desahogarme. Gracias por dedicarme vuestro tiempo y sacar un ratito para verme y preguntarme cómo va todo. Sois los mejores.

## Agradecimientos

A mis suegros Antonio y Mari, mis cuñados Sandra, Maite, Prados y Miguel, y a mis sobrinos Mario, Gonzalo y Paloma. Gracias por vuestro interés por mi trabajo y tratarme siempre como a una más. Me siento afortunada de formar parte de vuestra familia.

A mi familia. A todos mis tíos y primos, gracias por vuestro cariño y por animarme siempre, aunque a veces no entendáis muy bien lo que hago. En especial, quiero agradecer a mis tíos Pepe y Loli el tratarme siempre como a su hija. A mis primos Javi y José, a los que considero mis hermanos, simplemente, gracias por estar siempre ahí para mí.

A los artistas de mi familia, mi madre y mi primo José, que poseen el “gen artístico Navarrete” que claramente yo no he heredado. Gracias por ayudarme con las ilustraciones de la tesis. Si no hubiese sido por vosotros habría quedado infinitamente menos bonita.

A mis abuelos, Pepe, Milagros y Ramón, que compartieron conmigo la ilusión por empezar esta aventura, pero desafortunadamente no están aquí hoy para verme terminarla. A mi abuela Teresa, que aunque falleció ya hace algunos años, sé que hoy estaría orgullosa de mí. Gracias a todos por haberme cuidado y apoyado siempre. Esta tesis va para vosotros.

Me gustaría hacer una mención especial a mi abuelo Pepe, mi abuelo favorito. El destino (o mi madre...) quiso que encontrase su pasaporte poco antes de irme de estancia a Estados Unidos. Durante varios años, mi abuelo trabajó como temporero en Francia sin saber ni una palabra de francés. Si él fue capaz de hacer la maleta y dejar a su familia durante meses yo, con más recursos, también podía hacerlo. Gracias por darme la valentía que necesitaba para irme.

## Agradecimientos

A mis padres, Teresa y Antonio, gracias por vuestro apoyo incondicional ante cualquier decisión que he tomado. Gracias por ayudarme a cumplir mis sueños y alcanzar mis metas. Sin vosotros, hoy no estaría escribiendo estas palabras. A mi madre, gracias por ser un ejemplo de resiliencia y valentía para enfrentar las complicaciones de la vida, que no han sido pocas. Gracias también por los tapers y por regañarme para que no sea tan borde (estoy mejorando...). A mi padre, por transmitirme tu sentido del deber y la responsabilidad. Por ti, lo primero para mí es cumplir con mi trabajo. Gracias también por todas las veces que has venido a buscarme, aunque estuvieras agotado. No sé qué haría sin vosotros. Solo espero que al menos podáis sentirnos orgullosos. Esta tesis también es vuestra. Os quiero.

A Antonio. Cada día doy gracias a la vida por haberte puesto en mi camino. Gracias por apoyar mis sueños y ayudarme a volar. Gracias por todos los sacrificios que has hecho y sigues haciendo por mí de manera totalmente desinteresada. Gracias por escucharme cuando me ahoga la vida (y la tesis...). Gracias por intentar entenderme, incluso cuando no me salen las palabras. Gracias por cuidarme y quererme. Gracias por ser tú. Te quiero hoy, mañana y siempre.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Prefacio



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **1. Formato de la tesis**

El formato de la presente memoria se ajusta al de “tesis por compendio de publicaciones”, cumpliendo con lo estipulado en el Artículo 21 del Reglamento de Doctorado de la Universidad de Málaga, es decir, está constituida por un conjunto de artículos publicados, firmados por la doctoranda, que están directamente relacionados con el tema central de la tesis.

La presentación de esta modalidad de tesis debe ser avalada por un mínimo de tres publicaciones, cuya suma de puntuaciones ha de ser igual o superior a 1 punto, según los criterios de la ANECA o los elaborados por las diferentes comisiones académicas de doctorado, siempre en cumplimiento con los criterios de la ANECA. Por último, el reglamento establece que la memoria debe estar compuesta por una introducción, en la que se presenten los trabajos publicados y se justifique la unidad temática de los mismos, un resumen global de los resultados, su discusión -si procede-, las conclusiones y una copia de las publicaciones que integran la tesis. La introducción debe ser lo suficientemente extensa y debe incluir el estado de la cuestión y aquellos detalles que no se han podido incluir en las publicaciones que avalan la tesis por limitaciones de espacio.

## **2. Aval y estructura de la tesis**

La presente tesis está avalada por un total de cuatro publicaciones, en las que la doctoranda es primera o segunda autora, todas ellas incluidas en el Journal of Citation Reports (JCR). Las publicaciones, incluidas en la tesis en forma de capítulos, se presentan a continuación. Dos de ellas, Soto-Navarrete et al. (2020), Prog. Cardiovasc. Dis., 63(4), 407-418 (T1, 17/142) y Soto-

## Prefacio

Navarrete et al. (2022), *Front. Cardiovasc. Med.*, 2153 (T1, 43/143), se encuentran en la categoría temática "Cardiac & Cardiovascular Systems". Las otras dos, Fernández et al. (2020), *Vet. Pathol.*, 57(2), 321-331 y Fernández et al. (2019), *J. Comp. Pathol.*, 166, 9-16 se encuentran en la categoría "Veterinary Sciences". Por lo tanto, la puntuación total obtenida, siguiendo los criterios de la ANECA, es de 3,75. Además, se incluye un quinto manuscrito inédito titulado "*Endocardial-mesenchymal transition underlies fusion of the conotruncal ridges during normal and bicuspid aortic valve development*", en vías de publicación.

Atendiendo a la normativa anteriormente citada, la memoria de la presente tesis incluye una introducción general en la que se presentan los trabajos que la integran y se justifica su unidad temática (Capítulo I), un capítulo con la enumeración de los objetivos de la tesis (Capítulo II), cinco capítulos que incluyen un resumen de los resultados de cada una de las publicaciones y su respectiva discusión (Capítulos III-VII), la enumeración de las conclusiones obtenidas a partir de los resultados de la tesis (Capítulo VIII), un listado de las referencias bibliográficas empleadas para elaborar la presente memoria y una copia de cada uno de los artículos que conforman la tesis, incluida la publicación inédita.

### **3. Ámbito de ejecución de la tesis**

Las investigaciones realizadas para elaborar la presente tesis han sido llevadas a cabo entre los años 2018 y 2023 en el seno del Grupo de Investigaciones Cardiovasculares en Vertebrados (BIO-203, Junta de Andalucía) / Modelos Animales en Investigaciones Cardiovasculares (A-17,

Instituto de Investigación Biomédica de Málaga), ubicado en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. Los experimentos necesarios para la obtención de resultados han sido llevados a cabo en los laboratorios del Departamento de Biología Animal y del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga (IBIMA-Plataforma BIONAND), así como en las instalaciones de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga.

El grupo al que pertenece la autora, en colaboración con el Área del Corazón del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, lleva trabajando tres décadas en el sistema cardiovascular, utilizando modelos animales para estudios biomédicos de diversas enfermedades que abarcan la presencia de anomalías coronarias, la enfermedad de la válvula aórtica bicúspide o la aterosclerosis. La investigadora predoctoral se integró en el equipo de investigación en el año 2012, e inició su colaboración en calidad de estudiante durante su formación en el Grado en Biología. Los resultados de dicha colaboración se han visto reflejados en la participación como autora en diversas publicaciones y comunicaciones a congresos, de las cuales algunas no forman parte del compendio de esta tesis.

#### **4. Financiación de la tesis**

El soporte financiero para el presente estudio en lo que se refiere a infraestructura y material fungible provino de 1) la AEI, a través del proyecto CGL2017-85090-P, titulado "Desarrollo embrionario del origen anatómico de las arterias coronarias en vertebrados gnatostomados. Implicaciones evolutivas", y 2) la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, a través del

## Prefacio

proyecto PI-0530-201, titulado "Nuevos marcadores moleculares de aortopatía bicúspide".

Durante la ejecución del trabajo, la autora ha sido beneficiaria de un contrato como Joven Personal Investigador (Ref.: UMAJI75) en el marco del Sistema Nacional de Garantía Juvenil y del Programa Operativo de Empleo Juvenil 2014-2020 de la Consejería de Economía y Conocimiento (Junta de Andalucía), convocado el 19 de octubre de 2017 y concedido por Resolución del 22 de diciembre de 2017 por la Universidad de Málaga; y de un Contrato Predoctoral (Ref.: PRE2018-083176), correspondiente a las Ayudas para Contratos Predoctorales para la Formación de Doctores contemplada en el Subprograma Estatal de Formación, del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad en I+D+i, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica e Innovación 2017-2020 del Ministerio de Ciencia e Innovación (Gobierno de España), convocado el 3 de octubre de 2018 (BOE 09.10.2018) y concedido por Resolución del 18 de junio de 2019 por la Agencia Estatal de Investigación (AEI), quedando adscrita al proyecto CGL2017-85090-P, titulado "Desarrollo embrionario del origen anatómico de las arterias coronarias en vertebrados gnatostomados. Implicaciones evolutivas" y subvencionado por la propia AEI.

Finalmente, se hace constar que la autora ha realizado una estancia en un centro en el extranjero para optar a la Mención de Doctorado Internacional con cargo a la propia convocatoria de Ayudas para Contratos Predoctorales para la Formación de Doctores del Ministerio de Ciencia e Innovación. La estancia se realizó en el Departamento de Ingeniería Biomédica Wallace H. Coulter (División de Cardiología) del Georgia Institute of Technology y la Emory University (Atlanta, Georgia, Estados Unidos), desde el 11 de agosto

al 11 de noviembre de 2021 (92 días en total), con el objetivo de indagar en el desarrollo de un modelo animal para el estudio de la estenosis valvular por calcificación distrófica en relación con la válvula aórtica bicúspide.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Summary of the thesis</b>	<b>7</b>
<b>Capítulo I: Introducción</b>	<b>25</b>
Anatomía del corazón adulto	<b>27</b>
Las válvulas semilunares	<b>29</b>
Desarrollo embrionario de las válvulas semilunares	<b>32</b>
La enfermedad de la válvula aórtica bicúspide	<b>38</b>
<i>Anatomía de la VAB</i>	<b>39</b>
<i>Etiología de la VAB</i>	<b>42</b>
La aortopatía bicúspide	<b>48</b>
<i>Anatomía e histología de la aorta</i>	<b>49</b>
<i>Fisiopatología de la dilatación aórtica</i>	<b>51</b>
<i>Etiología de la aortopatía bicúspide</i>	<b>54</b>
Las arterias coronarias y su relación con la VAB	<b>59</b>
<i>Anatomía de las arterias coronarias</i>	<b>59</b>
<i>Alteraciones en el patrón coronario</i>	<b>61</b>
<b>Capítulo II: Objetivos</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo III: Publicación 1</b>	<b>73</b>
Endocardial-mesenchymal transition underlies fusion of the conotruncal ridges during normal and bicuspid aortic valve development	
<b>Capítulo IV: Publicación 2</b>	<b>87</b>
Embryonic development of bicuspid aortic valves	

<b>Capítulo V: Publicación 3</b>	<b>113</b>
Bicuspid Aortic Valve in 2 Model Species and Review of the Literature	
<b>Capítulo VI: Publicación 4</b>	<b>135</b>
Experimental evidence of the genetic hypothesis on the etiology of bicuspid aortic valve aortopathy in the hamster model	
<b>Capítulo VII: Publicación 5</b>	<b>157</b>
The Bicuspid Condition of the Aortic Valve Does Not Alter the Incidence of Accessory Coronary Artery Ostia in Syrian Hamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	
<b>Capítulo VIII: Conclusiones/Conclusions</b>	<b>167</b>
<b>Referencias</b>	<b>181</b>
<b>Publicaciones originales</b>	<b>215</b>

## Resumen

La válvula aórtica bicúspide (VAB) es la anomalía congénita cardiaca más frecuente en el ser humano, con una incidencia del 0.5-2% en la población general. Consiste en una alteración (reducción) del número de componentes que constituyen una válvula aórtica normal o tricúspide, y puede ser de tipo antero-posterior o latero-lateral. Es un carácter hereditario de tipo poligénico que sigue un patrón de herencia autosómica complejo, con expresividad variable y penetrancia incompleta. La VAB puede ser asintomática a lo largo de la vida de los pacientes afectados. Sin embargo, esta condición predispone a patologías que afectan tanto a la válvula (valvulopatías) como a la aorta (aortopatías), que hacen que el paciente requiera finalmente de una intervención quirúrgica debido a que no existen actualmente tratamientos alternativos eficaces. Además, los pacientes con VAB muestran mayor predisposición a presentar anomalías en el origen de las arterias coronarias en comparación con individuos con una válvula normal. Aunque lo habitual es que existan dos arterias coronarias izquierda y derecha que se originan en los senos aórticos izquierdo y derecho, existen anomalías que afectan tanto a su número como a su recorrido, y tienen relevancia clínica debido a que pueden causar muerte súbita cardiaca.

El objetivo general de la presente tesis ha sido profundizar en la etiofisiopatología de la VAB, así como en algunas de las patologías asociadas, como la dilatación aórtica, la aortopatía más común en pacientes con VAB, y cambios en el patrón coronario, concretamente, la presencia de ostia coronarios accesorios o supernumerarios. Para abordar estos aspectos, se han utilizado modelos animales consistentes en varias cepas de ratón de

## Resumen

laboratorio (*Mus musculus*) y hámster sirio (*Mesocricetus auratus*). Los resultados derivados de este trabajo de investigación han permitido discernir diversos aspectos relacionados con la VAB.

En primer lugar, se dilucidó el mecanismo morfogénético implicado en el desarrollo embrionario de la VAB antero-posterior, el morfotipo valvular más frecuente en pacientes. Para ello, se analizaron embriones de la cepa T de hámster sirio, un modelo animal espontáneo para este tipo de VAB con alta incidencia de la anomalía. Como resultado, se pudo determinar que la transición endocardio-mesénquima es el mecanismo celular subyacente a la extra-fusión de las crestas conotruncales que ocurre durante el proceso de valvulogénesis y da lugar a la VAB.

En segundo lugar, se llevó a cabo una revisión de todos los modelos animales descritos hasta el momento en la literatura para el estudio de la VAB. El compendio de toda esta información permitió el establecimiento de los procesos embrionarios clave implicados en el desarrollo de los diferentes tipos de VAB, así como los mecanismos celulares y moleculares que parecen estar involucrados en su regulación.

En tercer lugar, a partir de distintas cepas de ratón y hámster, tanto propias como descritas en la literatura, se pudo determinar la existencia de alelos modificadores que regulan el tipo, la incidencia y el grado de expresividad de la VAB. Además, se puso de manifiesto la importancia de tener en cuenta la existencia de diferencias inter- e intraespecíficas, ya que determinan la bondad de los modelos a la hora extrapolar resultados a la especie humana.

En cuarto lugar, se profundizó en la etiofisiopatología de la aortopatía bicúspide. Esta aortopatía, que consiste en dilatación de la aorta ascendente, conlleva un aumento del diámetro de la aorta junto con alteraciones a nivel molecular y estructural causados por defectos genéticos y hemodinámicos. Como resultado de este estudio, se propone la cepa T de hámster como el primer modelo animal para el estudio de la aortopatía bicúspide. Aunque no se han descrito dilataciones conspicuas de la aorta ascendente, estos animales presentan el sustrato histopatológico de la enfermedad, por lo que podrían representar a una cohorte de pacientes con predisposición a la aortopatía.

Por último, puesto que la VAB se asocia a anomalías en el origen de las arterias coronarias, se analizó la posible asociación entre VAB y la presencia de ostia coronarios accesorios o supernumerarios, una variante anatómica no patológica del patrón coronario. El análisis en hámsteres de la cepa T determinó que los ostia accesorios muestran un origen etiológico diferente al de la VAB. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de los ostia accesorios se correspondían con la arteria septal, lo que refuerza la idea de que debería considerarse una tercera arteria coronaria en roedores.

**Palabras clave:** válvula aórtica bicúspide; modelos animales; desarrollo embrionario; etiofisiopatología; aortopatía bicúspide; anomalías coronarias



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Summary of the Thesis

Bicuspid aortic valve (BAV) is the most common human congenital cardiac malformation, with an incidence of 0.5-2% in the general population, being more prevalent in men than in women in a 3:1 ratio. The anomaly consists of an alteration (reduction) in the number of components that constitute a normal or tricuspid aortic valve (TAV). BAV can be syndromic when it is associated with other cardiovascular malformations as in Turner, DiGeorge or Marfan syndromes; or non-syndromic when it occurs in isolation. Non-syndromic or isolated BAV is by far the most frequent type. It constitutes a polygenic inheritable trait whose transmission follows a complex autosomal inheritance pattern with variable expressivity and incomplete penetrance. The polygenic and complex nature of this trait has hindered the search for causal genes. The development of genetically modified animal models has enabled to propose several genes as potential causes of BAV. However, mutations or variants of only a few of these genes (*NOTCH1*, *GATA4*, *GATA5*, *GATA6*) have been associated with the presence of BAV in patients.

BAV can be asymptomatic throughout the life of affected patients. Nevertheless, this condition predisposes to valve pathologies (valvulopathies), such as stenosis due to dystrophic calcification, and aortic pathologies (aortopathies), such as coarctation and aortic dilatation. Both lead affected patients to eventually require surgical intervention, since there are currently no effective alternative treatments. In addition, patients with BAV are more prone to present anomalies in the origin of the coronary arteries compared to individuals with a TAV. Usually there are two coronary arteries, left and right, originating in the left and right aortic sinuses.

## Summary

Anomalies that affect both the number and the course of the arteries are of great clinical relevance because they can cause sudden cardiac death.

As mentioned above, BAV shows a reduction in the number of the anatomical elements that make up a normal aortic valve. Whereas a TAV has three sinuses, three leaflets, three commissures and three intervalvar triangles, in BAVs all these components are reduced to two, as a result of various possible morphogenetic defects that occur during embryonic development. The phenotypic variability of this character is so wide that over the years multiple classification and nomenclature systems have been established, which are of enormous importance in the clinical and surgical field.

Classically, two main BAV phenotypes have been considered: (1) the antero-posterior BAV, consisting of an anterior sinus and leaflet and a posterior sinus and leaflet; and (2) the latero-lateral BAV, which has two sinuses and two leaflets in the left and right position. In anterior-posterior BAVs, also called type A or R-L (right-left), the anterior sinus and leaflet result from the anatomical fusion of the left and right sinuses and leaflets. However, in latero-lateral BAVs, the anatomically fused elements are the right and non-coronary (NC) sinus and leaflet (type B or R-NC), or the left and non-coronary sinuses and leaflets (type C or L-NC). BAV type A is the most frequent among these phenotypes (70-80%), followed by BAV type B (20-30%) and BAV type C (3-6%). It is quite common to find in BAV patients (about 70%) a fibrous ridge-like structure, called a raphe, between the anatomically fused sinuses and leaflets. In many cases this structure is described as a scar, representing the defective commissure resulting from the fusion of the leaflets. However, there is still no experimental evidence that raphes are reminiscent of

malformed commissures and, as it will be discussed later, not all BAVs result from valve leaflet or primordia fusion, as they can also originate as a consequence of a defective excavation process or the absence of a valve primordium (Publication 2 of this thesis).

Considering the absence, presence, and size of the raphe, as well as the variation in symmetry and size of the sinuses, it is evident that BAV can manifest a great phenotypic variability in patients, so that the nomination of these phenotypes is controversial from the clinical point of view. For this reason, a new nomenclature system has recently been proposed in order to homogenize the nomenclature and terminology in the clinical field.

During the second half of the last century, two possible etiological factors were proposed to explain the origin of BAV: 1) hemodynamic alterations, and 2) defects in the cardiac neural crest (CNC). Regarding the first, it was proposed that BAV is a secondary manifestation of an obstructive vascular defect that alters blood flow, affecting late valvulogenesis. However, this hypothesis is not able to explain the development of isolated non-syndromic BAVs. The second etiological factor consists of abnormalities in the behavior of CNC cells. The discovery of the involvement of CNC in normal and abnormal cardiovascular development was a major breakthrough in the understanding of the etiology of many congenital cardiovascular diseases. Several studies demonstrated that the abnormal behavior of these cells gives rise to syndromes involving BAV, such as Turner, DiGeorge or Shone syndromes, although direct experimental evidence was not obtained until years later.

The first experimental evidence for BAV formation was obtained by Shaner in 1963 from four pig embryos. This study suggested that BAV can be formed

## Summary

by the fusion of valvular primordia during prenatal stages. It was not until the end of the 20th century that the morphogenetic mechanisms of BAV formation could be studied in depth, thanks to the development of a spontaneous animal model of BAV type A by the research group to which the author belongs. This model consists of an inbred strain of Syrian hamster with a high incidence of spontaneously appearing BAV type A. The first embryological studies with this model determined that several anatomical variants of BAV type A (BAV with and without raphe, and intermediate phenotypes between TAV and BAV) are formed as a result of fusion of the valve primordia or valve cushions in early valvulogenetic stages. These studies confirmed the congenital nature of BAV and discarded previously theorized developmental mechanisms. They also allowed to propose the existence of an anatomical continuum reflecting the severity of the morphogenetic defect and validating the possible involvement of CNC in the development of BAV.

Years later, the second animal model of congenital BAV, the endothelial nitric oxide synthase-deficient mice (eNOS knockout; eNOS-KO), was described. The eNOS-KO mice exhibited latero-lateral (B or C) BAV and alterations in blood pressure due to impaired vasodilator function caused by the lack of nitric oxide production. The comparative study of BAV embryology between the hamster and the mouse models demonstrated that the development of the antero-posterior BAV differs from that of the latero-lateral BAV. In addition, the direct involvement of CNC in the formation of BAV type A was experimentally demonstrated. In the hamster model, BAV type A forms as a consequence of the excessive fusion of the conotruncal ridges during cardiac outflow tract septation, resulting in more or less fused left and right

valvular cushions, leading to BAV type A. However, the cellular mechanism underlying the fusion process was not addressed. The elucidation of this mechanism has been the main objective of Publication 1 of the compendium of this thesis. The results of this article provide evidence that fusion takes place by the disappearance of the endocardial cells lining the central portion of the conotruncal ridges, two long, helical, and opposite endocardial cushions that extend through the whole length of the embryonic OFT. The disappearance of endocardial cells after their contact is an event mediated by a complete endothelial-mesenchymal transition (EMT) process, probably induced by the CNC cells that conform the aortic-pulmonary septation complex.

Regarding eNOS-KO mice, BAV type B results from defective endocardial cushion formation, with a right conotruncal ridge attached or fused from its origin to the posterior intercalated cushion. Intercalated cushions are small endocardial cushions located anterior and posteriorly in the middle region of the OFT, where the valvular primordia are formed. As a result of the defective formation of the endocardial cushions, a large right and a normal left valvular cushions form in the embryonic aortic outflow, leading to BAVs type B. These results were a milestone in the study of BAV disease, since they demonstrated that BAV types are not merely anatomical variants of the same congenital defect, as postulated before, but each BAV anatomical type results from a distinct etiology. Consequently, it could be assumed that each type of BAV has different genetics, natural history, and associated pathologies. In fact, since the beginning of the last decade, the type of BAV was considered in multiple clinical and surgical studies to elucidate the etiopathology and

## Summary

progression of associated-BAV pathologies, establishing that the anatomical type of BAV is an important factor in the disease at the clinical level.

In addition, during the past decade, studies on the embryology of BAV have multiplied, with the incorporation of valvular morphology in the phenotypic evaluation of genetically engineered mice. These studies have resulted in a whole new body of data on the etiology and embryonic development of BAV, which had not been gathered, reviewed, and analyzed jointly until now. This analysis has been reflected in Publication 2 of the present thesis, which compiled the morphogenetic, cellular and molecular mechanisms that seem to be involved in the formation of BAV. As a result, three key processes for the development of BAV have been established, as well as the alterations of the cellular mechanisms involved in each process. The first process consists of anomalous endocardial cushion formation, due to defects in the EMT process or CNC cell migration, resulting in coalescence of two endocardial cushions, prior to normal outflow tract septation. This process leads to the development of two valve cushions instead of three, the remodeling of which results in BAV type B or C. The second key process is excessive fusion of the conotruncal ridges, mediated by an alteration in the EMT process (results of Publication 1), which takes place during the process of outflow tract septation, due to alterations in the behavior of the CNC cells that colonize the conotruncal ridges. This process results in coalescence of the left and right aortic valve cushions and BAV type A. Finally, the third process consists in alterations of the process of excavation of the valve cushions resulting from an abnormal distribution of CNC cells, an altered proliferation of the mesenchymal cells that compose the cushions and/or a defect in the production of extracellular matrix, generating BAV of different

types with different degrees of severity. In addition, in-depth analysis of these studies has allowed us to establish consistent relationships between the described mechanisms and various causal signaling pathways. Experimental evidence supports a central role of the NOTCH signaling pathway, as its disruption can affect both the EMT process responsible for endocardial cushion formation, and CNC migration and positioning in the valve cushions. CNC is responsible for outflow tract septation by inducing the EMT process in the endocardium overlying the opposing conotruncal ridges (results from Publication 1). Thus, abnormalities in the behavior of these cells mediated by NOTCH may alter the EMT process and conotruncal ridge fusion. Therefore, it can be interpreted that the three key processes in BAV formation (endocardial cushion formation, conotruncal septation and cushion excavation) are regulated by the CNC at three consecutive developmental stages (pre-septation, septation and post-septation). So that, a specific genetic defect could alter the behavior of the CNC at three possible developmental time points, determining the embryonic process affected and the resulting anatomical type of BAV.

The studies with patients over the past decade made evident that each type of BAV predisposes differently to the development of valvulopathies and aortopathies, supporting the hypothesis that each anatomical type of BAV has a specific etiology, which affects the development and progression of associated pathologies. Other patient studies aimed at elucidating the heritability of BAV revealed discordance in BAV morphology both among first-degree relatives and among fetuses with Turner syndrome caused by complete monosomy of the X chromosome (45,X). These studies reveal the complex etiology of a disease dominated by a few molecular pathways and

## Summary

embryonic cell lineages affecting three consecutive valvulogenetic stages. This phenotypic discordance has also been described in animal models of BAV, most of which represent genetically uniform populations.

A total of 29 strains of these two rodent species have been described: two inbred strains of Syrian hamster with BAV type A, 27 strains of mutant mice with BAV type B, two mutant strains with BAV type A, and two with both BAV type A and B. Although these spontaneous and mutant models show a high incidence of BAV associated with specific genetic defects and developmental mechanisms, a comprehensive analysis summarizing all this information had not been performed, and relevant questions such as why each model has a specific BAV morphotype and penetrance have been overlooked. Additionally, it remained to determine the goodness of these models, i.e., the ability to extrapolate the results obtained to the human species. Publication 3, which is part of the compendium of this thesis, highlights inter- and intraspecific differences between humans and animal models in the phenotypic expression of aortic valve malformations. Syrian hamster shows a wide spectrum of anomalies including TAV and BAV with different degrees of leaflet fusion, similar to those described in humans (phenotypic continuum), although with an overrepresentation of BAV type A. In contrast, the laboratory mouse presents a reduced spectrum of valvular defects, among which BAV type B without raphe predominates. These results alert us to the need of considering these differences when using animal models for studies on BAV. In addition to interspecific differences, intraspecific differences (i. e., differences between populations of the model species) were detected in both mouse and hamster strains, pointing to the existence of genetic modifiers that influence the development of BAV. This compendium of results allows reinterpretation of

the studies regarding the etiology of BAV. It can be concluded that, among the mutations associated with BAV, some may lead to the development of BAV type A or B depending on genetic modifiers, environmental factors, or epigenetic factors, while others may be type-specific. This study, together with the results of Publication 2, supports the hypothesis that mutations in a single gene expressed in one of the key developmental processes for BAV formation (endocardial cushion formation, outflow tract septation, and valvular cushion excavation) or in any of the embryonic cell lineages involved in these processes (CNC and SHF, with more emphasis on the role of CNC based on the results of Publication 1) could result in BAV type A or B, depending on additional genetic (modifier alleles), environmental, and/or epigenetic factors.

Approximately, 50% of patients with BAV develop dilatation of the proximal aorta, a condition known as bicuspid aortopathy, which carries a high risk of aortic dissection and rupture. Aortic dilatation refers to an alteration in the size of the aorta, which is considered pathological when it is greater than the mean value of the diameter corresponding to 95% of the population for a normal person of a specific age group, sex and body size. Although aortic dilatations have been described in all anatomical regions of the aorta, those mainly affected by bicuspid aortopathy are the aortic root and the ascending aorta. Dilatation of the aortic root affects 16.4% of patients with BAV, whereas the remaining 83.6% present dilatation of the ascending aorta, making it the most common condition in this population. Global dilatation, that is, both the aortic root and the ascending aorta affected, was found in 5.7% of all patients with BAV. Furthermore, it seems that each anatomic type of BAV is associated with a specific region of the aorta affected

## Summary

by dilatation. Patients with BAV type A may develop dilatation of both the aortic root and ascending aorta, particularly along the convex region. Patients with BAV type B mainly show dilatation of the ascending aorta, frequently extending into the aortic arch. Aortic dilatation is not exclusive to patients with BAV. Individuals with a normal aortic valve (TAV) can also develop aortic dilatation and aneurysms. However, dilatation in patients with BAV manifests more severely and with an increase in diameter at younger ages than patients with TAV.

The ascending aorta of patients with BAV usually presents alterations at the histomorphological level. These alterations consist of disorganization and death of smooth muscle cells; disorganization and fragmentation of the elastic fibers that constitute the lamellae; and accumulation of mucoid substances in the extracellular matrix. Together, these alterations constitute the histopathological substrate of bicuspid aortopathy, known as cystic medial necrosis, and affect the convex region of the aorta to a greater extent. In addition to these histomorphological defects, molecular alterations associated with the disease have been described, such as defects in the expression of fibrillin 1 and 2 (FBN-1 and 2), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), metalloproteases 2 and 9 (MMP-2 and 9) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Although a great knowledge has been generated so far on the pathobiology of aortic dilatation, a clear picture of the different cellular and molecular mechanisms involved in the disease is still lacking.

Although BAV was described by Leonardo da Vinci some 500 years ago, the first scientific work that evidenced the association between BAV and aortopathy was published in 1928. In this study, the Canadian physician Maude Abbott pointed out the existence of patients with aortic coarctation,

BAV and aneurysms and dissections of the thoracic aorta. Years later, between 1970 and 1990, pathology studies corroborated the association of BAV and aortic dissection. The appearance and development of new imaging techniques in recent decades has confirmed that valvular dysfunction and aortic dilatation are the most common pathologies associated with BAV.

The search for the causes of valve dysfunction prompted early work to focus on the study of cardiac outflow tract hemodynamics, demonstrating experimentally that BAV causes abnormal flow patterns that asymmetrically increase proximal aortic wall stress. Thus, it seems reasonable that the first hypothesis proposed to explain the etiology of bicuspid aortopathy was based on hemodynamic alterations. This hypothesis postulates that BAV morphology causes alterations in blood flow that lead to defects in aortic hemodynamics, resulting in a progressive deterioration of the histological structure of the aortic wall.

Concomitant to the development of the hemodynamic hypothesis, numerous clinical and basic studies were carried out focusing on the genetic aspects of the disease. The first evidence pointing to the genetic influence on bicuspid aortopathy was obtained from the study of patients undergoing surgery for BAV replacement. Some of these patients, after surgery, developed dilatation of the ascending aorta, despite the fact that the hemodynamics and functionality of the valve had been corrected by the surgical intervention. In 2005, Garg et al. identified the first mutation that appeared to be directly related to non-syndromic BAV. This mutation was in the *NOTCH1* gene, a transmembrane receptor involved in multiple cellular processes in cardiac and vascular development. Subsequent work by other

## Summary

research groups linked the existence of mutations in *NOTCH1* in patients with sporadic BAV to the presence of thoracic aortic aneurysm.

The generation of transgenic animal models in recent decades, reviewed in Publications 2 and 3 of this thesis, has led to significant progress in the identification of possible causal genes for BAV and/or aortopathy (29 in total). However, only three of these genes (*NOTCH1*, *GATA5* and *ROBO4*) have been associated with aortic disease in a minority of affected patients. Mutations in these genes, all with relevant functions in embryonic development of the cardiac outflow tract, appeared to cause not only BAV, but also aortic dilatation in the adult. The embryonic development of the aortic valve and ascending aorta are closely related. Cells of the SHF and CNC participate in the formation of both structures. While both cell lineages differentiate into smooth muscle cells in the arterial region of the valve (the aortic root) and in the ascending aorta, these cells also give rise to the interstitial cells that build the valve leaflets. It has been shown that smooth muscle cells derived from CNC cells show a lower degree of differentiation, impaired contraction and a decrease in the TGF $\beta$  signaling pathway in patients with BAV and ascending aortic aneurysm. Therefore, it has been proposed that abnormalities in this specific cell lineage may lead to BAV, as proposed in Publications 2 and 3 of this thesis, and to a congenital structural defect in the ascending aorta that predisposes to aortic wall degeneration. This concept consequently forms the basis of the genetic hypothesis of BAV-associated aortic dilatation.

The etiology of bicuspid aortopathy has been the subject of intense debate over the last two decades, as a result of the different approaches derived from the hemodynamic and genetic hypotheses. Although the scientific community now accepts that both hypotheses together explain the

development of BAV-associated aortic dilatation, little empirical evidence has been obtained to support the genetic hypothesis, mainly because the human population is genetically heterogeneous and shows different clinical presentations of the disease associated with different disease etiologies. Until now, there are no animal models that adequately replicate the pathogenesis of human bicuspid aortopathy (cystic medial necrosis). Therefore, further understanding of the etiopathogenesis of the disease has been hampered by the lack of animal models.

As a result of the research derived from this thesis (Publication 4), the first spontaneous animal model of predisposition to bicuspid aortopathy (T strain of Syrian hamster) is presented. As discussed in previous sections, the T strain constitutes a model of isolated BAV, in which the aortopathies or valvulopathies commonly associated with human BAV have not been detected. However, histopathological studies of the ascending aorta in this model had not been performed so far. For Publication 4 of this thesis, a comparative histomorphological study was performed comparing animals with TAV and BAV from T strain and animals with TAV from a control strain (0% BAV). This study revealed that T strain animals, both with TAV and BAV, show alterations of the ascending aorta similar to the cystic medial necrosis that characterizes human bicuspid aortopathy. Furthermore, the expression and localization of several proteins proposed to be involved in human bicuspid aortopathy in studies with patients were verified. Again, the results were consistent with the existence of a structural anomaly of the wall of the ascending aorta, accompanying both TAV and BAV, in a genetically uniform population (T strain; inbred and isogenic). These data constitute strong direct experimental evidence that supports the genetic hypothesis in the context of

## Summary

the etiology of bicuspid aortopathy. The study concludes that this model may represent a group of patients in which anomalous CNC migration during cardiac outflow tract development results in a structural defect in the medial ascending aorta, together with incomplete BAV penetrance. Given that in humans the penetrance of BAV is also incomplete, these results allow to hypothesize that a significant population of patients with a normal valve presents a risk of aortopathy similar to that of patients with BAV, with whom they share the same genetic predisposition. These results are relevant for the clinical management of the progression of aortopathy in affected patients, as well as for the establishment of experimental groups of patients in research aimed at the search for biomarkers and the discovery of pathophysiological mechanisms.

With respect to anomalies in the coronary artery pattern, although they had been detected in BAV patients as early as the 20th century, it was not until 2018 when Naito et al. confirmed the association between BAV and anomalies in the origin of human coronary arteries. These researchers demonstrated that, while patients with a normal aortic valve (TAV) showed a 3% risk of presenting congenital anomalies in the origin and/or course of the coronary arteries, the incidence in patients with BAV was significantly higher (7%). The association between BAV and coronary anomalies had been previously established in the hamster model by the research group to which the author belongs. Several studies carried out at the end of the last century demonstrated that animals of the hamster strain with a high spontaneous incidence of BAV type A showed, in addition to BAV, a high proportion of coronary anomalies. The main anomalies detected were single coronary artery, anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary trunk,

and anomalous origin of the left coronary artery from the non-coronary aortic sinus. These anomalous coronary patterns turned out to be very similar to those described in humans and coincided with those for which association with human BAV had been demonstrated. Years later, the group demonstrated that the incidence of coronary pattern abnormalities increased steadily with the degree of severity of the valvular defect.

The anatomy of the coronary arteries of rodents, in general, and of the Syrian hamster, in particular, shows some differences with respect to those of humans. While the human coronary arteries course subepicardially, in rodents they run intramyocardially. In the hamster and other rodents, in addition to the right and left coronary arteries, there is a third coronary artery called the septal artery, which originates from one of the main coronary arteries and irrigates most of the interventricular septum. The septal artery may emerge from a separate ostium located in the right or left aortic sinus, which is called accessory coronary ostium. In the Syrian hamster, this independent origin of the septal artery has been detected in 5% of cases.

In humans, accessory or supernumerary coronary ostia have also been detected and coexist with the coronary orifices corresponding to the two main left and right coronary arteries. These accessory ostia constitute the origin of the conal artery, which irrigates the outflow tract, the nodal artery, which irrigates the sinoatrial node, and the left circumflex and left anterior descending arteries, which mainly irrigate the left ventricle. In the Syrian hamster, the accessory ostia usually correspond to the septal artery or the conal artery. While the coronary artery anomalies described above are of great clinical importance because of their predisposition to sudden cardiac death, the presence of accessory coronary ostia does not trigger any

## Summary

pathology and is therefore considered an anatomical variant of the normal coronary pattern.

Given that accessory coronary ostia have been detected in both patients and the hamster model, and the association between BAV and congenital coronary artery anomalies has been verified in both species, a study was conducted in the Publication 5 of this thesis to further determine if BAV and coronary pattern alterations in the Syrian hamster have a common etiological origin. Considering that valvulogenesis and coronariogenesis are two embryonic processes that occur simultaneously, the morphogenetic defects that give rise to BAV type A could also affect the formation of coronary arteries, particularly the left coronary artery. It suggests that there is a specific alteration in the left side of the developing aortic valve (an anomalous distribution of CNC cells) that prevents the correct connection and formation of the left coronary artery. Thus, a significantly low incidence of left accessory ostia in the hamster model was expected. According to the results of this study, there are no significant differences in the incidence of accessory coronary ostia between TAV and BAV morphotypes. Nevertheless, pooled analysis of the entire hamster population determined that the incidence of accessory ostia was significantly lower on the left than on the right side of the valve. These results suggest that the presence of these ostia preferentially on the right side of the valve is a species-specific characteristic of the Syrian hamster, not associated with the etiology of valvular malformations. Thus, the results indicate that the CNC defect in the hamster does not modify the number of connections established with the aortic root during coronariogenesis, suggesting a different etiology for this anatomical variant. Finally, it should be noted that the accessory ostia corresponded in

most cases to the septal artery, a well-developed artery that is always present in the hamster, even if there are anomalies in the coronary pattern. Since pattern variation never affects the septal artery, the data of the present study support the notion that, in the hamster, the septal artery should be considered a third coronary artery.

**Keywords:** bicuspid aortic valve; animal models; embryonic development; etiopathology; bicuspid aortopathy; coronary anomalies



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo I

## Introducción



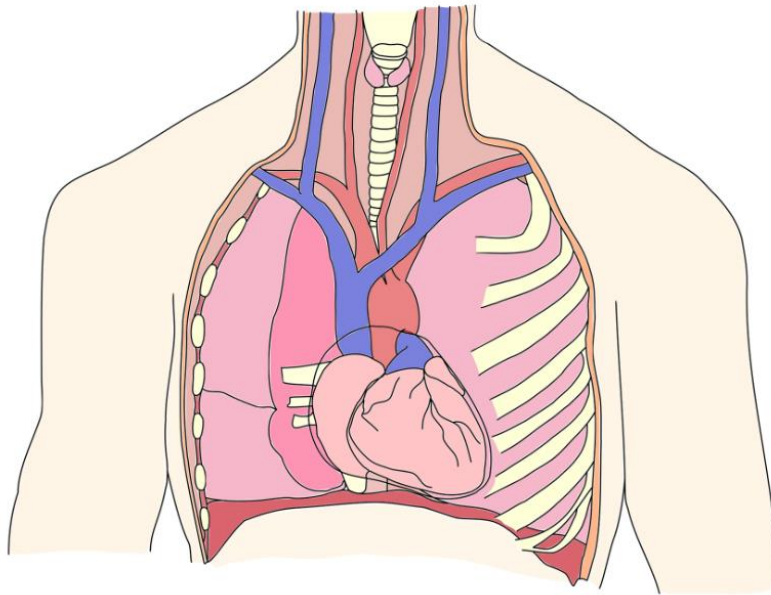
UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Anatomía del corazón adulto**

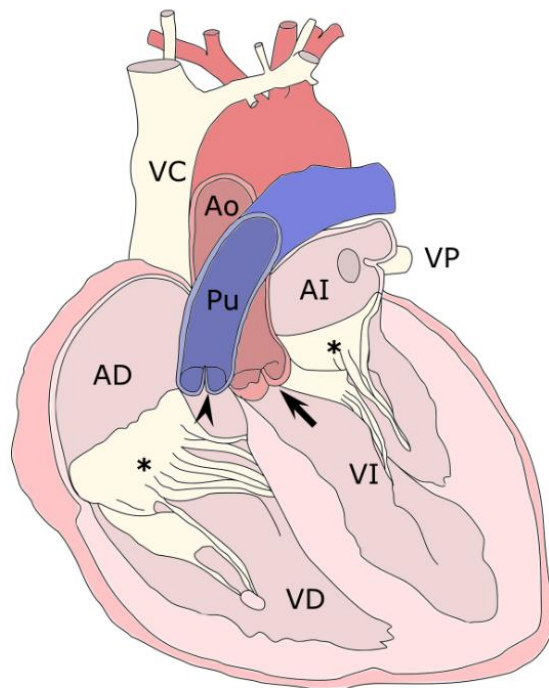
El corazón es el órgano principal del sistema circulatorio. De él depende que tanto la distribución de oxígeno y nutrientes hacia los órganos y tejidos, como la retirada de CO<sub>2</sub> y sustancias de deshecho se lleven a cabo de manera adecuada. Se trata de un órgano musculoso que actúa como bomba propulsora y que se localiza en el interior de la cavidad torácica. En el hombre, el corazón se dispone de manera oblicua sobre la superficie superior del diafragma, dos tercios a la izquierda de la línea media y posterior al esternón y cartílagos costales que unen el esternón con las costillas (**Figura 1A**) (*Netter, 1976; Anderson & Becker, 1981; Hurst, 1990*).

Externamente, el corazón está cubierto por una membrana serosa denominada pericardio que delimita una cavidad (pericárdica) por la que circula un fluido lubricante. Internamente, el corazón presenta una estructura tetracamera. Cada una de estas cámaras está compuesta principalmente por músculo cardíaco o miocardio. Las cámaras superiores, denominadas atrios, actúan principalmente como cavidades colectoras de sangre. Las cámaras inferiores o ventrículos, de paredes mucho más robustas, tienen función propulsora (**Figura 1B**) (*Netter, 1976; Anderson & Becker, 1981; Hurst, 1990*). La presencia de estas cuatro cámaras permite el establecimiento de un sistema de circulación sanguínea doble, en el que se distingue una circulación pulmonar y una sistémica. Brevemente, la circulación pulmonar transporta sangre sin oxigenar desde el corazón hacia los pulmones para que se oxigene y sea devuelta de nuevo al corazón. La circulación sistémica reparte dicha sangre oxigenada hacia los órganos y regresa al corazón, que la vuelve a impulsar hacia los pulmones (*Netter, 1976; Anderson & Becker, 1981; Hurst, 1990*).

**A**



**B**



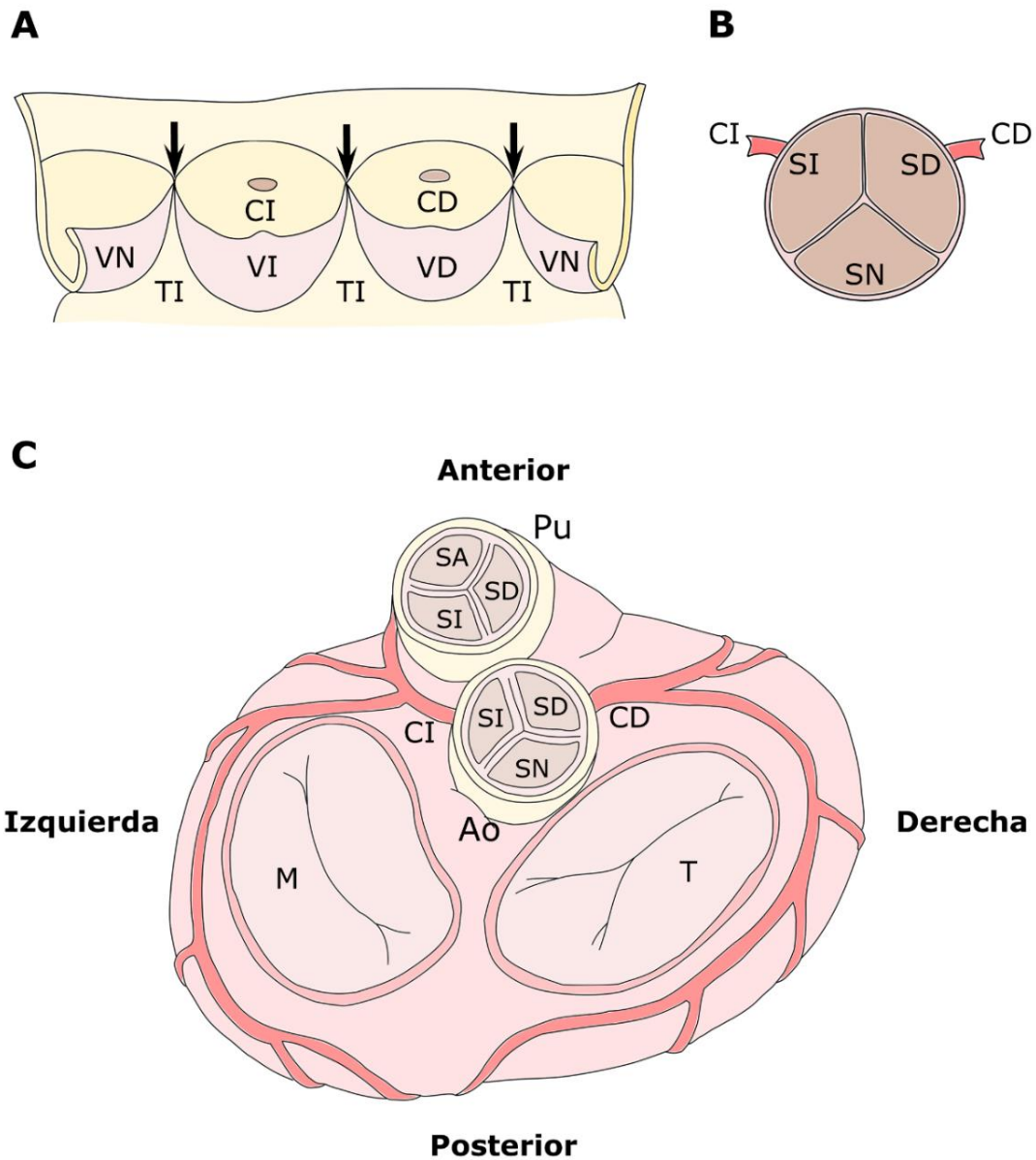
**Figura 1. A.** Representación esquemática del interior de la cavidad torácica. El corazón se dispone de manera oblicua sobre la superficie superior del diafragma, dos tercios a la izquierda de la línea media y posterior al esternón y cartílagos costales que unen el esternón con las costillas. **B.** Representación esquemática del corazón. Vista frontal. AD: atrio derecho, AI: atrio izquierdo, Ao: arteria aorta, Pu: arteria pulmonar, VC: venas cava, VD: ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo, VP: venas pulmonares, asteriscos: válvulas atrio-ventriculares, cabeza de flecha: válvula pulmonar, flecha: válvula aórtica.

Existen cuatro válvulas en el corazón que garantizan la unidireccionalidad del flujo sanguíneo al impedir el retroceso de la sangre (**Figura 1B**). Estas válvulas, cuya apertura y cierre regulan el paso de la sangre entre compartimentos, se localizan en los límites atrio-ventriculares y ventrículo-arteriales. La válvula atrio-ventricular derecha o tricúspide se encuentra entre el atrio y ventrículo derechos, mientras que la válvula atrio-ventricular izquierda, mitral o bicúspide se ubica entre el atrio y ventrículo izquierdos (**Figura 1B**). En cuanto a las válvulas ventrículo-arteriales, se denominan de forma general válvulas semilunares o sigmoideas por su diseño arquitectónico, aunque cada una de ellas recibe el nombre de la arteria a la que regulan el flujo sanguíneo. Por lo tanto, la válvula localizada en el límite entre el ventrículo izquierdo y la arteria aorta recibe el nombre de válvula aórtica, mientras que la que se encuentra entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar se denomina válvula pulmonar (**Figura 1B**) (*Netter, 1976; Anderson & Becker, 1981; Hurst, 1990*).

### **Las válvulas semilunares**

Las válvulas semilunares constan de tres espacios cóncavos alojados en la pared arterial, conocidos como senos de Valsalva, y tres valvas o cúspides que constituyen el componente móvil de la válvula (**Figura 2A,B**). El seno es la estructura que da soporte a la valva, al cual se encuentra unida de manera proximal y lateral, quedando libre la parte distal o borde libre de la valva. El punto de contacto entre dos valvas adyacentes recibe el nombre de comisura. Debido a la morfología semilunar derivada de la inserción de las valvas en el seno, aparece un espacio triangular en el área entre dos senos y valvas

adyacentes que se denomina triángulo intervalvar (*Angelini et al., 1989a; Anderson et al., 1991; McKay et al., 1992; Sutton et al., 1995; Hokken et al., 1997*).



**Figura 2.** Representación esquemática de la anatomía de la válvula aórtica. **A.** Visión frontal de la válvula aórtica tricúspide (VAT) abierta por el seno no coronario. Las flechas señalan las comisuras. **B.** Visión craneal de una VAT cerrada. **C.** Visión craneal del corazón. Se muestra la posición anatómica de las válvulas aórtica y pulmonar. Ao: válvula aórtica, CD: coronaria derecha, CI: coronaria izquierda, M: válvula mitral, Pu: válvula pulmonar, SD: seno coronario derecho, SI: seno coronario izquierdo, SN: seno no coronario o posterior, T: válvula tricúspide, TI: triángulo intervalvar, VD: valva derecha, VI: valva izquierda, VN: valva no coronaria o posterior. Modificado de Soto-Navarrete et al. 2020.

La nomenclatura de los componentes de las válvulas semilunares responde a su posición anatómica respecto al cuerpo, de tal manera que hay senos y valvas izquierdos, derechos y posteriores en el caso de la válvula aórtica, e izquierdos, derechos y anteriores en el de la pulmonar (**Figura 2C**). Dada su posición anatómica enfrentada, las valvas y senos izquierdos de la válvula aórtica son adyacentes a los de la válvula pulmonar, al igual que ocurre con las valvas y senos derechos (**Figura 2C**). Por último, los senos izquierdo y derecho de la válvula aórtica también suelen denominarse senos coronarios. Esto se debe a que, en condiciones normales, las arterias coronarias izquierda y derecha, responsables de la propia irrigación del corazón, se originan, anatómicamente, a partir de dichos senos. Por consiguiente, el seno posterior de la válvula aórtica suele designarse como seno no coronario (**Figura 2A,B**) (*Gross & Kugel, 1931; Hokken et al., 1997*).

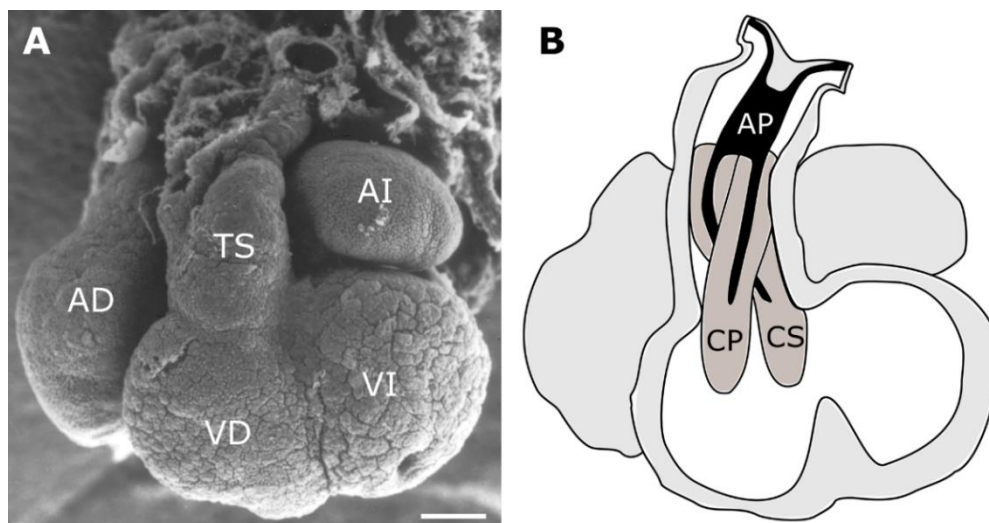
La disposición de todos estos elementos anatómicos confiere a las válvulas semilunares una conformación similar a nidos de golondrina adheridos a la pared arterial. Este diseño arquitectónico, denominado tricúspide (tres senos, tres valvas, tres comisuras y tres triángulos intervalvares), es considerado el más adecuado para que las válvulas funcionen de manera eficiente. Tras la contracción cardiaca o sístole, las valvas se pliegan y permiten el paso de sangre desde los ventrículos hacia las arterias. Durante la diástole o relajación cardiaca, las valvas quedan extendidas impidiendo el retroceso del flujo sanguíneo. La coaptación de las valvas garantiza el cierre hermético de la válvula (*Angelini et al., 1989a; Anderson et al., 1991; McKay et al., 1992; Sutton et al., 1995; Hokken et al., 1997*).

## **Desarrollo embrionario de las válvulas semilunares**

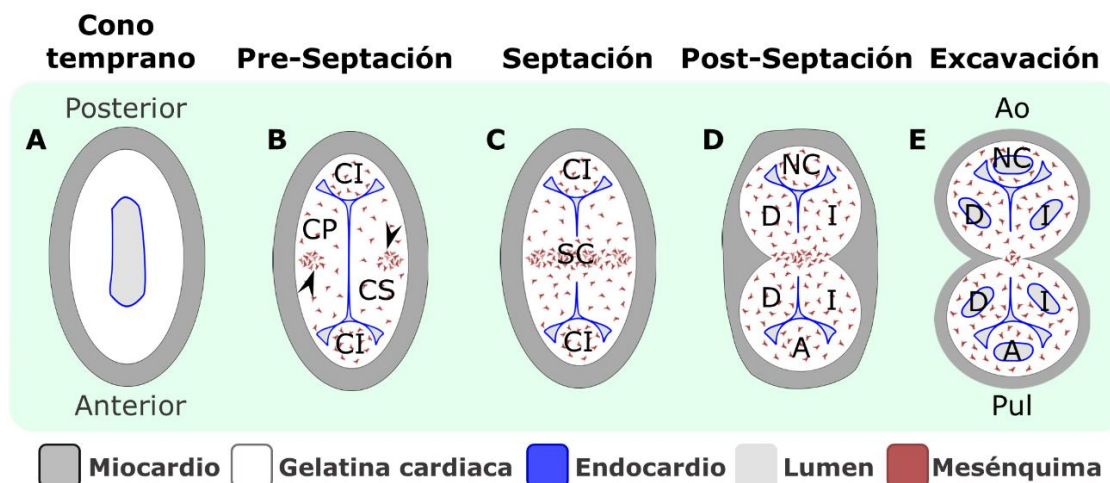
El corazón es el primer órgano que se forma durante el desarrollo embrionario en un proceso conocido como cardiogénesis. El inicio de la cardiogénesis requiere de la participación de dos poblaciones celulares de origen mesodérmico: el campo cardiaco primario (*first heart field*, FHF) y el campo cardiaco secundario (*second heart field*, SHF) (*Buckingham et al., 2005*). En etapas tempranas del desarrollo, las células del FHF convergen en la línea medio-ventral del embrión para formar un tubo cardiaco temprano de naturaleza miocárdica (*Kelly et al., 2014*). A continuación, las células del SHF, que se localizan en el mesodermo circunfaríngeo flanqueando al FHF, se incorporan a dicho tubo para continuar con el proceso morfogenético (*Kelly et al., 2014*). En etapas tardías de la cardiogénesis, interviene un tercer linaje celular compuesto por las células de la cresta neural cardiaca (CNC). Se trata de una población de células ectomesenquimáticas que migran hacia el corazón en desarrollo desde la unión neuroectodérmica de los rombómeros 3-8 del cerebro posterior (*Kirby et al., 1983*). Cada una de estas tres poblaciones celulares participa en la formación de diferentes regiones del corazón adulto. Mientras que el FHF da lugar principalmente al miocardio del ventrículo izquierdo, el SHF contribuye a una gran parte del miocardio y endocardio de los atrios, ventrículo derecho y tracto de salida. Las células derivadas de la CNC son necesarias para la formación de los troncos aórtico y pulmonar y las válvulas semilunares (*Kirby et al., 1983; Buckingham et al., 2005; Kelly et al., 2014; Schussler et al., 2020*).

Los primordios de las válvulas semilunares se desarrollan en el interior del tracto de salida cardiaco embrionario temprano o conotruncus. Inicialmente,

el tracto de salida aparece como un tubo cilíndrico único localizado en la parte anterior del corazón en formación (**Figura 3**). La porción más distal se conecta con el saco aórtico, una cavidad de paredes mesenquimáticas en la que convergen los arcos faríngeos. La parte proximal se encuentra en continuidad con el ventrículo derecho (*Gittengerger-de-Groot et al., 2005; Rana et al., 2014*). En este momento, el conotruncus está compuesto por una capa de miocardio externa y una capa de endocardio interna separadas por un gran espacio acelular rico en ácido hialurónico, glucosaminoglicanos y proteoglicanos denominado gelatina cardiaca, que será poblado a continuación por células mesenquimáticas (**Figura 4A**) (*Davis, 1924*).



**Figura 3.** Embrión de hámster es un estadio temprano de septación del tracto de salida. **A.** Micrografía de microscopía electrónica de barrido del corazón en desarrollo. AI: atrio izquierdo, VI: ventrículo izquierdo, TS: tracto de salida, AD: aurícula derecha, VD: ventrículo derecho. Barra de escala: 200 $\mu$ m. **B.** Representación esquemática que muestra la posición del complejo de septación aórtico-pulmonar (AP) y las dos crestas conotruncales enfrentadas y helicoidales. Las células de la CNC (representadas con una línea gruesa negra) migran a través de los arcos aórticos a lo largo del tracto de salida, concentrándose principalmente en dos condensaciones que entran proximalmente a lo largo de las crestas parietal (CP) y septal (CS). Modificado de Soto-Navarrete et al. 2020.



**Figura 4.** Esquema de los estadios sucesivos del desarrollo normal de las válvulas semilunares. Vistas craneales. **A.** Antes de comenzar la septación, el tracto de salida está compuesto por una capa de miocardio y otra de endocardio, separados por gelatina cardiaca. **B.** Se forman cuatro cojines mesenquimáticos, consistentes en dos crestas conotruncales enfrentadas, septal (CS) y parietal (CP), y dos cojines intercalares (CI), anterior y posterior. Las células de la CNC forman dos proyecciones de células mesenquimáticas condensadas (cabezas de flecha). **C.** Las células de la CNC inducen la fusión de la porción central de las crestas conotruncales. **D.** El septo conotruncal (SC) divide el tracto de salida en dos tractos independientes, aórtico y pulmonar. Cada uno contiene tres cojines valvulares, que son los primordios valvulares aórtico y pulmonar. **E.** Los cojines valvulares sufren remodelación mediante un proceso de excavación, dando lugar a las valvas aórtica y pulmonar definitivas. A: cojín valvular anterior pulmonar, I: cojín valvular izquierdo aórtico o pulmonar, NC: cojín valvular aórtico posterior o no coronario, D: cojín valvular derecho aórtico o pulmonar. Modificado de Soto-Navarrete et al. 2020.

La celularización de la gelatina cardiaca da lugar a cuatro cojines endocárdicos, que constituyen los primordios valvulares (**Figura 4B**). Estos cojines endocárdicos consisten en dos crestas conotruncales y dos cojines intercalares. Las crestas conotruncales septal y parietal son dos cojines endocárdicos alargados, helicoidales y enfrentados uno al otro que se extienden a lo largo de todo el tracto de salida cardiaco embrionario. La cresta conotruncal parietal se localiza ventro-lateralmente, mientras que la septal lo hace dorso-medialmente (**Figura 3, 4B**). Los cojines intercalares son pequeños cojines endocárdicos ubicados anterior y posteriormente en el

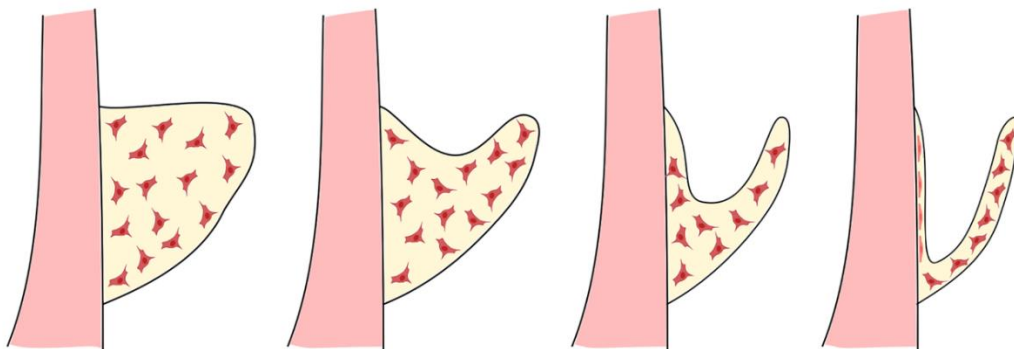
tracto de salida (**Figura 4B**). Estos cojines se desarrollan como extensiones laterales de la porción más distal de las crestas conotruncales, es decir, el cojín intercalar posterior está conectado a la cresta conotruncal parietal y el anterior a la septal. Por lo tanto, aunque los cojines intercalares están conectados proximalmente con sus respectivas crestas conotruncales, a nivel distal puede distinguirse cada cojín de manera individual (*Spicer et al., 2014; Peterson et al., 2018*). En el proceso de celularización de la gelatina cardiaca que forma los cojines endocárdicos participan dos mecanismos celulares diferentes: 1) la delaminación local de las células endocárdicas derivadas del SHF que revisten la gelatina cardiaca, mediante un proceso de transición endocardio-mesénquima (TEM) (*Markwald et al., 1977*); 2) la migración de células de la CNC desde el área circunfaríngea a través de las paredes de los arcos y saco aórticos del tracto de salida cardiaco distal (*Waldo et al., 1998, 1999a, 1999b*). La TEM da lugar a poblaciones celulares mesenquimáticas distribuidas homogéneamente en los cojines endocárdicos. Por su parte, las células ectomesenquimáticas procedentes de la CNC se concentran preferentemente en dos condensaciones que se extienden hacia la zona proximal de las dos crestas conotruncales (**Figura 3, 4B**) (*Waldo et al., 1999a, 1999b; Anderson et al., 2003, 2012*).

Tras la formación y celularización de los cojines endocárdicos tiene lugar la división del tracto de salida, hasta ahora único, en dos tractos de salida independientes mediante un proceso denominado septación conotruncal. Las células de la CNC localizadas en la pared del saco aórtico forman de un septo de naturaleza mesenquimática, que crece en sentido proximal y contacta con la región distal de las crestas conotruncales. El septo mesenquimático y las condensaciones conotruncales correspondientes a la CNC constituyen una

única estructura con forma de "U" invertida denominada complejo de septación aórtico-pulmonar (**Figura 3B, 4B**), que progresa proximalmente para dividir el conotruncus en dos tractos de salida independientes (izquierdo y derecho) (*Waldo et al., 1998; Anderson et al., 2012; Spicer et al., 2014*). Aunque aún se desconocen los mecanismos celulares implicados en la septación conotruncal, el proceso requiere el contacto y la fusión de las crestas conotruncuales mediante un mecanismo que no había sido explorado hasta el momento (**Figura 4C**). La elucidación de este mecanismo ha sido el principal objetivo de la Publicación 1 del compendio de esta tesis. Los resultados de este artículo evidencian que la fusión tiene lugar por la desaparición de las células endocárdicas que recubren la porción central de las crestas conotruncuales enfrentadas tras su contacto, y que dicha desaparición ocurre como consecuencia de un proceso de TEM, probablemente inducido por las células de la CNC del complejo de septación aórtico-pulmonar. Tras la fusión, las células de la CNC se agregan en el centro de las crestas conotruncuales fusionadas formando una condensación celular llamada septo conotruncal (**Figura 4C,D**). En estadios posteriores, algunas células de la CNC del septo conotruncal mueren por apoptosis, mientras que otras pasan a formar parte de las paredes de las raíces aórtica y pulmonar (*Kirby et al., 1983; Poelmann et al., 1998*).

La septación conotruncal resulta en la formación de dos tractos de salida separados, conteniendo cada uno tres cojines mesenquimáticos denominados cojines valvulares. Estos constituyen los primordios de las válvulas aórtica y pulmonar (**Figura 4D**). Los márgenes no fusionados de las crestas conotruncuales son los primordios valvulares izquierdos y derechos de las válvulas aórtica y pulmonar, mientras que los cojines intercalares dan lugar

a la valva y senos posteriores o no coronarios de la válvula aórtica, y a la valva y seno anteriores de la válvula pulmonar (**Figura 4B-D**) (Fernández et al., 2009; Anderson et al., 2003). Los cojines valvulares son masas de células mesenquimáticas con forma de pirámide invertida, que adquieren la morfología semilunar adulta mediante un proceso de remodelado conocido como excavación (**Figura 5**) (Hurlé et al., 1980; Sans-Coma et al., 1996; Aikawa et al., 2006; Hinton & Yutzey, 2011). La excavación consiste en el adelgazamiento y elongación de los cojines valvulares, un proceso poco conocido que incluye proliferación y muerte celular (Hurlé et al., 1980; Hurlé & Colvee, 1983; Jain et al., 2011; Wang et al., 2017). Durante la excavación, las células intersticiales valvulares se diferencian a partir de una población homogénea de células mesenquimáticas originadas a partir de dos linajes celulares diferentes, el SHF y la CNC. El último regula la diferenciación de las células mesenquimáticas, la apoptosis y la producción de matriz extracelular, necesarias para el remodelado de las valvas que continúa en etapas post-natales (Aikawa et al., 2006; Hinton & Yutzey, 2011; Jain et al., 2011; Schussler et al., 2020).



**Figura 5.** Esquema del remodelado (excavación) de los cojines valvulares. Vista sagital. Cada cojín valvular está compuesto por un núcleo de mesénquima cubierto por un endotelio endocardio. Durante el proceso de excavación, el cojín valvular, inicialmente con forma de pirámide invertida, adquiere la forma semilunar definitiva.

## **La enfermedad de la válvula aórtica bicúspide**

En el hombre se han descrito diversas anomalías congénitas que afectan a las válvulas semilunares. De entre ellas, la válvula aórtica bicúspide (VAB) es la más frecuente. De hecho, se trata de la malformación cardiaca congénita humana más común, con una incidencia del 0,5-2% en la población general, siendo más prevalente en hombres que en mujeres en una proporción 3:1 (*Fedak et al., 2002*). La anomalía consiste en una alteración (reducción) del número de componentes que constituyen una válvula aórtica normal o tricúspide (VAT) (*Roberts, 1970, 1987a; Fedak et al., 2002; Basso et al., 2004; Braverman et al., 2005; Siu & Silverides, 2010; Michelena et al., 2021*).

La VAB puede ser sindrómica en el caso de que aparezca en asociación con otras malformaciones cardiovasculares como ocurre en los síndromes de Turner, DiGeorge o Marfan; o no sindrómica cuando se manifiesta de manera aislada (*Siu & Silverides, 2010; Niaz et al., 2018*). La VAB no sindrómica o aislada es con mucho la modalidad más frecuente y constituye un carácter hereditario poligénico cuya transmisión sigue un patrón de herencia autosómica complejo, con expresividad variable y penetrancia incompleta (*Huntington et al., 1997; Cripe et al., 2004; Ellison et al., 2007; Loscalzo et al., 2007; McBride & Garg, 2011; Robledo et al., 2013*). La naturaleza poligénica y compleja de este carácter ha dificultado la búsqueda de genes causales. Gracias al desarrollo de modelos animales modificados genéticamente, se ha propuesto la implicación de diversos genes como posibles causantes de la VAB. Sin embargo, mutaciones o variantes de solo unos pocos de estos genes (*NOTCH1, GATA4, GATA5, GATA6*) han podido ser

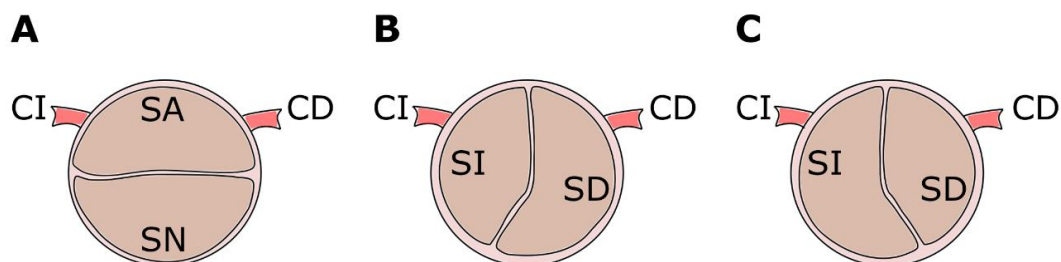
asociadas a la presencia de VAB en pacientes (*Garg et al., 2005; Shi et al., 2014; Li et al., 2018; Xu et al., 2018*).

La VAB puede ser asintomática a lo largo de la vida de los pacientes afectos. Sin embargo, esta condición predispone a patologías de la válvula (valvulopatías) como la estenosis por calcificación distrófica, y de la aorta (aortopatías) como la coartación y la dilatación aórtica, que hacen que el paciente requiera finalmente de una intervención quirúrgica, ya que actualmente no existen tratamientos alternativos eficaces (*Braverman et al., 2005; Losenno et al., 2012; Michelena et al., 2015*). Además, los pacientes con VAB muestran mayor predisposición a presentar anomalías en el origen de las arterias coronarias comparados con individuos con una válvula normal. Aunque lo habitual es que existan dos arterias coronarias, izquierda y derecha, que se originan en los senos aórticos izquierdo y derecho, existen anomalías que afectan tanto a su número como a su recorrido y tienen gran relevancia clínica debido a que pueden causar muerte súbita cardíaca (*Basso et al., 2000; Michalowska et al., 2016; Naito et al., 2018*).

### **Anatomía de la VAB**

Como se mencionó anteriormente, la VAB muestra una reducción en el número de elementos anatómicos que conforman una válvula aórtica normal. Mientras que una VAT presenta tres senos, tres valvas, tres comisuras y tres triángulos intervalvares (**Figura 2A,B**), en la VAB todos estos componentes quedan reducidos a dos, como resultado de diversos posibles defectos morfogénéticos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario (**Figura 6**) (*Roberts, 1970, 1987a; Fedak et al., 2002; Basso et al., 2004; Braverman*

*et al., 2005; Siu & Silverides, 2010; Michelena et al., 2021*). La variabilidad fenotípica de este carácter es tan amplia que a lo largo de los años se han establecido múltiples sistemas de clasificación y nomenclatura (*Michelena et al., 2021*), que tienen una enorme importancia en el ámbito clínico y quirúrgico.



**Figura 6.** Esquemas de vistas craneales de los tres tipos de válvula aórtica bicúspide. **A.** VAB antero-posterior, tipo A o R-L. **B.** VAB latero-lateral tipo B o R-NC. **C.** VAB latero-lateral tipo C o L-NC. SA: seno anterior, CI: coronaria izquierda, SI: seno izquierdo, SN: seno posterior o no coronario, RC: coronaria derecha, SD: seno derecho.

Clásicamente, se ha considerado la existencia de dos fenotipos principales de VAB: (1) la VAB antero-posterior, constituida por un seno y una valva anteriores y un seno y una valva posteriores (**Figura 6A**); y (2) la VAB latero-lateral, que presenta dos senos y dos valvas en posición izquierda y derecha (*Roberts, 1970, 1987a; Michelena et al. 2021*). Mientras que en la VAB antero-posterior, también denominada tipo A o R-L (del inglés, *right-left*), el seno y valva anteriores resultan de la fusión anatómica de los senos y valvas izquierdos y derechos, en la VAB latero-lateral los elementos anatómicos que aparecen unidos o fusionados son el seno y valva derechos y no coronarios (NC) (tipo B o R-NC, del inglés *right-non coronary*) (**Figura 6B**), o los senos y valvas izquierdos y no coronarios (tipo C o L-NC, del inglés *left-non coronary*) (**Figura 6C**). De entre estos fenotipos, la VAB tipo A es el más frecuente (70-80%), seguido de la VAB tipo B (20-30%) y la VAB tipo C, el

fenotipo menos común (3-6%) (*Basso et al., 2004; Russo et al., 2008; Michelena et al., 2021*). Es bastante habitual encontrar en los pacientes con VAB (alrededor del 70%) una estructura en forma de cresta fibrosa, denominada rafe, entre los senos y valvas anatómicamente fusionados. En muchos casos esta estructura se describe como una cicatriz, que representa la comisura defectuosa resultante de la fusión de las valvas. Sin embargo, no existen evidencias experimentales de que los rafes sean la reminiscencia de comisuras malformadas y, como se discutirá más adelante, no todas las VAB se forman como consecuencia de fusión de valvas o primordios valvulares, ya que también pueden originarse como consecuencia de un proceso de excavación defectuoso o de la ausencia de un primordio valvular (Publicación 2 de la presente tesis).

Considerando la ausencia, presencia y tamaño del rafe, así como la variación en la simetría y tamaño de los senos, resulta evidente la gran variabilidad fenotípica que la VAB puede manifestar en los pacientes, por lo que la nominación de estos fenotipos es motivo de controversia desde el punto de vista médico (*Michelena et al., 2020*). Es por ello por lo que recientemente se ha propuesto un nuevo sistema de nomenclatura, cuya finalidad es la homogenización de la terminología en el ámbito clínico (*Michelena et al., 2021, 2022*). Se ha establecido la existencia de tres tipos de VAB, cada una con fenotipos específicos: (1) VAB fusionada: puede ser de tipo A, B o C y se caracteriza por mostrar dos valvas que suelen ser de diferente tamaño y tres senos aórticos bien reconocibles, frecuentemente con un rafe; (2) VAB de dos senos: de tipo latero-lateral o antero-posterior, solo aparece en el 5-7% de los pacientes y presenta dos valvas y dos senos aórticos sin rafe; y (3) VAB parcialmente fusionada o *forme fruste*: un tipo

de VAB que no había sido reconocido como tal hasta la fecha, que muestra tres senos aórticos, una pequeña fusión de dos de las valvas y un rafe de pequeño tamaño (*Michelena et al., 2021, 2022*). Tanto la VAB parcialmente fusionada (rafe de pequeño tamaño) como la VAB fusionada (rafe de mayor tamaño) se consideran hoy día fenotipos intermedios entre la morfología normal (VAT) y la VAB de dos senos (sin rafe). Estos fenotipos constituyen un continuo anatómico que refleja la severidad del fenotipo VAB, cuyo origen embriológico se comentará más adelante (*Michelena et al., 2021*).

### ***Etiología de la VAB***

Durante la segunda mitad del siglo pasado, se propusieron dos posibles factores etiológicos que explicaban el origen de la VAB: 1) alteraciones hemodinámicas; 2) defectos en la CNC (*Shaner, 1963; Moore et al., 1980; Van Mierop & Kutsche, 1986; Kappetein et al., 1991; Miyabara et al., 1994; Hogers et al., 1997*). Con respecto al primero, se propuso que la VAB es una manifestación secundaria de un defecto vascular obstruyente que altera el flujo sanguíneo, afectando a la valvulogénesis tardía (*Shaner, 1963; Moore et al., 1980*). Sin embargo, esta hipótesis no es capaz de explicar el desarrollo de VAB aislada no sindrómica. El segundo factor etiológico consiste en anomalías en el comportamiento de las células de la CNC. El descubrimiento de la implicación de la CNC en el desarrollo cardiovascular normal y anómalo supuso un gran avance en la comprensión de la etiología de muchas enfermedades cardiovasculares congénitas. Diversos estudios demostraron que el comportamiento anómalo de estas células da lugar a síndromes que incluyen VAB, tales como el síndrome de Turner, de DiGeorge o el de Shone

(*Niaz et al., 2018*), aunque no se obtuvieron evidencias experimentales directas hasta años más tarde.

La primera evidencia experimental sobre la formación de VAB fue obtenida por *Shaner en 1963*, a partir de cuatro embriones de cerdo. Este estudio sugería que la VAB se puede formar por la fusión de primordios valvulares durante estadios prenatales. No fue hasta finales del siglo XX cuando se pudo profundizar en los mecanismos morfogenéticos de formación de la VAB, gracias al desarrollo de un modelo animal espontáneo de VAB tipo A por parte del grupo de investigación al que pertenece la autora. Este modelo consiste en una cepa consanguínea de hámster sirio en la que se detectó la aparición espontánea de una elevada incidencia de VAB tipo A. Los primeros estudios embriológicos con este modelo permitieron determinar que diversas variantes anatómicas de VAB tipo A (VAB con rafe y fenotipos intermedios entre VAT y VAB) se forman como resultado de la fusión de los primordios o cojines valvulares en estadios valvulogenéticos tempranos (*Sans-Coma et al., 1996*). Estos estudios permitieron confirmar el carácter congénito de la VAB, descartar mecanismos de desarrollo previamente teorizados, proponer la existencia de un continuo anatómico que refleja la severidad del defecto morfogenético y validar la posible implicación de la CNC en el desarrollo de la VAB. Años más tarde se describió el segundo modelo animal de VAB congénita, los ratones deficientes en óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS *knockout*; eNOS-KO). Los ratones eNOS-KO presentaban VAB de tipo latero-lateral (B o C) e incluían, además, alteraciones de la presión sanguínea merced a la función vasodilatadora alterada por la falta de producción de óxido nítrico (*Lee et al., 2000*). El estudio comparado de la embriología de la VAB entre el modelo hámster y el de ratón demostró que el desarrollo de la

VAB antero-posterior difiere del de la VAB latero-lateral. Además, se comprobó de manera experimental la implicación directa de la CNC en la formación de la VAB tipo A (*Fernández et al., 2009*). En el modelo hámster, la VAB tipo A se forma como consecuencia de la excesiva fusión de las crestas conotruncales durante la septación del tracto de salida cardiaco, dando lugar a cojines valvulares izquierdo y derecho más o menos fusionados. En ratones eNOS-KO, la VAB tipo B es el resultado de la formación defectuosa de los cojines endocárdicos, con una cresta conotruncal derecha unida o fusionada, desde su origen, al cojín intercalar dorsal (posterior en humanos), dando lugar a un gran cojín valvular derecho y otro izquierdo de tamaño normal (*Fernández et al., 2009*). Estos resultados supusieron un hito en el estudio de la enfermedad de la VAB, puesto que demostraron que los tipos de VAB no constituyen meras variantes anatómicas de un mismo defecto congénito, como se postulaba hasta el momento, sino que cada tipo anatómico de VAB resulta de una etiología diferente. En consecuencia, cabía suponer que cada tipo de VAB presenta una genética, historia natural y patologías asociadas diferentes. De hecho, a partir del inicio de la pasada década se multiplicaron los estudios de índole clínico y quirúrgico en los que se tenía en cuenta el tipo de VAB para dilucidar la etiopatología y progresión de las patologías asociadas a la VAB (revisados en *Michelena et al., 2021*), llegando a establecerse que el tipo de VAB es un factor importante en la enfermedad a nivel clínico.

También durante esta pasada década, se multiplicaron los estudios sobre la embriología de la VAB, al incorporarse la morfología valvular en la evaluación fenotípica de ratones sujetos a diversas estrategias de manipulación genética. Estos trabajos han resultado en todo un conjunto de

nuevos datos sobre la etiología y desarrollo embrionario de la VAB, que hasta el momento no habían sido compilados y analizados conjuntamente. Este análisis ha sido reflejado en la Publicación 2 de la presente tesis, en la que se recopilan los mecanismos celulares y moleculares que parecen estar implicados en la formación de la VAB.

Como resultado, se han establecido tres procesos clave para el desarrollo de la VAB, así como distintas alteraciones en los mecanismos celulares y moleculares implicados en cada proceso. El primero de ellos consiste en la formación anómala de los cojines endocárdicos debido a un defecto en el proceso de TEM o a una migración celular defectuosa de la CNC, que resulta en la coalescencia de dos cojines endocárdicos, previo a la septación normal del tracto de salida. Este mecanismo conduce al desarrollo de dos cojines valvulares en lugar de tres, cuyo remodelado da lugar a VAB tipo B o C. El segundo proceso clave es la fusión excesiva de las crestas conotruncales, mediada por una alteración en el proceso de TEM (resultados de la Publicación 1), que tiene lugar durante el proceso de septación del tracto de salida, debido a alteraciones en el comportamiento de las células de la CNC que colonizan las crestas conotruncales. Este mecanismo resulta en la coalescencia de los cojines valvulares aórticos izquierdo y derecho y, por tanto, a VAB tipo A. Por último, el tercer proceso se basa en la alteración del proceso de excavación de los cojines valvulares como consecuencia de una distribución anómala de las células de la CNC, una proliferación alterada de las células mesenquimáticas que componen los cojines y/o un defecto en la producción de matriz extracelular, generando VAB de distintos tipos con diferentes grados de severidad. Además, el análisis en profundidad de estos estudios ha permitido establecer relaciones consistentes entre los

mecanismos descritos y diversas vías de señalización. Las evidencias experimentales apoyan un papel central de la vía de señalización de NOTCH, ya que su alteración puede afectar tanto al proceso de TEM que forma los cojines endocárdicos, como a la migración de la CNC. La CNC es responsable de la septación del tracto de salida al inducir el proceso de TEM en el endocardio que cubre las crestas enfrentadas (resultados de la Publicación 1). Por ello, las anomalías en el comportamiento de estas células pueden alterar el proceso de TEM y la fusión de las crestas. Por consiguiente, se puede interpretar que los tres procesos clave en la formación de la VAB son regulados por la CNC en tres etapas consecutivas del desarrollo. Así, un defecto genético específico puede alterar el comportamiento de la CNC en tres posibles momentos del desarrollo, determinando el proceso embrionario afectado y el tipo anatómico de VAB resultante.

Entre los estudios con pacientes que se sucedieron durante la pasada década, se evidenció que cada tipo de VAB predispone de manera diferente al desarrollo de valvulopatías y aortopatías asociadas, apoyando la hipótesis de que cada tipo anatómico de VAB presenta una etiología específica, la cual afecta al desarrollo y progresión de valvulopatías y aortopatías asociadas (*Verma & Siu, 2014; Michelena et al., 2021*). Otros estudios con pacientes, dirigidos a dilucidar la heredabilidad de la VAB, pusieron de manifiesto la discordancia en cuanto a la morfología de VAB tanto entre parientes de primer grado (*Calloway et al., 2011; Robledo-Carmona et al., 2013*), como entre fetos con síndrome de Turner, causado en todos los casos por la monosomía completa del cromosoma X (45,X) (*van Engelen et al., 2014*). Esta discordancia fenotípica también ha sido descrita en modelos animales de VAB, la mayoría de los cuales representan poblaciones genéticamente uniformes.

Se ha descrito el desarrollo de VAB en un total de 29 cepas de dos especies de roedores: dos cepas endogámicas de hámster sirio con VAB tipo A (*Fernández et al. 2000, 2009; Sans-Coma et al. 1996; 2012*), 27 cepas endogámicas de ratones mutantes con VAB tipo B (*Biben et al., 2000; Lee et al., 2000; Macatee et al., 2003; Stankunas et al., 2008; Fernández et al., 2009; Laforest et al., 2011; Makki & Capecchi, 2012; Thomas et al., 2012; Bosse et al., 2013; Dupuis et al., 2013; Phillips et al., 2013; Akerberg et al., 2015; Mommersteeg et al., 2015; Quintero-Rivera et al., 2015; MacGrogan et al., 2016; Toomer et al., 2017; Blaser et al., 2018; Odelin et al., 2018*), dos cepas endogámicas de ratones mutantes con VAB tipo A (*Wang et al., 2017; Gharibe et al., 2018*) y otras dos con VAB tipo A y B (*MacGrogan et al., 2016*). Aunque estos modelos, espontáneos y mutantes, describen una alta incidencia de VAB asociada a defectos genéticos y mecanismos de desarrollo concretos, no se había realizado un análisis global que compendiará toda esta información, pasando desapercibidas cuestiones relevantes tales como por qué cada modelo presenta un morfotipo de VAB y una penetrancia del carácter específicos. Además, quedaba por determinar la bondad de estos modelos, es decir, la capacidad de extrapolar los resultados obtenidos a la especie humana.

La Publicación 3, que forma parte del compendio de esta tesis, pone de manifiesto diferencias interespecíficas e intraespecíficas entre los humanos y los modelos animales en cuanto a la expresión fenotípica de las malformaciones de la válvula aórtica. Por su parte, el hámster sirio muestra un amplio espectro de anomalías que incluyen VAT y VAB tipo A con distintos grados de fusión de valvas similares a las descritas en humanos (continuo fenotípico). En cambio, el ratón de laboratorio presenta un espectro reducido

de defectos valvulares entre los que predomina la VAB tipo B sin rafe. Estos resultados alertan de la necesidad de considerar estas diferencias a la hora de utilizar modelos animales para el estudio de la VAB. Además de las diferencias interespecíficas, se detectaron diferencias intraespecíficas (diferencias entre poblaciones de la especie modelo) tanto en cepas de ratón como de hámster, apuntando a la existencia de modificadores genéticos que condicionan el desarrollo de VAB. Este compendio de resultados permite la reinterpretación de los estudios llevados a cabo con respecto a la etiología de la VAB para concluir que, de entre las mutaciones asociadas a VAB, algunas podrían conducir al desarrollo de VAB tipo A o B dependiendo de modificadores genéticos, factores ambientales o factores epigenéticos, mientras que otras pueden ser específicas de tipo. Este trabajo, junto con los resultados de la Publicación 2, apoyan la hipótesis de que mutaciones en un único gen que se manifiestan en alguno de los procesos del desarrollo clave para la formación de la VAB (formación de los cojines endocárdicos, septación del tracto de salida y excavación de los cojines valvulares) o en alguno de los linajes celulares embrionarios implicados en estos procesos (CNC y SHF, con más énfasis en el papel de la CNC en base a los resultados de la Publicación 1) podrían dar lugar a VAB tipo A o B, dependiendo de factores genéticos (alelos modificadores), ambientales y/o epigenéticos adicionales.

### **La aortopatía bicúspide**

Aproximadamente entre el 20-84% de los pacientes con VAB desarrollan dilatación de la aorta proximal, una condición conocida como aortopatía bicúspide y que conlleva riesgo de disección y rotura aórtica (*Fedak et al., 2002; Della Corte et al., 2007; Tadros et al., 2009; Siu et al., 2010; Michelena*

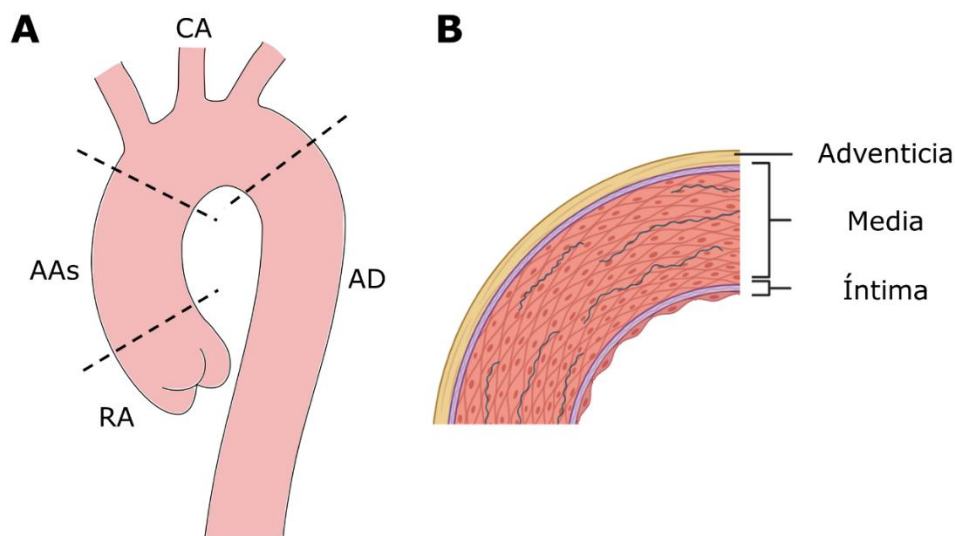
*et al., 2021*). La elevada prevalencia de dilatación aórtica en estos pacientes la convierte en la aortopatía más comúnmente asociada a la VAB (*Fernandes et al., 2012*). Aunque la dilatación puede afectar a cualquier región de la aorta, la aorta ascendente es la que se ve afectada con mayor frecuencia, y su prevalencia se ve incrementada con la edad (*Della Corte et al., 2007; Tadros et al., 2009; Verma & Siu, 2014*).

La dilatación aórtica también se detecta en pacientes con una válvula aórtica normal, pero los pacientes con VAB muestran síntomas más severos a más temprana edad (*Della Corte et al., 2007*). Además, la tasa de crecimiento anual de la aorta ascendente es considerablemente mayor en las pacientes con VAB que con VAT (rango de 0.2 a 1.9 mm por año) (*Tadros et al., 2009; Fernandes et al., 2012*). El único tratamiento efectivo que existe actualmente es el reemplazamiento quirúrgico (*Michelena et al., 2021*).

### **Anatomía e histología de la aorta**

La aorta torácica se divide en cuatro segmentos anatómicos: la raíz aórtica, la aorta ascendente o tubular, el arco o cayado aórtico y la aorta descendente (**Figura 7A**). La raíz aórtica se extiende desde los senos de la válvula aórtica hasta la unión sinotubular. La aorta ascendente es la región comprendida entre la unión sinotubular y el tronco braquiocefálico, la primera arteria que ramifica del arco aórtico. En esta región es posible distinguir una región cóncava y otra convexa debido a la forma curva de su eje. El arco o cayado aórtico comprende la región ramificada de la aorta torácica, cuyas ramas incluyen el tronco braquiocefálico, ramificado a su vez en la arteria subclavia derecha y la arteria carótida común derecha; la arteria carótida común

izquierda y la arteria subclavia izquierda. Cabe destacar, que el patrón de ramificación descrito difiere entre las distintas especies de mamíferos. Por último, la aorta descendente comienza tras la arteria subclavia izquierda y continúa a lo largo de la cavidad torácica hasta el diafragma (*Hutchinson, 2009; Hiratzka et al., 2010; Halushka et al., 2016*).



**Figura 7. A.** Esquema de los diferentes segmentos anatómicos de la arteria aorta. **B.** Esquema de una sección histológica transversal de la aorta. Se muestran las capas que la componen, desde la más interna a la más externa: íntima, media y adventicia. AAs: aorta ascendente, AD: aorta descendente, CA: cayado o arco aórtico, RA: raíz aórtica.

A nivel histológico, la pared aórtica está compuesta por tres capas concéntricas (**Figura 7B**). La más interna, denominada íntima, es una monocapa de células endoteliales, una lámina basal con colágeno tipo IV y laminina, y un tipo de tejido conectivo especial denominado subíntima, compuesto por colágeno tipo I y II, fibras elásticas y gran cantidad de proteoglicanos. La media es la principal capa de la arteria y tiene una posición intermedia. Está compuesta por láminas fenestradas de elastina dispuestas de forma concéntrica, entre las que se disponen células musculares lisas, fibras de colágeno y proteoglicanos. Cada lámina elástica y células

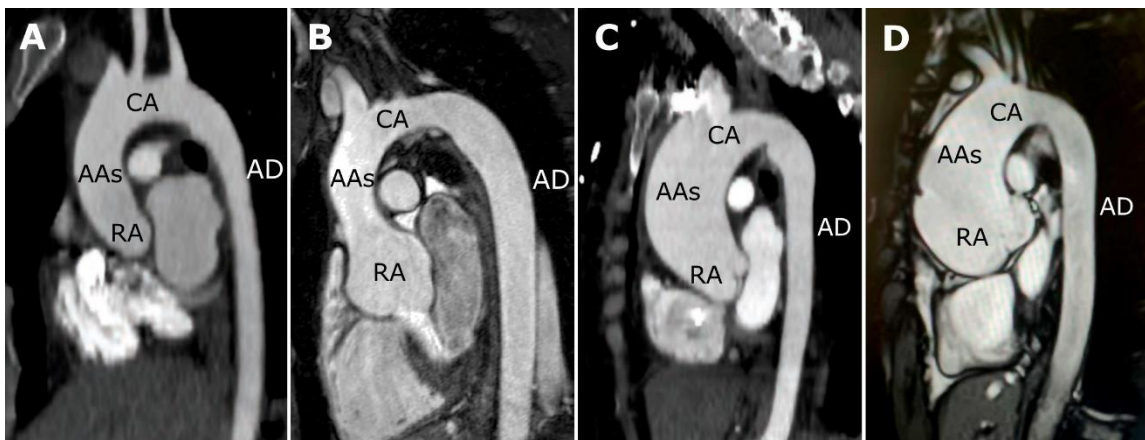
musculares adyacentes forman una unidad funcional denominada lamela o unidad lamelar. Por último, la capa más externa o adventicia está formada principalmente por tejido conectivo con una gran cantidad de fibras de colágeno tipo I entremezcladas con elastina y fibroblastos (*Hutchinson et al., 2009; Amalinei & Caruntu, 2013; Halushka et al., 2016*).

### ***Fisiopatología de la dilatación aórtica***

La dilatación aórtica hace referencia a una alteración del tamaño de la aorta, que se considera patológico cuando es superior al valor medio del diámetro correspondiente al 95% de la población para una persona normal de un grupo de edad, sexo y tamaño corporal específicos (*Saliba et al., 2015*). Aunque la severidad de la patología se determina actualmente por el diámetro de la aorta, no existen valores de referencia que permitan establecer una definición concreta. Esto se debe a que se considera que un paciente sufre dilatación aórtica cuando, además de mostrar un diámetro aparentemente elevado, cumple con determinados criterios clínicos como, por ejemplo, el morfotipo valvular, la edad o la presencia de algún síndrome (Marfan), lo que hace que el valor de referencia varíe (*Falk et al., 2017*). A diferencia de la dilatación, la definición de aneurisma aórtico está mejor establecida. Se trata de un ensanchamiento localizado, patológico y permanente que supone un incremento de más del 50% del diámetro normal de la aorta (*Saliba et al., 2015*).

Aunque se han descrito dilataciones y aneurismas en todas las regiones anatómicas de la aorta, las principalmente afectadas por la aortopatía bicúspide son la raíz aórtica y la aorta ascendente (**Figura 8**) (*Yassine et al.,*

2017; Messner & Bernhard, 2019). La dilatación de la raíz aórtica afecta al 16,4% de los pacientes con aortopatía bicúspide (**Figura 8B**), mientras que el 83,6% restante presenta dilatación de la aorta ascendente (**Figura 8C**), por lo que constituye la afección más frecuente en esta población. El 5,7% de todos los pacientes con VAB presentan dilatación global, es decir, tanto de la raíz aórtica como de la aorta ascendente (**Figura 8D**) (Della Corte et al., 2007).



**Figura 8.** Imágenes de tomografía computarizada de la aorta de pacientes. **A.** Aorta ascendente y raíz aórtica de dimensiones normales. **B.** Dilatación de la raíz aórtica con aorta ascendente de tamaño normal. **C.** Dilatación de la aorta ascendente con raíz aórtica de tamaño normal. **D.** Dilatación global (raíz aórtica y aorta ascendente dilatadas). AAs: aorta ascendente, AD; aorta descendente, CA: cayado o arco aórtico, RA: raíz aórtica. Modificado de Rajjah, 2013; Treasure et al., 2015; Monda et al., 2022.

Además, parece ser que cada tipo anatómico de VAB se asocia preferentemente con una región específica de la aorta afectada por la dilatación. Los pacientes con VAB tipo A pueden desarrollar dilatación tanto de la raíz aórtica como de la aorta ascendente, particularmente a lo largo de la región convexa. Los pacientes con VAB tipo B muestran principalmente dilatación de la aorta ascendente, que se extiende frecuentemente hacia el cayado aórtico (Verma & Siu, 2014). La dilatación aórtica no es exclusiva de

pacientes portadores de VAB. Los individuos con válvula normal (VAT) también pueden desarrollar dilatación y aneurismas aórticos. Sin embargo, la dilatación en los pacientes con VAB se manifiesta de manera más severa y con un incremento del diámetro a edades más tempranas que los pacientes con VAT (>60 años) (*Della Corte et al., 2007*).

La aorta ascendente de los pacientes con VAB suele presentar alteraciones a nivel histomorfológico, que se han detectado incluso antes de que la arteria se dilate. Estas alteraciones consisten en desorganización y muerte de las células musculares lisas; desorganización y fragmentación de las fibras elásticas que constituyen las lamelas; y acumulación de sustancias mucoides en la matriz extracelular. En conjunto, estas alteraciones constituyen el sustrato histopatológico de la aortopatía bicúspide, conocido como necrosis cística de la media, y afectan en mayor medida a la región convexa de la aorta (*Carlson et al., 1970; Tadros et al., 2009; Halushka et al., 2016*). Además de estas modificaciones histomorfológicas, se han descrito alteraciones moleculares asociadas a la enfermedad, tales como defectos en la expresión de fibrilina 1 y 2 (FBN-1 y 2), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), metaloproteasas 2 y 9 (MMP-2 y 9) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (*Fedak et al., 2002; Neptune et al., 2003; Ruddy et al., 2009; Tadros et al., 2009; Mohamed et al., 2012; Henn et al., 2014; Jiao et al., 2016; Rueda-Martínez et al., 2017*).

Aunque hasta el momento se ha generado un gran volumen de conocimiento sobre la patobiología de la dilatación aórtica, aún no se tiene una imagen clara de los diferentes mecanismos celulares y moleculares implicados en la enfermedad.

***Etiología de la aortopatía bicúspide***

A pesar de que la VAB fue descrita por Leonardo da Vinci hace unos 500 años (*Mills et al., 1978*), el primer trabajo científico que evidenció la asociación entre VAB y aortopatía fue publicado en 1928. En este trabajo, el médico canadiense Maude Abbott señaló la existencia de pacientes con coartación aórtica, VAB y aneurismas y disecciones de la aorta torácica. Años más tarde, entre 1970 y 1990, se llevaron a cabo estudios de anatomía patológica que corroboraron la asociación entre la VAB y la disección aórtica (*Edwards et al., 1978; Larson et al., 1984; Roberts & Roberts, 1991*). La aparición y desarrollo en las últimas décadas de nuevas técnicas de imagen ha permitido confirmar que la disfunción valvular y la dilatación aórtica son las patologías más comunes asociadas a la VAB (*Michelena et al., 2011*).

La búsqueda de las causas de la disfunción valvular impulsó los primeros trabajos enfocados al estudio de la hemodinámica del tracto de salida cardiaco, los cuales demostraron de manera experimental la asociación de la VAB con patrones de flujo anormales, que incrementan asimétricamente el estrés en la pared de la aorta proximal (*Robicsek et al., 2004; Hope et al., 2008, 2010*). Resulta lógico, por tanto, que la primera hipótesis propuesta para explicar la etiología de la aortopatía bicúspide tuviera como base la alteración hemodinámica. Esta hipótesis postula que la morfología de la VAB causa alteraciones del flujo sanguíneo que ocasionan defectos en la hemodinámica aórtica, resultando en un deterioro de la estructura histológica de la pared aórtica (*Girdauskas et al., 2011, Michelena et al., 2021*).

Paralelamente al desarrollo de la hipótesis hemodinámica, se llevaron a cabo numerosos estudios tanto clínicos como básicos que se centraban en los

aspectos genéticos de la enfermedad. La primera evidencia que apuntaba a la influencia genética en la aortopatía bicúspide se obtuvo a partir del estudio de pacientes sometidos a cirugía para el reemplazo de la VAB. Algunos de estos pacientes, tras la intervención, desarrollaban dilatación de la aorta ascendente, a pesar de que la hemodinámica y la funcionalidad de la válvula se habían corregido con la intervención quirúrgica (*Andrus et al. 2003*). En 2005, Garg y colaboradores identificaron la primera mutación que parecía estar directamente relacionada con la VAB no sindrómica. Esta mutación se encontraba en el gen *NOTCH1*, un receptor transmembrana implicado en múltiples procesos celulares del desarrollo cardiaco y vascular. Trabajos posteriores de otros grupos de investigación relacionaron la existencia de mutaciones en *NOTCH1* en pacientes con VAB esporádica con la presencia de aneurisma torácico aórtico (*Mohamed et al., 2006; McKellar et al., 2007; Foffa et al., 2013*).

La generación de modelos animales transgénicos en las últimas décadas, revisados en las Publicaciones 2 y 3 de la presente tesis, ha supuesto un avance significativo en la identificación de posibles genes causales de VAB y/o aortopatía (28 en total). Sin embargo, solo tres de estos genes (*NOTCH1*, *GATA5* y *ROBO4*) han podido ser asociados a la enfermedad aórtica en una minoría de pacientes afectados (*McKellar et al., 2007; Padang et al., 2012; Gould et al., 2019*). Mutaciones en estos genes, todos con funciones relevantes en el desarrollo embrionario del tracto de salida cardiaco, parecían causar no solo VAB, sino también dilatación aórtica en el adulto (*Yassine et al., 2017; Messner & Bernhard, 2019; Bravo-Jaimes & Prakash, 2020*). El desarrollo embrionario de la válvula aórtica y de la aorta ascendente están íntimamente relacionados. En la formación de ambas estructuras participan

células del SHF y de la CNC. En los senos de Valsalva de la raíz aórtica, son predominantes las células del SHF frente a las de la CNC. En la aorta ascendente, las células del SHF se localizan preferentemente en la región de la media aórtica más cercana a la adventicia. Por el contrario, las células de la CNC ocupan la zona de la media aórtica colindante a la íntima (*Waldo et al., 2005; Harmon & Nakano, 2013; Plein et al., 2015*). Tanto en la raíz como en la aorta ascendente ambos linajes celulares se diferenciarán en células musculares lisas, las cuales son morfológica y ultraestructuralmente indistinguibles (*Cheung et al., 2012; Pfaltzgraff et al., 2014, Plein et al., 2015*). En cuanto a las valvas, la distribución de los dos linajes celulares es aún objeto de debate. Parece ser que las células de la CNC ocupan la superficie aórtica de la valva, mientras que las del SHF se distribuyen por la superficie ventricular (*Phillips et al., 2013*). En cualquier caso, ambos linajes celulares darán lugar a las células intersticiales que constituyen las valvas (*Jiao et al., 2016*). Se ha demostrado que, en pacientes con VAB y aneurisma de la aorta ascendente, las células musculares lisas provenientes de células de la CNC muestran un menor grado de diferenciación, una contracción deficiente y una disminución en la vía de señalización de TGF- $\beta$  (*Jiao et al., 2016*). Por ello, se ha propuesto que anomalías en este linaje celular específico pueden dar lugar a la VAB, tal y como se propone en las Publicaciones 2 y 3 que conforman este compendio, y a un defecto estructural congénito en la aorta ascendente que predispone a una degeneración de la pared aórtica (*Phillips et al., 2013; Jiao et al., 2016; Yassine et al., 2017; Odelin et al., 2019*). Este concepto constituye, por tanto, la base de la hipótesis genética de la dilatación aórtica asociada a la VAB (*Hinton, 2012; Padang et al., 2013; Prakash et al., 2014; Jiao et al., 2016*).

Como consecuencia del distinto enfoque propuesto por de las hipótesis hemodinámica y genética, la etiología de la aortopatía bicúspide ha sido objeto de un intenso debate durante las últimas dos décadas. A pesar de que la comunidad científica acepta actualmente que ambas hipótesis explican de manera conjunta el desarrollo de la dilatación aórtica asociada a la VAB (*Girdauskas et al., 2011; Sophocleous et al., 2018; Michelena et al., 2020*), hasta el momento se han obtenido pocas evidencias empíricas que apoyaran la hipótesis genética, principalmente debido a que la población humana es genéticamente heterogénea y muestra diferentes presentaciones clínicas asociadas a distintas etiologías de la enfermedad (*Tadros et al., 2009; Hinton et al., 2012; Abdulkareem et al., 2013; Freeman & Otto, 2013; Michelena et al., 2014*). En la actualidad no existen modelos animales que repliquen adecuadamente la patogénesis de la aortopatía bicúspide humana (necrosis cística de la media). Por ello, la profundización en la comprensión de la etiopatogénesis de la enfermedad se ha visto mermada (*Messner & Bernhard, 2019*).

Como resultado de la investigación derivada de esta tesis (Publicación 4), se presenta el primer modelo animal de predisposición a aortopatía bicúspide (la cepa T de hámster sirio). Como se comentó en apartados anteriores, la cepa T constituye un modelo de VAB aislada, en el que no se han detectado las aortopatías o valvulopatías que comúnmente se asocian a la VAB humana. Sin embargo, hasta el momento no se había realizado un estudio histopatológico de la aorta ascendente en este modelo. Para la publicación 4 de esta tesis, se realizó un estudio histomorfológico comparado entre animales con VAT y VAB de la cepa T y animales con VAT de una cepa control. Este estudio puso de manifiesto que los animales de la cepa T, tanto con VAT

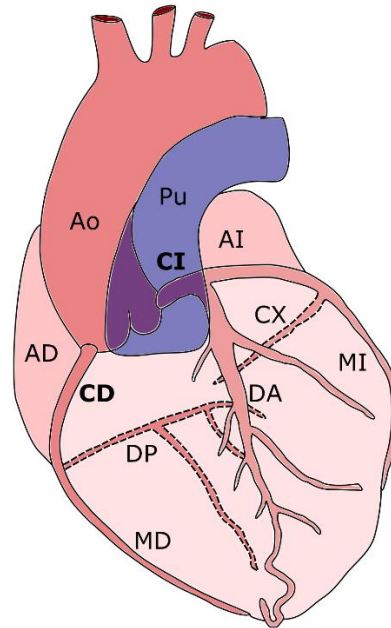
como con VAB, presentan alteraciones de la aorta ascendente similares a la necrosis cística de la media que caracteriza la aortopatía bicúspide humana. Además, se comprobó la expresión y localización de diversos genes y proteínas, cuya implicación en la aortopatía bicúspide humana había sido propuesta en estudios con pacientes. También en este caso, los resultados fueron acordes con la existencia de una anomalía estructural de la pared de la aorta ascendente, que acompaña a una válvula aórtica tanto normal como bicúspide, en una población genéticamente uniforme (cepa T; endogámica e isogénica). Estos datos constituyen una fuerte evidencia experimental directa en apoyo de la hipótesis genética en el contexto de la etiología de la aortopatía bicúspide. El estudio concluye que este modelo puede representar a un grupo de pacientes en el cual una migración anómala de la CNC durante el desarrollo del tracto de salida cardiaco da lugar a un defecto estructural en la media de la aorta ascendente, junto con una baja penetrancia de VAB. Dado que, en humanos, al igual que en el hámster, la penetrancia de la VAB es incompleta, estos resultados permiten hipotetizar que una población significativa de pacientes con válvula normal presenta un riesgo de aortopatía similar al de la población de pacientes con VAB con los que comparten la misma predisposición genética. Estos resultados son relevantes para la gestión clínica de la progresión de la aortopatía de los pacientes afectados, así como para el establecimiento de grupos experimentales de pacientes en investigaciones cuyo objetivo sea la búsqueda de biomarcadores y el descubrimiento de mecanismos patofisiológicos.

## **Las arterias coronarias y su relación con la VAB**

Los pacientes con VAB muestran una mayor predisposición a manifestar anomalías que afectan al origen de las arterias coronarias que los pacientes con VAT (*Naito et al., 2018*). Aunque la incidencia de estas anomalías en la población general es relativamente baja, algunas de ellas tienen un gran impacto clínico ya que predisponen a muerte súbita cardiaca (*Roberts, 1987b; Angelini et al., 1999; Basso et al., 2000*). Esta asociación entre VAB y anomalías coronarias ya había sido propuesta por el grupo de investigación al que pertenece la autora, en base a estudios con el modelo hámster (*Sans-Coma et al., 1991; Cardo et al., 1994, 1995; Fernández et al., 2000*). Estos estudios permitieron proponer una etiología común para anomalías congénitas valvulares y coronarias.

### **Anatomía de las arterias coronarias**

Las arterias coronarias son los vasos sanguíneos encargados de irrigar el músculo cardiaco. En humanos, existen dos arterias coronarias principales, designadas como arterias coronarias derecha e izquierda, cuyo recorrido es subepicárdico. Cada una de estas arterias se origina en un seno, derecho e izquierdo, de la válvula aórtica. El origen de cada arteria se identifica con un orificio, denominado ostium coronario, localizado en cada uno de los senos aórticos correspondientes (**Figura 9**) (*Anderson & Becker, 1981; Angelini, 1989b, 1999; Pérez-Pomares et al., 2016*).



**Figura 9.** Anatomía normal de las arterias coronarias. Las principales arterias coronarias, derecha (CD) e izquierda (CI), están conectadas a los senos de Valsalva correspondientes y discurren por los surcos auriculoventriculares, dando lugar a distintas ramas que irrigan las aurículas y los ventrículos. La CI se ramifica en las arterias circunfleja (CX), marginal izquierda (MI) y descendente anterior (DA). La CD se bifurca en las arterias marginal derecha (MD) y en la descendente posterior (DP). AD: aurícula derecha, AI: aurícula izquierda, Ao: aorta, Pu: pulmonar.

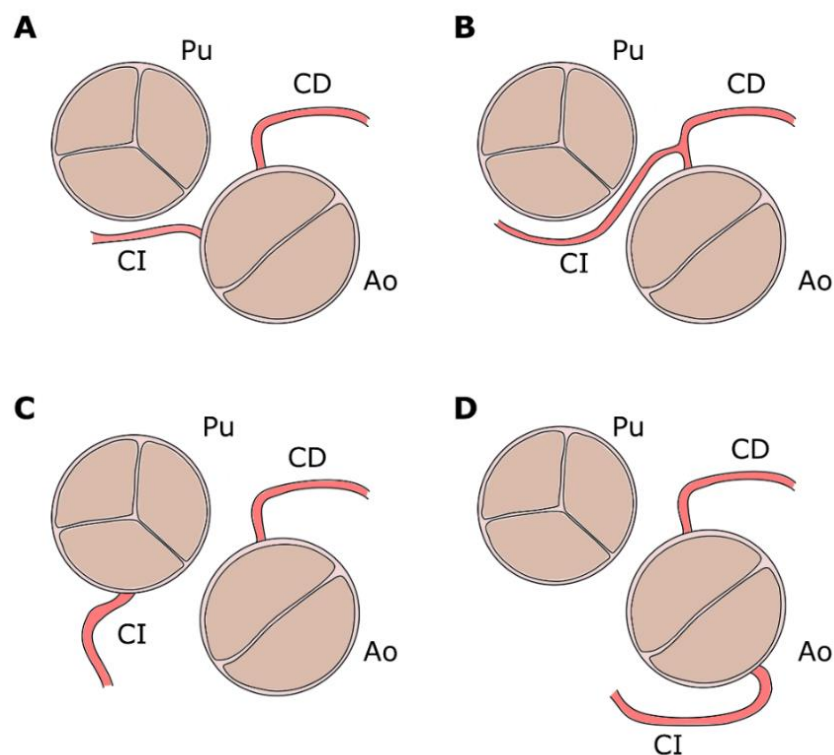
La arteria coronaria derecha recorre el surco atrioventricular derecho e irriga la mayor parte de la superficie diafragmática del corazón. En su porción proximal, esta arteria se ramifica en la arteria infundibular o conal (**Figura 9**) y, en más de la mitad de la población, también en la arteria nodal, que irriga específicamente el nodo sinoatrial (*Schlesinger et al., 1949*). Distalmente, la arteria coronaria derecha se ramifica en la arteria marginal derecha y en la arteria descendente posterior. Esta última emite ramificaciones perforantes que colaboran en la irrigación de la parte inferior del septo interventricular (**Figura 9**) (*Anderson & Becker, 1981; Angelini 1989b, 1999; Pérez-Pomares et al., 2016*).

La arteria coronaria izquierda irriga un mayor volumen de miocardio. Se ramifica en las arterias circunfleja izquierda, la descendente anterior y, ocasionalmente en la arteria intermedia o ramificación lateral de la arteria coronaria izquierda (**Figura 9**). La arteria descendente anterior recorre el surco interventricular y se ramifica en varias arterias perforantes septales que participan en la irrigación del septo interventricular (**Figura 9**) (*Anderson & Becker, 1981; Angelini, 1989b, 1999; Pérez-Pomares et al. 2016*).

### ***Alteraciones en el patrón coronario***

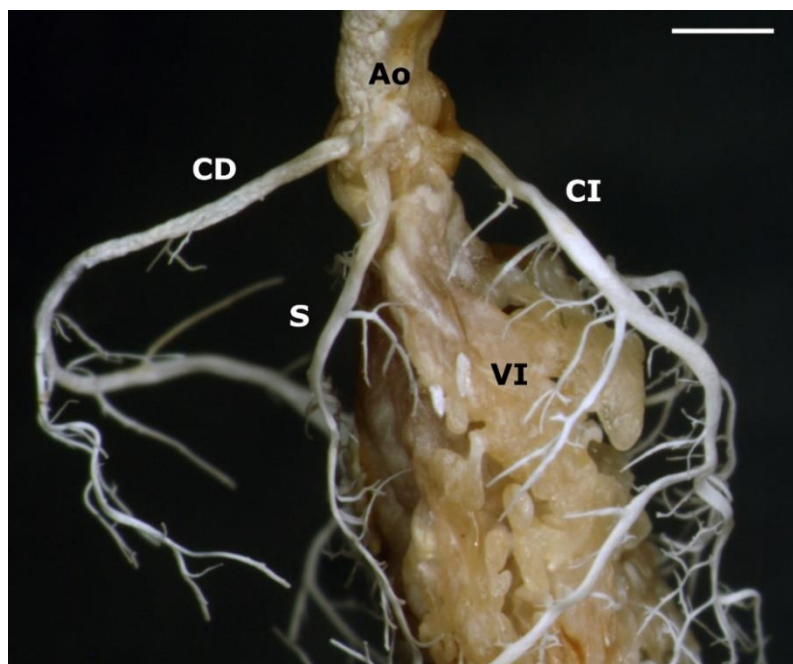
Aunque ya desde el siglo XX se habían detectado anomalías en el patrón coronario de pacientes con VAB (*Takahashi et al., 1994; Doty, 2001; Tejada et al., 2001; Michalowska et al., 2016*), no fue hasta el año 2018 cuando el grupo de investigación de Naito y colaboradores confirmó la asociación de VAB y la predisposición a mostrar anomalías en el origen de las arterias coronarias humanas. Estos investigadores demostraron que, mientras que los pacientes con una válvula aórtica normal (VAT) mostraban un riesgo del 3% de presentar anomalías congénitas en el origen y/o recorrido de las arterias coronarias, la incidencia en los pacientes con VAB era significativamente superior (7%). Sin embargo, la asociación entre VAB y anomalías coronarias había sido establecida con anterioridad en el modelo hámster por el grupo de investigación al que pertenece la autora. Varios trabajos realizados al final del pasado siglo pusieron de manifiesto que los animales de la cepa de hámster con elevada incidencia espontánea de VAB tipo A, ya descrita en capítulos anteriores, mostraban, además de VAB, una elevada proporción de anomalías coronarias (p. ej.: *Sans-Coma et al., 1991; Cardo et al., 1994,*

1995). Las principales anomalías detectadas fueron coronaria única, origen anómalo de la arteria coronaria izquierda del tronco pulmonar y origen anómalo de la arteria coronaria izquierda del seno aórtico no coronario (**Figura 10**). Estos patrones coronarios anómalos resultaron ser muy similares a los descritos en humanos (*Sans-Coma et al., 1993*), y coincidían con aquellos para los que se había demostrado asociación con la VAB humana. Años más tarde, el grupo demostró que la incidencia de anomalías en el patrón coronario incrementaba de manera continua de acuerdo con el grado de severidad del defecto valvular (*Fernández et al., 2000*).



**Figura 10.** Representación esquemática de los posibles orígenes de las arterias coronarias en hámsteres con válvula aórtica bicúspide. **A.** Origen normal. **B.** Coronaria única (SCAOA). **C.** Origen anómalo de la arteria coronaria izquierda del tronco pulmonar (ALCAPA). **D.** Origen anómalo de la arteria coronaria izquierda del seno aórtico no coronario (ALCADA). Ao: válvula aórtica, CD: coronaria derecha, CI: coronaria izquierda, Pu: válvula pulmonar.

Las arterias coronarias de los roedores en general, y del hámster sirio en particular, muestran algunas diferencias respecto a las humanas. Mientras que el recorrido de las arterias coronarias humanas es subepicárdico, en los roedores es intramiocárdico. Por su parte, en el hámster y otros roedores existe, además de las arterias coronarias derecha e izquierda, una tercera arteria coronaria denominada arteria septal, que se origina a partir de alguna de las arterias coronarias principales y que irriga la mayoría del septo interventricular (Durán *et al.*, 2007a, 2007b). La arteria septal también puede emerger de un ostium separado localizado en seno aórtico derecho o izquierdo, que se denomina ostium coronario accesorio. En el hámster sirio se ha detectado este origen independiente de la arteria septal en el 5% de los casos (**Figura 11**) (Durán *et al.*, 2007b).



**Figura 11.** Molde interno del ventrículo izquierdo (VI), la aorta (Ao) y las arterias coronarias en un ejemplar adulto de hámster sirio. La arteria septal (S) surge de un ostium independiente localizado en el seno aórtico derecho. CD: coronaria derecha, CI: coronaria izquierda. Barra de escala: 500µm.

En el ser humano también se han detectado ostia coronarios accesorios o supernumerarios que coexisten con los orificios coronarios correspondientes a las dos arterias coronarias principales izquierda y derecha. Estos ostia accesorios constituyen el origen de alguna de las arterias que normalmente parten de las arterias coronarias principales. Este es el caso de la arteria conal, que irriga el tracto de salida, la arteria nodal, que irriga el nodo sinoatrial, y las arterias circunfleja izquierda y descendente anterior izquierda, que irrigan principalmente el ventrículo izquierdo (*Becker, 1981; Angelini, 1989b., 1999; Pérez-Pomares et al., 2016*). En el hámster sirio, los ostia accesorios suelen corresponderse con la arteria septal o la arteria conal (*Durán et al., 2007b*). Mientras que las anomalías coronarias descritas anteriormente tienen una gran importancia clínica por su predisposición a muerte súbita cardíaca, la presencia de ostia coronarios accesorios no desencadena ninguna patología, por lo que se considera una variante anatómica del patrón coronario normal (*Pérez-Pomares et al., 2016*).

Dado que se han detectado ostia coronarios accesorios tanto en pacientes como en el modelo hámster, y que se ha verificado la asociación entre VAB y anomalías congénitas en el origen de las arterias coronarias en ambas especies, se llevó a cabo un estudio (Publicación 5) para profundizar en la hipótesis de que la VAB y las alteraciones en el patrón coronario del hámster sirio tienen un origen etiológico común. De acuerdo con los resultados de este trabajo, la incidencia de ostia accesorios es significativamente más baja en el lado izquierdo que en el lado derecho de la válvula cuando se analizaba toda la población en conjunto. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la incidencia de los ostia coronarios accesorios entre los morfotipos VAT y VAB. Estos datos indican que el desarrollo de estos ostia

preferentemente en el lado derecho de la válvula no está asociado a la etiología de las malformaciones valvulares, sino que es una característica propia de la cepa T o del hámster sirio como especie. Teniendo en cuenta que la valvulogénesis y la coronariogénesis son dos procesos embrionarios que ocurren de manera simultánea, los defectos morfogénéticos que dan lugar a la VAB tipo A podrían afectar también a la formación de las arterias coronarias. De hecho, la asociación altamente significativa entre anomalías coronarias y VAB en la cepa T de hámster permitió sugerir que existe una alteración específica en la parte izquierda de la válvula aórtica en desarrollo (una distribución anómala de las células de la CNC) que impide la correcta conexión y formación de la arteria coronaria (*Fernández et al., 2000; Durán et al. 2006*). Sin embargo, los resultados del presente estudio parecen indicar que el defecto de la CNC que da lugar a la VAB no condiciona el desarrollo de ostia supernumerarios, sugiriendo una etiología diferente para esta variante anatómica. Por último, cabe destacar que los ostia accesorios se correspondían en la mayoría de los casos con la arteria septal, una arteria bien desarrollada que siempre está presente, aunque haya anomalías en el patrón coronario. Puesto que la variación del patrón no afecta nunca a la arteria septal, los datos del presente estudio apoyan la noción de que, en el hámster, la arteria septal debería ser considerada una tercera arteria coronaria.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo II

## Objetivos



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Los objetivos principales de esta tesis doctoral se formulan a continuación, siguiendo el orden de las publicaciones que conforman esta tesis:

**Publicación 1.** Dilucidar el mecanismo celular implicado en la fusión normal de las crestas conotruncales para, posteriormente, indagar en el mecanismo de extra-fusión que da lugar a la VAB tipo A, utilizando embriones de hámster sirio de la cepa T (40% de VAB) y de una cepa control con incidencia nula.

**Publicación 2** Compilar toda la información relativa al desarrollo embrionario de la VAB con modelos animales (espontáneos y genéticamente modificados) en un documento de revisión. Esta publicación fue una invitación para un número especial de la revista *Progress in Cardiovascular Diseases* dedicado a una actualización del conocimiento generado hasta el momento sobre la VAB, debido la gran diversidad de mecanismos celulares y moleculares implicados en la embriología de la VAB que no habían sido revisados hasta el momento.

**Publicación 3.** Investigar la variabilidad morfológica y la incidencia de VAB en dos especies modelo, con el objetivo de determinar la similitud del carácter entre las tres especies a nivel anatómico. Para ello, se han caracterizado y comparado las diferentes morfologías que puede presentar la válvula aórtica, así como las incidencias de las anomalías valvulares en poblaciones representativas de hámster sirio y de ratón de laboratorio, a partir de datos propios y de información extraída de la literatura.

**Publicación 4.** Búsqueda de posibles alteraciones moleculares y estructurales en la aorta ascendente de animales del modelo hámster que pudiesen validar a la cepa T, con alta incidencia de VAB, como modelo animal de predisposición a aortopatía bicúspide. Para ello, se examinó la anatomía e histomorfología de la aorta ascendente en el modelo hámster, así como la expresión de varios genes (*Fbn1*, *Fbn2*, *Tgf $\beta$* , *Mmp2*, *Mmp9* y eNOS) implicados en la patogénesis de la dilatación aórtica humana, comparando animales genéticamente homogéneos con VAB y VAT de la cepa T, y animales con VAT de una cepa control *outbred* con incidencia nula de VAB.

**Publicación 5.** Profundizar en la hipótesis propuesta sobre el origen etiológico común de la VAB y las alteraciones en el patrón coronario, analizando si la presencia de VAB afecta al número de ostia coronarios que aparecen en el seno aórtico anterior. Para cumplir con este objetivo, se llevaron a cabo análisis retrospectivos y prospectivos de tipo anatómico e histomorfológico de corazones con VAT (datos publicados en Durán et al. 2007b) y VAB tipo A (datos nuevos) de hámsteres pertenecientes a la cepa de hámster sirio con alta incidencia de VAB (cepa T).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo III

## Publicación 1

### **Endocardial-mesenchymal transition underlies fusion of the conotruncal ridges during normal and bicuspid aortic valve development**

María Teresa Soto-Navarrete, Bárbara Pozo-Vilumbrales, Miguel Ángel López-Unzu, Ana Carmen Durán, Miguel Such, Borja Fernández

*En vías de publicación*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

En la introducción de esta tesis se explica que el proceso de septación conotruncal divide el tracto de salida cardiaco embrionario en dos tractos de salida independientes mediante la formación del septo conotruncal. La aparición de este septo resulta de la fusión de las crestas conotruncales, dos cojines endocárdicos largos, helicoidales y enfrentados que se extienden a lo largo de todo el tracto de salida. Estos cojines son de naturaleza mesenquimática y están recubiertos por una capa de células endocárdicas (*Spicer et al., 2014*). La fusión de las crestas conotruncales tiene lugar tras el contacto de los endocardios que recubren ambas crestas conotruncales. Las células endocárdicas de la región central de las crestas desaparecen, permitiendo la continuidad celular entre las dos crestas enfrentadas y dando lugar a una estructura única como resultado de la fusión. Sin embargo, se desconoce el mecanismo celular subyacente responsable del proceso de fusión. Dicho de otro modo, se desconoce el mecanismo celular que causa la desaparición de las células endocárdicas que tapizan ambas crestas.

En la región intermedia del tracto de salida, además de las crestas conotruncales, aparecen otros dos cojines endocárdicos de pequeño tamaño, denominados cojines intercalares, que se localizan en posición anterior y posterior (**Figura 4B**; *Spicer et al., 2014*; *Peterson et al., 2018*). Como resultado de la fusión de las crestas y de la formación del septo conotruncal, en esta región aparecen seis cojines mesenquimáticos, llamados cojines valvulares, que constituyen los primordios valvulares aórtico y pulmonar (**Figuras 4B-D**). Los extremos anteriores y posteriores no fusionados de las dos crestas conotruncales dan lugar a las valvas y senos aórticos y pulmonares izquierdos y derechos, mientras que los cojines intercalares posterior y anterior dan lugar a las valvas y senos no coronarios o posteriores

aórticos y anteriores de la válvula pulmonar (**Figura 4**). Tanto en el proceso de formación de los cojines endocárdicos como en el de septación conotruncal intervienen las células de la CNC (*Waldo et al., 1998, 1999a, 1999b; Anderson et al., 2003, 2012*). Estas células, de origen ectodérmico, migran a través del tracto de salida cardiaco y participan en la correcta formación y posicionamiento de las crestas conotruncales y cojines intercalares para, posteriormente, regular el proceso de septación conotruncal.

En la introducción de esta tesis también se indica que la VAB es la anomalía congénita cardiaca más común en el ser humano, siendo la VAB tipo A el morfotipo valvular más frecuente (75% de los casos) (*Fedak et al., 2002; Basso et al., 2004*). El grupo de investigación al que pertenece la autora determinó, mediante el uso de una cepa de hámster sirio con alta incidencia de VAB tipo A, que la etiología de esta malformación se basa en una distribución anómala de las células de la CNC durante la septación del tracto de salida, asociada a un exceso de fusión de las crestas conotruncales (*Sans-Coma et al. 1996; Fernández et al. 2009*). Sin embargo, se desconoce la causa de la extra-fusión de las crestas conotruncales debido a que aún no se ha determinado cual es el mecanismo celular implicado en el proceso normal de fusión de las crestas.

El objetivo de la Publicación 1 fue, en primer lugar, dilucidar el mecanismo celular implicado en la fusión normal de las crestas conotruncales para, posteriormente, indagar en el mecanismo de extra-fusión que da lugar a la VAB tipo A, utilizando embriones de hámster sirio de la cepa T (40% de VAB) y de una cepa control con incidencia nula.

Durante el desarrollo embrionario son frecuentes los eventos de fusión relacionados con procesos organogénéticos. Se ha propuesto la participación de tres mecanismos celulares distintos en estos eventos: adhesión epitelial, apoptosis epitelial y TEM (Ray & Niswander, 2012). El primer mecanismo requiere de la expresión de moléculas de adhesión y el mantenimiento de la identidad de las células en contacto, lo cual ha sido previamente adscrito a estadios tempranos de la formación del tubo neural (Punovuori et al., 2021). En los otros dos mecanismos, las células epiteliales que recubren las estructuras que se fusionan desaparecen por apoptosis o por TEM. Estos mecanismos celulares son responsables del proceso de fusión que da lugar, por ejemplo, al paladar (Martínez-Álvarez et al., 2000). Puesto que el endotelio que constituye el endocardio es un epitelio escamoso especializado (Kovacic et al. 2012), los tres mecanismos descritos pueden extrapolarse al endocardio. Teniendo en cuenta que las células endocárdicas desaparecen durante la fusión de las crestas conotruncales, se propusieron la apoptosis y la TEM como posibles mecanismos candidatos responsables del proceso. Para testar la implicación de los dos mecanismos propuestos, se utilizaron al menos dos técnicas de análisis diferentes para cada uno de ellos. En el caso de la apoptosis, se llevaron a cabo ensayos de TUNEL, que detecta la fragmentación nuclear asociada a la apoptosis, e inmunofluorescencia para la proteína caspasa 3 activa, principal proteína ejecutora de la vía de señalización de la apoptosis. Estas dos técnicas se consideran las "gold standard" para la identificación y visualización de apoptosis en los tejidos (Correio et al., 2008). En cuanto a la TEM, se realizó un análisis morfológico a partir de secciones histológicas semifinas, para identificar características morfológicas celulares asociadas a la transformación, e inmunofluorescencia

para marcadores específicos de endocardio (CD34 y VE-Cadherina) y migración celular ( $\alpha$ -actina), que permitieran detectar células endocárdicas en proceso de TEM. Estas dos técnicas han sido empleadas previamente para identificar células en proceso de TEM en diversos tejidos embrionarios y adultos (Hay, 1968; Abdulla et al., 2013; Yang et al., 2020).

### Resultados y discusión

La septación conotruncal en el hámster ocurre aproximadamente entre los estadios E11 (fusión de las crestas conotruncales) y E12 (formación del septo conotruncal) (**Figura 1 de la publicación**). Los experimentos realizados para testar la apoptosis como posible mecanismo responsable de la fusión de las crestas, es decir, tanto el ensayo de TUNEL como la inmunofluorescencia para caspasa 3 activa, no mostraron resultados positivos en el área de fusión. Sin embargo, sí permitieron identificar células apoptóticas en otras estructuras embrionarias, como el septo conotruncal y la pared torácica, en las que se había descrito previamente la presencia de apoptosis (**Figura 2 de la publicación**) (Poelman et al., 1998; Dickman et al., 1999). Por otro lado, el análisis morfológico fino (**Figura 3 de la publicación**) y los experimentos de colocación mediante inmunofluorescencia (**Figura 4 de la publicación**) determinaron la presencia de tres tipos celulares diferentes en la zona de fusión: 1) células endocárdicas CD34<sup>+</sup> y VE-Cadherina<sup>+</sup> en el área proximal a la zona de fusión, que presentaban la morfología convencional plana de una célula endotelial, con un núcleo prominente, elíptico y aplanado que ocupaba la mayor parte del cuerpo celular (Nakaya & Sheng, 2008; Kurn & Daly, 2021); 2) células mesenquimáticas  $\alpha$ -actina<sup>+</sup> en

el área distal a la zona de fusión, que presentaban un cuerpo celular pequeño, con algunas proyecciones de la membrana (filopodios y lamelipodios) y un núcleo grande y redondo con partículas de cromatina diseminadas, típicos de las células mesenquimáticas en reposo (*Hay, 1968; Nakaya & Sheng, 2008*); y 3) células con fenotipo intermedio entre células mesenquimáticas y endoteliales, CD34<sup>+</sup>;α-actina<sup>+</sup> y VE-Cadherina<sup>+</sup>;α-actina<sup>+</sup>, ubicadas en una posición intermedia entre los dos tipos celulares anteriores. Estas células tenían una morfología endotelial moderadamente aplanada, un núcleo hipertrofiado y/o extensiones de la membrana plasmática compatibles con filopodios y lamelipodios, similares a los detectados en las células mesenquimáticas. Las células con fenotipo intermedio mostraban características morfológicas previamente descritas como típicas de la TEM (*Hay, 1968; Abdulla et al., 2013; Yang et al., 2020*).

Por lo tanto, los resultados demostraron que la TEM, y no la apoptosis, es el mecanismo subyacente a la fusión de las crestas conotruncales. Las células endocárdicas de la región central de las crestas conotruncales enfrentadas desaparecen al transformarse en células mesenquimáticas, indistinguibles del resto del mesénquima, dando lugar a la continuidad morfológica entre estas estructuras. Además, la distribución de cada uno de los tipos celulares descritos en el área de fusión permite establecer un patrón secuencial del proceso de TEM. Se puede inferir que las células endocárdicas más proximales CD34<sup>+</sup> y VE-Cadherina<sup>+</sup> aún no han iniciado la TEM, las células con fenotipo intermedio y señales positivas para ambos marcadores (CD34<sup>+</sup>;α-actina<sup>+</sup> y VE-Cadherina<sup>+</sup>;α-actina<sup>+</sup>) se encuentran en pleno proceso de transformación, y las células mesenquimáticas más distales α-actina<sup>+</sup> están finalizando el proceso de transición. Así, este patrón refleja una secuencia disto-proximal

de eventos celulares asociados al mecanismo de TEM. Resulta consistente que este patrón morfológico asociado al proceso de TEM siga la misma secuencia disto-proximal que el proceso morfogenético completo de septación conotruncal.

En la literatura se han definido dos mecanismos celulares adscritos al proceso de transformación epitelio-mesénquima (*Duband, 2012*). El primero es conocido como TEM parcial, en la que la transformación afecta sólo a unas pocas células dentro del epitelio o tiene lugar de forma escalonada a lo largo del tiempo, de tal manera que el epitelio queda intacto durante todo el proceso, y finalmente se obtienen dos tipos celulares distintos (epitelial y mesenquimático). El segundo mecanismo conlleva una TEM completa, que tiene lugar cuando en el epitelio todas las células sufren transformación de manera simultánea, desintegrándose por completo la lámina epitelial, y convirtiéndose simultáneamente en mesénquima. Ambos mecanismos de TEM han sido descritos en procesos implicados en el desarrollo embrionario, tales como la delaminación de las células de CN craneal y el desarrollo del esclerotomo y el dermatomo (*Acloque et al., 2009; Schiffmacher et al. 2018*). Tal y como se menciona anteriormente, se considera que estos mecanismos también pueden ser extrapolados al endocardio. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que la fusión de las crestas conotruncales se basa en un mecanismo de TEM completa que afecta de manera secuencial, en dirección disto-proximal, a las células endocárdicas subyacentes, lo que explicaría la presencia de células con fenotipos diferentes en el área de fusión (esto es, células mesenquimáticas transformadas, células con fenotipo intermedio transformándose, células endoteliales sin transformación).

Para indagar en el origen de la extra-fusión que da lugar a la VAB tipo A, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia para CD34 y  $\alpha$ -actina con el fin de analizar el proceso de TEM durante la formación de los primordios de las válvulas semilunares (**Figura 5 de la publicación**). Se examinaron embriones en estadios E11 y E12 pertenecientes a la cepa T de hámster, con incidencia relativamente alta de VAB tipo A ( $\sim 40\%$ ), y de una cepa control, sin VAB (0%). El 37.5% de los embriones examinados de la cepa T presentaban una VAB en desarrollo. En E11, los embriones anómalos mostraban una fusión excesiva de las crestas conotruncales que se extendía hacia los márgenes posteriores, tal y como se había descrito con anterioridad (*Fernández et al. 2009*). La doble inmunofluorescencia puso de manifiesto la existencia de células CD34<sup>+</sup>;VE-Cadherina<sup>+</sup>; $\alpha$ -actina<sup>-</sup> en el endocardio, células  $\alpha$ -actina<sup>+</sup> en el mesénquima de las crestas y células CD34<sup>+</sup>;VE-Cadherina<sup>+</sup>; $\alpha$ -actina<sup>+</sup> en los márgenes posteriores de las crestas, es decir, en la región de las crestas conotruncales afectada por la extra-fusión. Estas células mostraban una distribución muy similar a la observada en el área de fusión de los embriones normales: las células CD34<sup>+</sup>;  $\alpha$ -actina<sup>+</sup> se localizaban en la porción media de la zona de fusión, que se encontraban limitadas distalmente por células mesenquimáticas  $\alpha$ -actina<sup>+</sup> y proximalmente por células CD34<sup>+</sup>;  $\alpha$ -actina<sup>-</sup> del endocardio. Estos resultados parecen indicar que la TEM es el mecanismo celular implicado en la extra-fusión de las crestas conotruncales que da lugar a la VAB, la cual ocurre mediante una extensión, desde el centro hacia el margen posterior de las crestas, del proceso normal de TEM implicado en la fusión. Además, los resultados refuerzan la hipótesis propuesta que explica el mecanismo de fusión de las crestas, basado en un proceso de EMT secuencial y completa.

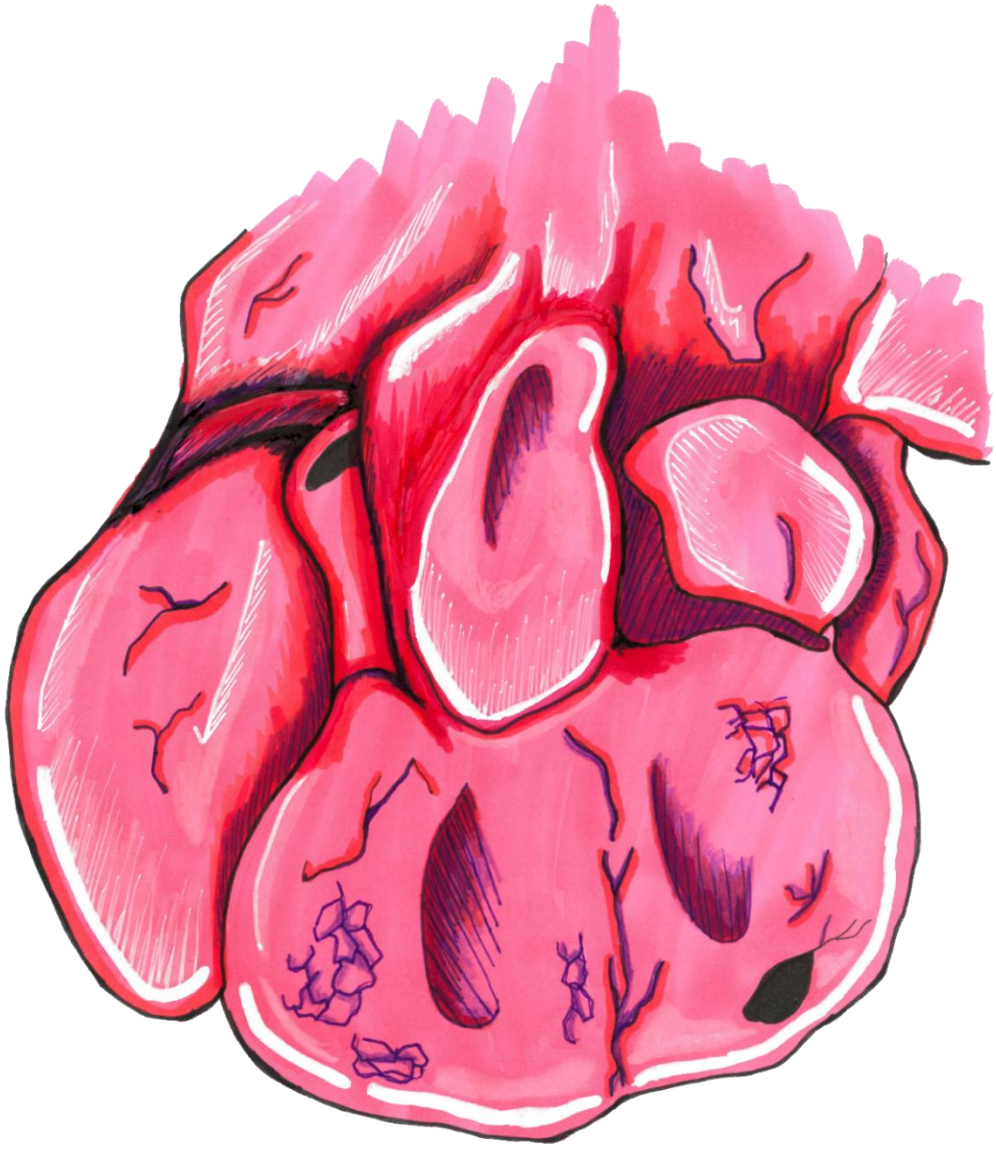
En el tracto de salida de los embriones E12 examinados se identificaron el septo conotruncal y los cojines que conforman el primordio de la válvula aórtica. En los embriones control, el endocardio (CD34<sup>+</sup>) que delimitaba los cojines valvulares izquierdo y derecho de la válvula aórtica alcanzaba el septo conotruncal, pudiéndose observar dos cojines separados y bien definidos. Sin embargo, en los embriones con VAB pertenecientes a la cepa T, el endocardio CD34<sup>+</sup> que recubría los cojines valvulares izquierdo y derecho no alcanzaba el septo conotruncal, observándose dos cojines valvulares fusionados. Además, se detectaron algunas células mesenquimáticas CD34<sup>+</sup>; $\alpha$ -actina<sup>+</sup> que se localizaban cerca del endocardio, concretamente en el área de coalescencia de los cojines. Estos resultados permiten interpretar que las células que muestran doble marca son células endocárdicas en proceso de TEM. Esto sugiere que, durante el desarrollo de la VAB, la fusión de las crestas conotruncales continúa tras la formación del septo conotruncal. Proponemos que durante la formación de la VAB tipo A existe una alteración en el proceso de TEM, que produce una extensión espacial (esto es, expansión hacia los límites posteriores de las crestas conotruncales) y temporal (es decir, después de la formación del septo conotruncal) del proceso de fusión.

La hipótesis de la desregulación de la TEM parece coherente con el hecho de que, como se indicó anteriormente, la VAB tipo A tiene su origen en una distribución anómala de las células de la CNC en el tracto de salida cardiaco (Fernández *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la CNC es esencial para la correcta septación del tracto de salida y formación de las válvulas semilunares. La CNC conforma el llamado complejo de septación aórtico-pulmonar, que tiene forma de "U" invertida y está constituido por un septo mesenquimático y condensaciones que se extienden proximalmente a lo largo

de las crestas conotruncales. La migración de este complejo a través del tracto de salida produce la fusión de las crestas y la formación del septo conotruncal (*Waldo et al., 1999a, 1999b; Anderson et al. 2003, 2012*). Considerando este hecho, se puede plantear que la CNC es responsable de la inducción secuencial de la TEM de las células del endocardio conotruncal en contacto, próximas al septo conotruncal (TEM completa), que conduciría a la fusión secuencial de las crestas. La alteración de la migración de las células de la CNC a lo largo del tracto de salida conllevaría una ampliación del territorio de inducción de TEM, afectando a una mayor extensión del endocardio y produciendo un exceso de fusión de los cojines. Esta hipótesis parece consistente con el trabajo de Plein y colaboradores (2015), en el que se demostró que la migración de la CNC y la TEM son dos procesos morfogénicos interconectados. En dicho estudio se describió que la entrada de las células de la CNC en estadios tempranos de la cardiogénesis induce la TEM del endocardio para promover la celularización de las crestas conotruncales. Por lo tanto, dado el papel regulador de la CNC sobre el proceso de TEM, parece plausible que estas células sean también responsables de la regulación de la TEM asociada al proceso de fusión implicado en la septación conotruncal. La regulación de este evento implicaría el establecimiento de un sistema de comunicación entre la CNC y el endocardio de las crestas. Se ha demostrado que la producción de SEMA3C por parte de las células de la CNC promueve la TEM en el endocardio a través de NRP1 endotelial durante la formación y celularización de las crestas conotruncales (*Plein et al., 2015*). Sería de gran interés profundizar si esta vía de señalización también podría estar implicada en el proceso de EMT subyacente a la fusión de las crestas conotruncales.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo IV

## Publicación 2

### **Embryonic development of bicuspid aortic valves**

María Teresa Soto-Navarrete, Miguel Ángel López-Unzu, Ana Carmen Durán, Borja Fernández

*Progress in Cardiovascular Diseases, (2020) 63:407–418.*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

En la introducción de la presente tesis se explica que el grupo de investigación al que pertenece la autora determinó los defectos morfogénéticos que causan los dos principales tipos anatómicos de VAB (A y B), lo cual supuso una mejora significativa del conocimiento que se tenía hasta el momento sobre la enfermedad. Los principales modelos animales que el grupo utilizó para indagar en esta cuestión fueron la cepa T de hámster sirio, con alta incidencia de VAB tipo A, y la cepa de ratones eNOS-KO con VAB de tipo B (*Sans-Coma et al., 1996; Fernández et al. 2009*).

El hallazgo tuvo una gran repercusión tanto en el ámbito de la investigación clínica como en el de la básica, ya que quedó establecido por primera vez que los distintos tipos de VAB no son meras variantes anatómicas de un mismo defecto embrionario, sino que cada tipo resulta de una etiología específica. Con respecto a la investigación clínica, se multiplicaron los estudios con pacientes en los que se tenía en cuenta el tipo de VAB para dilucidar la etiofisiopatología y progresión de las patologías asociadas a la VAB (*Basso et al., 2004; Della Corte et al., 2007; Michelena et al., 2015*), ya que se reforzaba la idea de que estas valvulopatías y aortopatías presentan etiofisiopatologías específicas. En cuanto a la investigación básica, este estudio instó a otros grupos a incluir la morfología y embriología de la VAB en el análisis fenotípico de cepas de ratón sujetas a diversas estrategias de manipulación genética. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, la morfología y desarrollo valvular constituyó una característica más entre las muchas a valorar en la evaluación fenotípica de la cepa transgénica. En la mayoría de estos trabajos, el objetivo principal no era profundizar en el proceso de valvulogénesis en sí, sino en distintos aspectos de la morfogénesis de órganos y sistemas en general, con el objetivo de indagar en el

funcionamiento de determinadas vías moleculares y mecanismos celulares o en la función específica de los genes modificados, sin restringirse específicamente al sistema cardiovascular. Teniendo esto en cuenta, resulta evidente que los diferentes mecanismos moleculares, celulares y morfogenéticos que afectan al desarrollo de la VAB y que se pretenden extraer de estas investigaciones quedan dispersas en la literatura científica de la última década, no especializada en el sistema cardiovascular.

El objetivo principal de esta publicación era cubrir la necesidad de compilar toda esta información en un documento de revisión, dada la gran diversidad de mecanismos celulares y moleculares implicados en la embriología de la VAB. Esta necesidad se pone de manifiesto en el hecho de que esta publicación fue una invitación para un número especial de la revista *Progress in Cardiovascular Diseases* dedicado a una actualización del conocimiento generado hasta el momento sobre la VAB.

## Revisión

De acuerdo con los estudios que han analizado la anatomía y/o la morfogénesis de la válvula aórtica en modelos animales, el desarrollo de la VAB puede ser consecuencia de defectos durante tres etapas del proceso de valvulogénesis: 1) la formación de los cojines endocárdicos (**Figura 5 de la publicación**), 2) la septación del tracto de salida (**Figura 6 de la publicación**), y 3) la excavación de los cojines valvulares (**Figura 7 de la publicación**). Así pues, en este trabajo se ha concluido que durante estos estadios embrionarios tienen lugar procesos morfogenéticos clave para la formación de la VAB, en los que se manifiestan alteraciones en los

mecanismos celulares y moleculares implicados y que se describen a continuación.

### **1. Defectos en la formación de los cojines endocárdicos**

La modificación genética mediante transgénesis condicional en ratones mutantes para diferentes vías de señalización (*Pbx*, *eNOS*, *Gata5*, *Alk2*, *Rock*, *Brg1*, *Jag1*, *Ift88*, *Npr2*) causan una formación anómala de los cojines endocárdicos, dando lugar a VAB de tipo latero-lateral (**Tabla 1 de la publicación**) (*Stankunas et al., 2008; Fernández et al., 2009; Laforest et al., 2011; Thomas et al., 2012; Phillips et al., 2013; Akerberg et al., 2015; MacGrogan et al., 2016; Blaser et al. 2017; Peterson et al., 2018*). El defecto morfológico consiste en el desarrollo de tres en lugar de cuatro cojines endocárdicos. En la mayoría de los casos una de las crestas conotruncales (usualmente la parietal), aparece unida (anatómicamente fusionada) al cojín intercalar posterior, formando un gran cojín mesenquimático. Como consecuencia, tras la septación normal del conotruncus, se forma un tracto de salida derecho con tres cojines valvulares pulmonares normales y un tracto de salida izquierdo con solo dos cojines aórticos, uno grande y otro de menor tamaño. La excavación de estos cojines valvulares aórticos anómalos lleva a la formación de VAB latero-lateral de tipo B (R-NC) o C (L-NC) (**Figura 5 de la publicación**).

Como se indica en la introducción, las células mesenquimáticas de los cojines endocárdicos pertenecen a dos linajes celulares diferentes, las células del SHF derivadas del endocardio, que pueblan la gelatina cardiaca por un proceso local de TEM, y las células de la CNC derivadas del ectomesénquima,

que migran hacia el tracto de salida cardiaco desde el tubo neural a través de la región circunfaríngea. Alteraciones en estos dos procesos celulares, la TEM y la migración de las células de la CNC, han sido aducidos como posibles causas de la formación aberrante de los cojines endocárdicos que dan lugar a VAB tipo B o C en estos modelos (*Stankunas et al., 2008; Fernández et al., 2009; Laforest et al., 20011; Phillips et al., 2013; Akerberg et al., 2015; MacGrogan et al., 2016; Blaser et al., 2017; Toomer et al., 2017; Peterson et al., 2018*).

### 1.1. Alteraciones en la TEM

El ratón knockout para eNOS fue el primer modelo de ratón en el que se encontró VAB (*Fernández et al. 2009*). En este caso, la malformación valvular resulta de defectos en la formación de los cojines endocárdicos. En particular, la cresta conotruncal parietal y el cojín intercalar posterior se desarrollan como un cojín único. Aunque esta morfología se describió como fusión de los dos cojines, en realidad no hay un proceso de fusión como tal. Los cojines se forman de manera anómala desde su origen, es decir, las células mesenquimáticas pueblan la gelatina cardiaca de manera defectuosa (**Figura 5 de la publicación**) (*Fernández et al., 2009*). Dado que eNOS tiene un papel relevante durante el proceso de TEM que da lugar a los cojines endocárdicos (*Noiri et al., 1998; O’Riordan et al., 2007*), se propuso que una alteración en el proceso de TEM mediada por la expresión defectuosa de este gen podría ser el agente causal de la malformación (*Fernández et al., 2009*). Esta hipótesis se ve reforzada por estudios que demuestran que la falta de eNOS conduce a un desarrollo aberrante de las válvulas mitral y tricúspide debido a un defecto en el proceso de TEM (*Liu & Feng, 2012*). En las células endocárdicas, eNOS regula la expresión de *Tgfβ1*, *Bmp2* y *Snail1* a través de

una vía de señalización dependiente de GMPc que promueve la TEM (*Liu & Feng, 2012; von Gise & Pu, 2012*). Además, la regulación del proceso de TEM por parte de eNOS es dependiente de la activación mediante NOTCH de la vía de señalización PI3K/AKT (*Chang et al., 2011*). De hecho, el eje NOTCH1-BMP2-SNAI1 promueve y regula la extensión de la TEM durante el desarrollo embrionario (*Luna-Zurita et al., 2010*).

Se ha demostrado que la vía de señalización de NOTCH está implicada en defectos en la TEM, responsables del desarrollo anormal de los cojines endocárdicos y de la formación de VAB (*Timmerman et al., 2004; Akerberg et al., 2015; Blaser et al., 2017*). La pérdida heterocigótica de NPR2 en ratones da lugar a VAB de tipo B (R-NC) con baja penetrancia (*Blaser et al., 2017*). Parece que la señalización CNP/NPR2 en los cojines endocárdicos podrían inducir la síntesis de GMPc para promover la TEM tanto de manera dependiente como independientemente de NOTCH. Por otro lado, la falta de BRG1 en ratones mutantes causa la formación de VAB por disrupción del proceso de TEM en los cojines endocárdicos, la cual es parcialmente compensada por el incremento de la proliferación de las células de la CNC (*Akerberg et al., 2015*). BRG1 es una enzima remodeladora de cromatina que regula la expresión de NOTCH (*Takada et al., 2016; Zhang et al., 2019*). Parece que la severidad en cuanto al defecto de la TEM determina el tipo anatómico de la VAB latero-lateral resultante. Por otro lado, se han identificado variantes sin sentido (*missense variants*) en pacientes con malformaciones en el tracto de salida y ventrículo izquierdo, incluyendo VAB (*McBride et al., 2008*). Parece que estas variantes genéticas alteran el proceso de TEM en líneas celulares endoteliales humanas a través de una inducción alterada de diferentes miembros de la familia de factores de

transcripción de SNAIL. Se ha propuesto que una ligera reducción de la dosis de NOTCH1 puede afectar parcialmente la inducción de TEM en los cojines endocárdicos, predisponiendo al desarrollo de una variedad de malformaciones del tracto de salida, incluyendo VAB (*McBride et al., 2008*).

Aunque se ha profundizado en los mecanismos moleculares implicados en el proceso de TEM durante la formación de los cojines endocárdicos, aún se desconoce por qué la alteración del proceso afecta específicamente a la región posterior del conotruncus, correspondiente al área de desarrollo de la cresta conotruncal parietal y el cojín intercalar posterior. Recientemente se ha demostrado que los cojines intercalares no se forman como estructuras independientes, sino que cada cojín intercalar constituye una extensión de una cresta conotruncal específica (*Peterson et al., 2018*). El cojín intercalar posterior está conectado proximalmente con la cresta conotruncal parietal, mientras que el cojín intercalar anterior está conectado proximalmente con la cresta conotruncal septal. Por lo tanto, es previsible que un fallo en el proceso de TEM que afecte a la porción derecha o posterior del conotruncus, altere la formación del par cresta parietal/cojín intercalar posterior, lo que explicaría la mayor proporción de VAB tipo B en las cepas analizadas (**Tabla 1 de la publicación**).

### 1.2. Alteraciones en la migración/agregación de la CNC

Existen muchas evidencias que indican que las células de la CNC están implicadas en la formación de VAB, aunque se han tardado décadas en descifrar los mecanismos moleculares, celulares y morfogenéticos implicados.

Los ratones con una disrupción condicional del gen *Rock* en células de la CNC desarrollan una gran variedad de defectos en las válvulas aórtica y

pulmonar, incluyendo VAB (*Phillips et al., 2013*). ROCK es una proteína quinasa muy conservada, implicada en multitud de procesos celulares tales como contracción, adhesión, migración, apoptosis, y proliferación (*Sato et al., 2011*). Esta proteína es necesaria para la adhesión célula-célula y para la comunicación entre las células de la CNC que pueblan el tracto de salida cardiaco. Perturbaciones en la expresión de ROCK dan lugar a contactos célula-célula aberrantes (*Phillips et al., 2013*). Como consecuencia, se produce una agregación defectuosa de las células de la CNC en el tracto de salida cardiaco, lo que resulta en un posicionamiento alterado de los cojines endocárdicos (*Phillips et al., 2013*). Se ha descrito que la CNC contribuye de manera diferente en la formación y celularización de los distintos cojines valvulares (*Eley et al., 2018*). Aunque los cojines intercalares están formados principalmente por células procedentes del SHF, parece que el cojín intercalar posterior de la válvula aórtica cuenta con cierta contribución de células de la CNC, mientras que la participación de estas células en el cojín intercalar anterior de la válvula pulmonar es prácticamente nula. Teniendo esto en cuenta, junto al hecho de que el cojín intercalar posterior está conectado con la cresta conotruncal parietal, se podría explicar el incremento de la incidencia de VAB, particularmente del tipo B (R-NC) en comparación con el C (L-NC) y bicúspide en la pulmonar. Esto pone de manifiesto la existencia de áreas en el tracto de salida con gran susceptibilidad a la perturbación de la CNC (*Phillips et al., 2013, Eley et al., 2018*).

PBX es un factor de transcripción bien conocido que regula el comportamiento de las células de la CNC (*Moens & Selleri, 2006*). Diferentes combinaciones de mutaciones en isoformas de *Pbx* en embriones de ratón modificados genéticamente dan lugar a un espectro de malformaciones

cardiacas del tracto de salida que incluyen VAB (*Stankunas et al., 2008*). La ausencia de expresión de diferentes isoformas de *Pbx* alteran la distribución de las células de la CNC en el tracto de salida en desarrollo, aunque no se ha determinado si estas alteraciones causan una formación anómala de los cojines endocárdicos o una septación del tracto de salida defectuosa.

La vía de señalización de NOTCH no solo regula el mecanismo de TEM, sino también el comportamiento celular de la CNC (*High et al., 2007, 2009*). Alteraciones en la señalización de NOTCH en diferentes tipos celulares y en distintos estadios del desarrollo causan varios defectos cardiacos, incluida la VAB. Se ha demostrado que se requiere de la señalización endocárdica de JAG1 a través de NOTCH1 para la correcta distribución de las células de la CNC durante la formación del complejo de septación aórtico-pulmonar en las crestas conotruncales fusionadas, asegurando tanto la correcta septación conotruncal como el posicionamiento adecuado de los cojines endocárdicos (*MacGrogan et al., 2016*).

La influencia de eNOS en la formación de los cojines endocárdicos también va más allá de la regulación de la TEM. Parece ser que esta enzima tiene un efecto aún poco conocido en el establecimiento del patrón de distintos linajes celulares en el tracto de salida cardiaco embrionario (*Peterson et al., 2018*). Como ya se explicó anteriormente, los primeros estudios sobre eNOS sugerían que tenía un papel crucial en el mecanismo de TEM responsable de la formación de los cojines endocárdicos (*Fernández et al., 2009*). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que en ratones deficientes para eNOS había una distribución anómala de las células del SHF y de la CNC en los cojines endocárdicos, lo que fue aducido como causa de formación de la VAB. Se ha sugerido que la expresión de eNOS por parte de las células

endocárdicas tiene un papel activo en guiar a las células de la CNC y del SHF a través del tracto de salida (*Peterson et al., 2018*). Aunque se desconoce el mecanismo molecular por el cual eNOS puede tener influencia sobre la migración celular, NOTCH es un buen candidato dado el papel de eNOS en la activación de NOTCH y la implicación directa de NOTCH en el establecimiento del patrón de la CNC (*High et al., 2007, 2009; Bosse et al., 2013; MacGrogan et al., 2016; Odelin et al., 2019*). Por lo tanto, la disrupción de eNOS en el tracto de salida podría llevar a la formación de VAB mediante la alteración de dos posibles mecanismos de desarrollo: TEM y migración de las células de la CNC (*Fernández et al., 2009; Peterson et al. 2018*). En ambos casos, los defectos tienen lugar durante la celularización de la gelatina cardiaca que forma los cojines endocárdicos, resultando en la coalescencia de la cresta conotruncal parietal con el cojín intercalar posterior, dando lugar a un gran cojín valvular aórtico derecho. Aunque los defectos en la TEM y la migración de la CNC pueden ocurrir de manera independiente, ambos mecanismos están interconectados a nivel morfogénico. Las células de la CNC que ingresan en el tracto de salida cardiaco en estadios tempranos instruyen al endocardio para iniciar el proceso de TEM, mientras que la señalización endocárdica instruye la relocalización de la CNC en los cojines endocárdicos (*Anderson et al., 2012; Plein et al., 2015*). Esta interconexión permite explicar cómo alteraciones en estos dos mecanismos celulares, TEM y migración de la CNC, pueden resultar en la misma morfología valvular aberrante.

### 1.3. Ausencia del cojín intercalar

Otro mecanismo morfogénico propuesto para la formación de VAB consiste en la ausencia del cojín intercalar posterior, lo que llevaría a la formación de

solo dos cojines valvulares aórticos, izquierdo y derecho, y VAB de tipo latero-lateral. La delección específica de *Alk2*, un gen que interviene en el proceso de TEM y en la migración de las células de la CNC (*Kaartinen et al., 2004; Wang et al., 2005; Desgrosellier et al., 2005*), causa una reducción significativa de la proliferación de las células mesenquimáticas de todos los cojines, dando lugar a VAB latero-lateral (*Thomas et al., 2012*). En la mayoría de los embriones afectados, la reducción de la proliferación no causa la ausencia del cojín intercalar posterior, sino su subdesarrollo, resultando en válvulas tricúspides con una valva no coronaria muy pequeña. En este modelo, la VAB parece resultar no de la coalescencia de la cresta conotruncal parietal y el cojín intercalar posterior, sino de la falta de desarrollo del cojín intercalar. Sin embargo, los autores no proporcionan una explicación satisfactoria que justifique la mayor afección del cojín intercalar posterior.

Recientemente, se ha descubierto que las células mesenquimáticas de los cojines intercalares no aparecen exclusivamente mediante TEM a partir del endocardio, sino que derivan en su mayor parte de una población de células del SHF que activan el promotor del gen *Tnnt2*. Sin embargo, estas células no se diferencian en células miocárdicas, sino que permanecen como células mesenquimáticas, que migran a través del miocardio de la pared del tracto de salida (*Eley et al., 2018*). El hallazgo de esta nueva subpoblación de células del SHF condujo a Eley y colaboradores a analizar los linajes celulares que contribuyen a la formación de las válvulas semilunares. Llegaron a establecer que en los cojines valvulares provenientes de las crestas conotruncales participan células derivadas del endocardio (TEM), células del SHF *Tnnt2*<sup>+</sup> y células derivadas de la CNC. Sin embargo, aunque en el cojín intercalar posterior intervienen los mismos linajes celulares, las proporciones varían

significativamente, siendo predominante la presencia de células del SHF Tnnt2<sup>+</sup> en relación a las células de la CNC o derivadas del endocardio. Por su parte, en el cojín intercalar anterior de la válvula pulmonar la contribución de células de la CNC es ínfima, siendo mayoritarias las células del SHF Tnnt2<sup>+</sup> y mostrando una pequeña proporción de células derivadas del endocardio. Al analizar en profundidad los resultados de Thomas et al., 2018, resulta relevante que la estrategia aplicada para la modificación genética fuera el silenciamiento de *Alk2* en células que expresan el gen *Gata5* (*Gata5<sup>cre</sup>/Alk2<sup>flox/flox</sup>*). *Gata5* es un gen cuya expresión ha sido habitualmente adscrita al SHF (Kelly & Evans, 2010; Laforest & Nemer, 2011; Lescroart et al., 2022). En el tracto de salida, las imágenes de Thomas et al., 2018 muestran que *Gata5* se expresa en el mesénquima de las crestas conotruncales y en las células SHF Tnnt2<sup>+</sup> del cojín intercalar posterior. Sin embargo, no se detecta expresión en la región correspondiente al cojín anterior. Por otro lado, la expresión de *Alk2* aparece en el endocardio, algunas células del mesénquima de las crestas que los autores atribuyen a la CNC, y en la región correspondiente al cojín intercalar posterior. Esto permite hipotetizar que la reducción de la proliferación descrita por los autores se debe principalmente al silenciamiento del *Alk2* en las células del SHF Tnnt2<sup>+</sup> de la válvula aórtica. Puesto que estas células se encuentran en mayor proporción en el cojín intercalar posterior, se puede concluir que el silenciamiento afecta de manera más severa a dicho cojín, dando lugar a la ausencia o atrofia de este. En cuanto a la reducción del tamaño de las crestas conotruncales, podría deberse no solo a la reducción de la proliferación de las células SHF Tnnt2<sup>+</sup>, las cuales tienen cierta representación en estos cojines, sino también al silenciamiento de *Alk2* en el endocardio. Parece que los

autores no consideraron que GATA5 se expresa en las células endocárdicas en estadios tempranos (*Nemer & Nemer, 2002*). Por tanto, no puede descartarse que en los embriones *Gata5<sup>cre</sup>/Alk2<sup>flox/flox</sup>* el proceso de TEM se haya visto afectado.

## **2. Defectos en la septación del tracto de salida**

En la introducción de la tesis se explica que la septación del tracto de salida ocurre mediante la fusión de las crestas conotruncales y la posterior formación del septo conotruncal por parte de las células de la CNC, dando lugar a los cojines valvulares aórticos y pulmonares separados por un septo. Sin embargo, cuando la fusión no se localiza estrictamente en el centro de las crestas conotruncales, sino que se extiende hacia los márgenes dorsales de las crestas, el resultado es la fusión de los cojines valvulares aórticos derecho e izquierdo, dando lugar a una VAB antero-posterior o tipo A (R-L). Este defecto morfogénético se describió por primera vez en el modelo hámster, en el que se mostró una asociación entre alteraciones en la migración de la CNC y un exceso de fusión de las crestas conotruncales (*Sans-Coma et al., 1996; Fernández et al., 2009*). La severidad del defecto embrionario original (la extensión de la fusión de las crestas conotruncales) da lugar a cojines valvulares aórticos izquierdo y derecho más o menos fusionados, originando una variedad de morfologías valvulares aórticas en forma de un continuo fenotípico. Este continuo, descrito en la Publicación 3 y para el que hay correspondencia en la especie humana (*Sans-Coma et al., 1993, 1996; Fernández et al., 2009; Michelena et al., 2021*), incluye VAB sin

rafe, VAB con rafe de tamaño variable y VAT con diferentes grados de fusión de las valvas derecha e izquierda (**Figura 6 de la publicación**).

Como en humanos, la VAB en el modelo hámster muestra una herencia compleja con una fuerte influencia ambiental (*Sans-Coma et al., 1993, 2012*), pero aún se desconocen los genes implicados. Aunque parece claro que un defecto en el comportamiento de las células de la CNC es el responsable de la septación anómala del tracto de salida (*Fernández et al., 2009; Martínez-Vargas et al., 2017*), el mecanismo celular que se ve alterado no había sido descrito hasta la fecha. Como ya se ha descrito, la VAB tipo A se desarrolla como consecuencia de la fusión excesiva de las crestas conotruncales durante el proceso de septación del tracto de salida cardiaco embrionario (*Fernández et al., 2009*). En la Publicación 1 de la presente tesis se dilucidó que la fusión, normal y anómala, es el resultado de la desaparición de las células endocárdicas que recubren las crestas conotruncales enfrentadas, mediada por un proceso de TEM localizado en la porción central de las crestas, que es inducido por las células de la CNC del complejo de septación aórtico-pulmonar.

La vía de señalización JAG/NOTCH parece ser un importante regulador del proceso de septación, como se adelantó en párrafos anteriores. Ratones mutantes condicionales para *Jag1* y *Notch1* muestran VAB tipo A, probablemente resultado de una distribución defectuosa de la CNC que lleva a una fusión anómala de las crestas. La implicación de NOTCH en la formación de la VAB tipo A, por tanto, es consistente con esta hipótesis, dado el papel central de esta vía de señalización en el proceso de TEM. Se demostró que una reducción de la actividad de NOTCH1 afecta al desarrollo de la válvula solo durante una ventana temporal limitada, que coincide con el comienzo

del proceso de septación (*MacGrogan et al., 2016*). Además, la capacidad de las células de la CNC para inducir TEM vía NRP1 se ajusta al papel regulador de la CNC en la fusión de las crestas conotruncales (*Plein et al., 2015*).

La revisión de los mecanismos de desarrollo del tracto de salida y de formación de VAB expuestos hasta ahora permite resaltar varias asociaciones relevantes: 1) Defectos en la CNC son responsables de alteraciones tanto en la formación de los cojines endocárdicos como en la septación del tracto de salida, dando lugar a VAB latero-lateral y antero-posterior, respectivamente; 2) El proceso de TEM está implicada tanto en la celularización de los cojines endocárdicos como en la fusión de las crestas conotruncales; 3) Las células de la CNC son capaces de inducir TEM en el endocardio del tracto de salida cardiaco embrionario.

En este punto resulta tentador especular que el comportamiento defectuoso de la CNC puede alterar el proceso de TEM en etapas tempranas, durante la formación de los cojines endocárdicos, o en etapas más tardías, durante la septación del tracto de salida, dando lugar a VAB latero-lateral o antero-posterior, respectivamente. El momento en el que tiene lugar la alteración en el proceso de TEM (durante la formación de cojines endocárdicos o durante la septación conotruncal) podría depender de mutaciones genéticas específicas, moduladores genéticos, factores epigenéticos o ambientales, tal y como se discute en la Publicación 3 de la presente tesis.

### **3. Defectos en la excavación de los cojines**

El último estadio valvulogenético que puede verse afectado en la formación de la VAB es el proceso de excavación de los cojines valvulares. Tal y como

se explica en la introducción, la excavación se basa en la elongación y adelgazamiento de los márgenes distales de los cojines valvulares, un proceso poco estudiado que parece incluir proliferación y muerte celular. Como resultado de defectos en la expresión de genes implicados en este proceso (*Krox20*, *Pax3*, *Adamts5*, *Smad2*, *Ift88*) se han descrito fenotipos intermedios de VAB de tipo A, B y C (**Figura 7 de la publicación**) (*Jain et al., 2011; Dupuis et al., 2013; Toomer et al., 2017; Odelin et al., 2018*). Se asume que el proceso de excavación incluye la diferenciación de células mesenquimáticas con origen en dos linajes celulares distintos: el mesodermo (SHF) y el ectodermo (CNC). Parece ser que las células de la CNC regulan la diferenciación de las células mesenquimáticas, la apoptosis y la producción de matriz extracelular durante el remodelado de las válvulas (*Schussler et al., 2020; Aikawa et al., 2006; Hinton & Yutzey, 2011; Jain et al., 2011*).

Los ratones deficientes para *Krox20* permitieron demostrar que la VAB puede desarrollarse debido a una maduración defectuosa de los cojines valvulares aórticos después de una formación y septación del tracto de salida normales (*Odelin et al., 2018*). La ausencia de KROX20 causa una alteración en el número y distribución de las células de la CNC en los cojines de la válvula aórtica, que afecta específicamente a la zona de la inserción de las valvas y al triángulo intervalvar. Como consecuencia, se altera la producción de matriz extracelular en estas áreas durante el proceso de excavación, dando lugar a la fusión anatómica de las valvas y a VAB tipo B y C y fenotipos intermedios (VAB con rafe). Además, parece ser que eNOS es una diana de KROX20, sugiriendo que la reducción en la activación de eNOS contribuye también a la formación de VAB en estos ratones mutantes (*Bosse et al., 2013*).

Se ha propuesto un mecanismo similar para la formación de VAB en ratones mutantes condicionales para Pax3 y Notch1 (*Jain et al., 2011; Wang et al., 2015*). En ambos casos, la manipulación genética afecta a la vía de señalización de *Notch1* y resulta en alteraciones de la proliferación y/o apoptosis de las células mesenquimáticas de los cojines valvulares, causando un remodelado anormal de los cojines que conduce a VAB. En los ratones mutantes para Pax3, la inhibición de NOTCH1 en el SHF afecta a la distribución de las células de la CNC en los cojines valvulares y altera la producción de matriz extracelular durante el remodelado de los cojines (*Jain et al. 2011*). Sin embargo, en los ratones mutantes *Notch1* no pudo excluirse la posibilidad de que el proceso morfogénico afectado fuese la septación del tracto de salida en lugar de la excavación de los cojines, debido a que en este trabajo no se profundiza en el mecanismo morfogénico que da lugar a la VAB (*Wang et al., 2015; Fernández & Durán, 2015*). Esto pone de manifiesto la importancia de llevar a cabo análisis morfológicos que permitan interpretar adecuadamente los fenotipos resultantes de la manipulación genética en estudios de la Biología del Desarrollo.

Por otro lado, la falta de *Adamts5* y *Smad2* en ratones mutantes causa una acumulación de la forma inactiva (sin escindir) de versican durante la valvulogénesis, dando lugar a la formación de VAB tipo B o C (*Dupuis et al., 2013*). ADAMTS5 parece ser la enzima encargada de llevar a cabo la escisión de versican, un proteoglicano que forma parte de la matriz extracelular (interacciona con hialuronan y fibrilina-1) y que tiene un papel importante en el mantenimiento de su integridad. La forma activa de versican se requiere para la diferenciación y compactación de las células mesenquimáticas de la válvula, la síntesis de colágeno y la organización de las fibras de la matriz

extracelular durante la formación de valvas y comisuras. Alteraciones en la escisión de versican reducen la diferenciación y compactación de las células mesenquimáticas, así como la secreción de colágeno. Además, la acumulación de versican inactivo expande aún más el grosor de las valvas en desarrollo. Todo ello conlleva la formación de valvas engrosadas que, al afectar preferentemente a las inserciones de las valvas y las comisuras, conducen a la fusión anatómica de los cojines valvulares aórticos en un estadio de post-septación, dando lugar a VAB de distintos tipos.

Por último, la pérdida de Ift88 causa el acortamiento de axonemas en las células de los cojines endocárdicos, suprimiendo la diferenciación de las células mesenquimáticas (Toomer *et al.*, 2017). Los axonemas son estructuras formadas por microtúbulos, que constituyen el componente principal de los cilios primarios, unos apéndices inmóviles de la célula cuya función es coordinar diversas vías de señalización (Ishikawa & Marshall, 2011). Una diferenciación deficiente de las células mesenquimáticas ensancha la zona de inserción entre cojines valvulares adyacentes, dando lugar a la formación de VAB. Sin embargo, no se puede excluir que en este modelo la VAB se forma por defectos tempranos en la formación de los cojines endocárdicos, dado el papel regulador de los cilios primarios en el proceso de TEM (Egorova *et al.*, 2011).

En resumen, las VAB también pueden resultar de anomalías durante la fase de excavación de la valvulogénesis. En la mayoría de los casos, las alteraciones, tanto en la producción de matriz extracelular como en el ratio de proliferación/apoptosis afectan a las células mesenquimáticas derivadas de la CNC en las zonas de inserción de los cojines valvulares. Esto resulta en la coalescencia de dos cojines adyacentes durante el proceso de excavación

y remodelado de los primordios valvulares, dando lugar a la VAB (**Figura 7 de la publicación**). En una gran proporción de los embriones en estadios perinatales incluidos en estos trabajos se describió la presencia de rafes y fusiones comisurales en válvulas aun inmaduras (*Jain et al., 2011; Dupuis et al., 2013; Wang et al., 2015; Odelin et al., 2018*). Esto sugiere que la formación de fenotipos valvulares intermedios puede ser el resultado habitual de este tipo de mecanismos patogénéticos (**Figura 7 de la publicación**).

Como ya se ha comentado, algunos de los estudios sobre el desarrollo embrionario de la VAB han mostrado todo un espectro de morfologías anómalas de los cojines valvulares aórticos en desarrollo (*Sans-Coma et al., 1996; Fernández et al., 2009; Thomas et al., 2012; Akerberg et al., 2015; Odelin et al., 2018*). Esto sugiere que la severidad del defecto embrionario original da lugar a diferentes morfologías de la válvula aórtica, incluyendo VAB, VAT y fenotipos intermedios en forma de un espectro fenotípico (**Figuras 5-7 de la publicación**). Por otra parte, la mayoría de los embriones afectos en estos trabajos mostraban cojines valvulares aórticos asimétricos (uno normal y otro de gran tamaño). Sin embargo, los adultos analizados presentaban normalmente dos valvas simétricas (de igual tamaño) (*Fernández et al., 2009; Laforest et al., 2011; Thomas et al., 2012; Akerberg et al., 2015; Blaser et al., 2017*). Aunque los procesos de excavación y maduración de los cojines valvulares aórticos en embriones con VAB en desarrollo no se han estudiado en detalle, se puede asumir que el tamaño de las dos valvas y senos aórticos se compensa durante dichos procesos.

En conclusión, la revisión de la literatura llevada a cabo en este trabajo ha permitido establecer tres procesos clave para el desarrollo de la VAB, así

como las alteraciones de los mecanismos celulares implicados en cada proceso: 1) formación anómala de los cojines endocárdicos debido a un defecto en el proceso de TEM o a una migración celular defectuosa de la CNC que resulta en la coalescencia de dos cojines endocárdicos, previo a la septación normal del tracto de salida. Este mecanismo resulta en el desarrollo de dos cojines valvulares en lugar de tres, cuyo remodelado da lugar a VAB tipo B o C; 2) fusión excesiva de las crestas conotruncales, mediada por una alteración en el proceso de TEM (resultados de la Publicación 1), que tiene lugar durante el proceso de septación del tracto de salida, debido a alteraciones en el comportamiento de las células de la CNC que colonizan las crestas conotruncales. Este mecanismo resulta en la coalescencia de los cojines valvulares aórticos izquierdo y derecho y, por tanto, a VAB tipo A; y 3) alteración del proceso de excavación de los cojines valvulares como consecuencia de una distribución anómala de las células de la CNC, una proliferación alterada de las células mesenquimáticas que componen los cojines y/o un defecto en la producción de matriz extracelular, generando VAB de distintos tipos con diferentes grados de severidad. Además, el análisis en profundidad de estos estudios ha permitido establecer relaciones consistentes entre los mecanismos descritos y diversas vías de señalización.

Las evidencias experimentales apoyan un papel central de la vía de señalización de NOTCH, ya que su alteración puede afectar tanto al proceso de TEM que forma los cojines endocárdicos, como a la migración de la CNC. La CNC es responsable de la septación del tracto de salida al inducir el proceso de TEM en el endocardio que cubre las crestas enfrentadas, por lo que anomalías en el comportamiento de estas células pueden alterar el proceso de TEM y la fusión de las crestas. Por consiguiente, se puede interpretar que

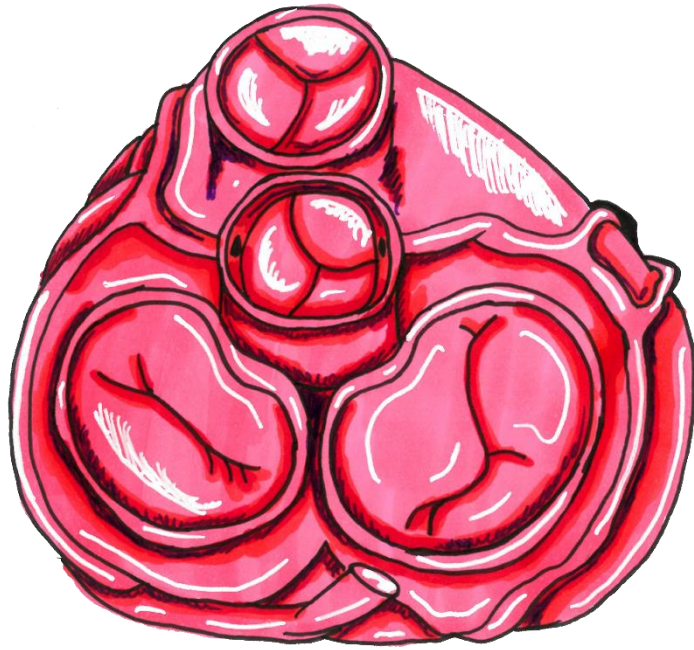
los tres procesos clave en la formación de la VAB son regulados por la CNC en tres etapas consecutivas del desarrollo. Así, un defecto genético específico puede alterar el comportamiento de la CNC en tres posibles momentos del desarrollo, determinando el proceso embrionario afectado y el tipo anatómico de VAB resultante.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo V

## Publicación 3

### **Bicuspid Aortic Valve in 2 Model Species and Review of the Literature**

Borja Fernández, María Teresa Soto-Navarrete,  
Alejandro López-García, Miguel ángel López-Unzu,  
Ana Carmen Durán, M. Carmen Fernández

*Veterinary Pathology, (2020) 57(2):321-331.*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Tal y como se indica en la introducción de la presente tesis, hasta el final del siglo pasado se pensaba que la VAB es una manifestación secundaria de un defecto vascular que altera el flujo sanguíneo y que afecta a etapas perinatales del proceso de valvulogénesis (*Shaner, 1963; Moore et al., 1980*). Sin embargo, varios trabajos del grupo de investigación al que pertenece la autora (*Sans-Coma et al., 1996; Fernández et al., 2009*) demostraron, de manera experimental, mediante dos modelos animales diferentes (hámster sirio y ratón de laboratorio), que las VAB tipo A y B se forman durante etapas valvulogénicas tempranas. Además, cada tipo de VAB es el resultado de un defecto morfogénico específico, por lo que se puede concluir que cada tipo de VAB presenta una etiología diferente.

Actualmente, existen un total de 29 cepas de estas dos especies de roedores en las que se ha registrado una alta incidencia de VAB (*Sans-Coma et al., 1996, 2012; Biben et al., 2000; Lee et al., 2000; Macatee et al., 2003; Stankunas et al., 2008; Fernández et al., 2000, 2009; Laforest et al., 2011; Makki & Capecchi, 2012; Thomas et al., 2012; Bosse et al., 2013; Dupuis et al., 2013; Phillips et al., 2013; Akerberg et al., 2015; Mommersteeg et al., 2015; Quintero-Rivera et al., 2015; MacGrogan et al., 2016; Toomer et al., 2017; Wang et al., 2017; Blaser et al., 2018; Odelin et al., 2018; Gharibe et al., 2018*). Se han descrito dos cepas de hámster sirio con VAB tipo A, 27 cepas de ratón mutantes con VAB tipo B y dos con VAB tipo A y B. Aunque estos modelos animales han contribuido sustancialmente a la mejora del conocimiento sobre la etiología de la VAB, no se sabe a ciencia cierta cuál es el nivel de bondad de cada especie modelo, es decir, se desconoce hasta qué punto la información generada puede extrapolarse a los humanos.

Como punto de partida para dilucidar esta cuestión, en este trabajo se propone investigar la variabilidad morfológica y la incidencia de VAB en cada especie modelo, con el objetivo de determinar la similitud del carácter entre las tres especies a nivel anatómico. Para ello, se han caracterizado y comparado las diferentes morfologías que puede presentar la válvula aórtica, así como las incidencias de las anomalías valvulares, en poblaciones representativas de hámster sirio y de ratón de laboratorio, a partir de datos propios y de información extraída de la literatura. Además, se han comparado estos datos con los obtenidos en los estudios que utilizan ratones modificados genéticamente donde se describe el desarrollo de VAB. Con respecto a los datos propios, se realizó un análisis prospectivo y retrospectivo de un total de 4340 hámsteres y 1823 ratones. Se incluyeron en el estudio ocho poblaciones diferentes de hámster sirio: cuatro cepas *inbred*, dos cepas *outbred* y dos cepas híbridas resultantes del cruzamiento de una de las cepas *inbred* con las dos cepas *outbred*. En cuanto a los ratones, se analizaron siete cepas distintas: tres cepas *inbred*, tres cepas *outbred* y una cepa híbrida resultante del cruzamiento entre dos cepas *inbred* (**Tabla 1 de la publicación**). Para más detalles, consultar la sección Material y Métodos de la publicación original.

### Resultados y discusión

Los resultados del presente estudio pusieron de manifiesto que la incidencia de VAB en las cepas control de hámster sirio oscila entre el 0% y el 4,7%, con un valor medio del 2,4% (**Tabla 2 de la publicación**). Con el término “cepas control” se pretende puntualizar que se excluyó del estudio a la cepa

T de hámster con alta incidencia de VAB. Estos porcentajes varían poco respecto a lo que se conoce de la especie humana (0,5%-2%) (*Roberts, 1970; Fedak et al., 2002; Basso et al., 2004*). Como se mencionó anteriormente, en humanos la VAB tipo A es la variante morfológica más frecuente (~74%), seguida de la VAB tipo B (~24%) y la VAB tipo C (~2%) (*Basso et al., 2004; Russo et al., 2008*). Sin embargo, la proporción de cada morfotipo difiere notablemente en los hámsteres (tipo A: 99%, tipo B: 1%) con respecto a la de los humanos.

La válvula aórtica del hámster muestra un amplio espectro de morfologías intermedias entre las condiciones tricúspide y bicúspide. Dichas morfologías, que también han sido descritas en humanos (*Michelena et al., 2021*), consisten en VAT con diferentes grados de fusión de las valvas (**Figuras 6 y 7 de la publicación**) y VAB con rafes de diferente tamaño (**Figuras 8, 9 y 15 de la publicación**). Además de VAB, en los hámsteres se identificaron válvulas aórticas cuadrícúspides (**Figura 18 de la publicación**), una malformación que consiste en un incremento del número de elementos que constituyen una válvula aórtica normal. La válvula cuadrícúspide muestra cuatro senos de tamaño variable, cuatro valvas, cuatro comisuras y cuatro triángulos intervalvares. En el caso de las válvulas cuadrícúspides identificadas en el hámster, los senos y valvas se localizan en posición derecha-ventral, izquierda-ventral, derecha-dorsal e izquierda-dorsal (*López-García et al., 2015*) (los términos ventral y dorsal son equiparables a anterior y posterior en humanos, respectivamente). Su incidencia era baja en el hámster y su morfología similar a la que muestran las válvulas humanas. Se trata de una anomalía congénita rara que puede ser compatible con un funcionamiento normal y permanecer asintomática (*Butany et al., 2005*).

Por otro lado, en las líneas de ratones examinadas, la incidencia de VAB (entre el 0% y el 1,2%, con un valor medio del 0,3%) era significativamente más baja que la de hámsteres y humanos (**Tabla 3 de la publicación**), siendo la VAB tipo B la única anomalía detectada. Además, la morfología de la válvula aórtica murina era menos variable que la de humanos y hámsteres, sin fusiones comisurales ni rafes (**Figuras 11-13, 17 de la publicación**).

Como se indicó anteriormente, los resultados de este estudio se obtuvieron tras el análisis de un total de 4340 hámsteres sirios y 1823 ratones de laboratorio, pertenecientes a ocho y siete poblaciones diferentes, respectivamente, con distintos fondos genéticos. Esto permite asumir que el tamaño muestral es suficientemente representativo para cada una de la especies.

Los estudios mencionados en la revisión bibliográfica sobre el tema describieron la presencia de VAB en animales pertenecientes a 27 cepas de ratón modificadas genéticamente (**Tabla 4 de la publicación**). En la mayoría de estas cepas, deficientes en 24 posibles genes, los animales mostraron exclusivamente VAB tipo B. Curiosamente, la VAB tipo A solo se identificó en cuatro de las 27 cepas analizadas (*MacGrogan et al., 2016; Wang et al., 2017; Gharibeh et al., 2018*). Estas cuatro cepas mostraban una expresión deficiente en tres posibles genes: *Gata6*, *Notch1* y *Jag1*. Cabe destacar que en ninguno de estos estudios se describe ni la presencia de rafes ni fusión de valvas.

Por tanto, nuestros datos, obtenidos de cepas salvajes de hámster y ratón, junto con los de la literatura, obtenidos de cepas de ratón modificadas genéticamente, indican que en ratones la válvula aórtica muestra muy poca

variabilidad morfológica, y que la VAB tipo B sin rafe es la malformación valvular predominante. Además, este trabajo pone de manifiesto que tanto el hámster como el ratón muestran diferencias interespecíficas en cuanto a la morfología e incidencia de la VAB en comparación con los humanos, aunque las diferencias con el modelo ratón son mucho más pronunciadas.

Aunque los modelos animales son una herramienta de incuestionable utilidad para la investigación de enfermedades humanas, para la correcta extrapolación de los resultados de una especie a otra es necesario considerar la existencia de posibles diferencias interespecíficas. Asimismo, deben tenerse en cuenta otras posibles limitaciones intrínsecas del modelo animal seleccionado. Una de estas limitaciones podría denominarse “diferencias intraespecíficas”, que aparece cuando el carácter o proceso biológico a investigar varía entre diferentes poblaciones de la especie modelo. Las diferencias intraespecíficas son particularmente relevantes en investigación biomédica, donde la mayoría de los estudios implican modelos animales desarrollados a partir de unas pocas cepas endogámicas (*inbred*) de ratón de laboratorio. Las cepas endogámicas o isogénicas resultan del cruzamiento entre familiares de primer grado durante al menos 20 generaciones. Por definición, una cepa endogámica es una población animal con una variación genética y fenotípica mínimas, dado que el retrocruzamiento entre hermanos promueve la fijación de alelos en el genoma y el aumento de la homocigosis, llegándose a alcanzar un estado homoalélico que hace que la cepa sea isogénica y genéticamente uniforme. Por tanto, todos los animales comparten el mismo genotipo, pudiendo considerarse clones (cepa isogénica) (*Benavides & Guénet, 2003*). Así pues, cuando los resultados experimentales obtenidos en una cepa animal endogámica específica se extrapolan a la especie

humana, se está comparando una población animal genética y fenotípicamente uniforme con el amplio espectro de genotipos y heterogeneidad morfológica de las poblaciones humanas.

En este contexto, estudios previos con ratones mutantes han demostrado que la penetrancia del fenotipo VAB tipo B es dependiente del fondo genético, detectándose con mayor incidencia en ratones mutantes con fondo genético C57BL/6 que con cualquier otro fondo (*López-García et al., 2016*). Curiosamente, la mayoría de los ratones de laboratorio salvajes que presentaban VAB, analizados en el presente estudio, eran híbridos que cuentan con parte del fondo genético de C57BL/6 en su genoma. Estos datos sugieren la existencia de diferencias alélicas entre cepas de ratón de laboratorio (fondos genéticos) que pueden modificar la incidencia de VAB. Por todo lo anterior, este estudio apunta a la necesidad de considerar las diferencias intraespecíficas cuando se utilicen modelos murinos en estudios sobre la enfermedad de la VAB.

Con respecto a los hámsteres, la incidencia de la VAB tipo A varía también ampliamente en animales resultantes de cruzamientos híbridos en función del fondo genético de los individuos parentales. Esto sugiere que la incidencia de VAB tipo A en el hámster sirio también se ve influenciada por la acción de alelos modificadores. Por otra parte, tanto los hámsteres de la cepa con alta incidencia de VAB (cepa T) como los animales híbridos resultantes de cruzamientos con dos posibles fondos genéticos, muestran una alta especificidad de VAB tipo A. Estos datos sugieren que el mecanismo genético implicado en la formación de VAB en este modelo altera específicamente los mecanismos morfogenéticos implicados en la formación de la VAB tipo A.

En cuanto a la especie humana, existen evidencias de la influencia de modificadores genéticos en la morfología de la VAB. Diversos estudios clínicos han puesto de manifiesto la discordancia en cuanto al tipo morfológico de VAB entre parientes de primer grado (*Calloway et al., 2011; Robledo-Carmona et al., 2013*), e incluso entre fetos con síndrome de Turner, causado por la misma anomalía genética (*van Engelen et al., 2014*). Esta discordancia morfológica también ha sido observada en algunos modelos de ratones mutantes. El análisis conjunto de estos datos sugiere, de nuevo, que algunos genotipos pueden dar lugar a VAB tipo A o B dependiendo de modificadores genéticos, aunque no se puede descartar la influencia del ambiente y/o factores epigenéticos. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que algunas mutaciones genéticas identificadas en el modelo ratón, que causan VAB exclusivamente de tipo B en esta especie, dan lugar en humanos a VAB tipo A y B. Aun así, algunas mutaciones que dan lugar a VAB son probablemente específicas de tipo, lo que parece ser el caso del modelo hámster y algunos modelos de ratón.

Las hipótesis antes expuestas, en el contexto de la presente tesis, conducen a la siguiente cuestión: ¿Cómo puede una mutación en un gen concreto dar lugar a dos tipos morfológicos de VAB, cuando cada tipo de VAB resulta de alteraciones morfogenéticas diferentes?

Como se expone en las Publicaciones 1 y 2 del compendio de esta tesis, la VAB tipo A tiene su origen en un comportamiento anómalo de las células de la CNC. Estas células son las encargadas de regular el proceso de TEM, responsable de la extra-fusión de los primordios valvulares izquierdo y derecho de la válvula aórtica durante la septación del tracto de salida cardiaco. En cambio, la VAB tipo B resulta en muchos casos de la formación

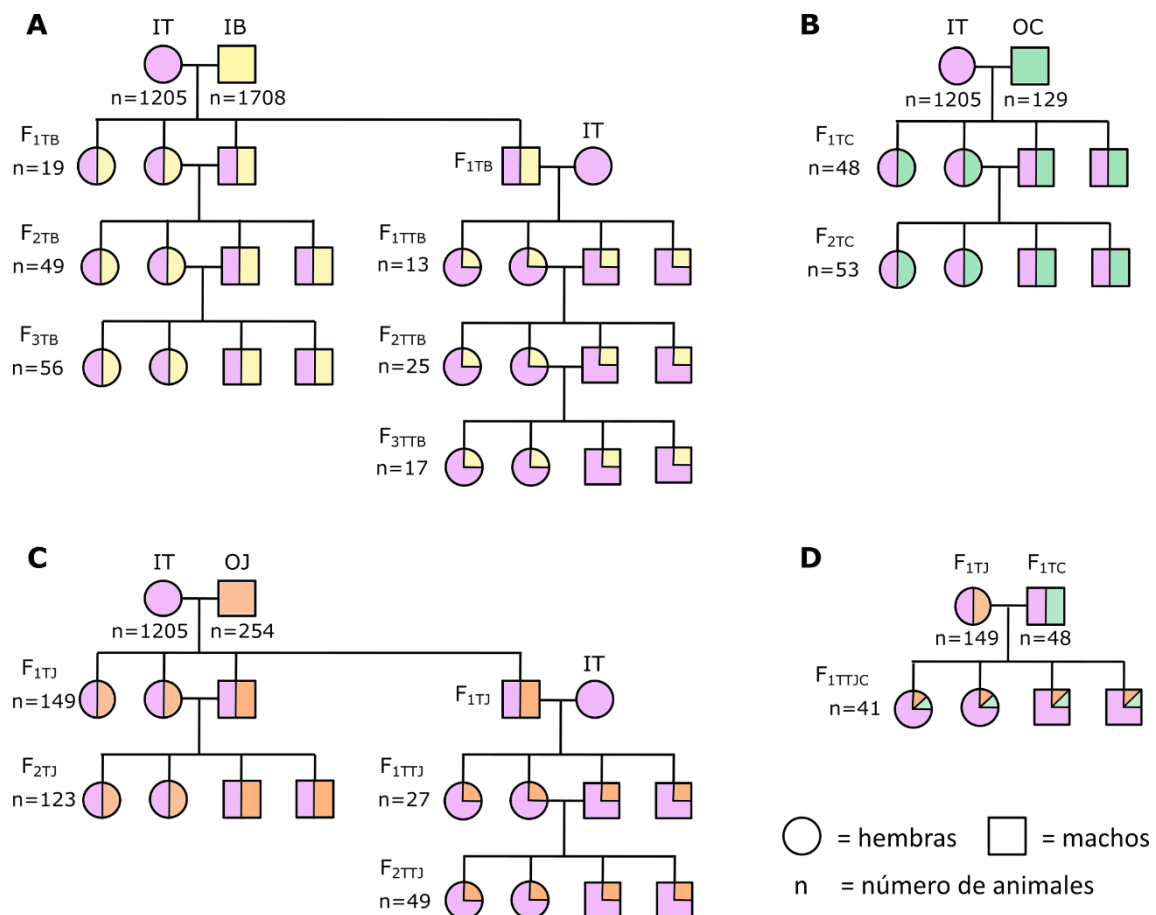
anómala de los cojines endocárdicos, durante estadios previos a la septación conotruncal, debido también a alteraciones en el proceso de TEM. Por lo tanto, cabe hipotetizar que una mutación en un gen involucrado en el proceso de TEM o en la migración de la CNC puede dar lugar a VAB de tipo A o B, dependiendo de factores genéticos, epigenéticos o ambientales que condicionan la etapa concreta del desarrollo cardiaco en el que se produce la alteración, es decir, durante la formación de los cojines endocárdicos, o más tarde, durante la septación conotruncal. Esta hipótesis parece ser consistente, puesto que ratones mutantes condicionales para los genes *Jagged* y *Notch* desarrollan VAB de tipo A y B (MacGrogan et al., 2016). Se ha demostrado que la vía de señalización de NOTCH está implicada tanto en el proceso de TEM (McBride et al., 2008; Luna-Zurita et al., 2010; Blaser et al., 2017), como en la migración de las células de la CNC (High et al., 2007, 2009; MacGrogan et al., 2016), lo que la convierte en la principal vía de señalización candidata a ser responsable de la formación de los distintos tipos de VAB.

Como se ha comentado anteriormente en este apartado, el modelo hámster con VAB probablemente porta una o varias mutaciones o variantes genéticas que conducen al desarrollo de VAB específicamente del tipo A. Según la hipótesis que se acaba de plantear, cabe interpretar que estas mutaciones o variantes afectan específicamente a las células de la CNC responsables de la septación del tracto de salida cardiaco, resultando en una excesiva fusión de las crestas conotruncales y VAB tipo A. Sin embargo, no se puede descartar que los animales de este modelo porten mutaciones o variantes genéticas que afecten al proceso de TEM, junto con alelos moduladores que permitan el desarrollo normal de los cojines endocárdicos.

Las alteraciones del proceso de TEM afectarían exclusivamente a la fusión de las crestas conotruncales, dando lugar en todos los casos a VAB tipo A, aunque la mutación causal no sea específica de tipo. De ser este el caso, sería previsible que híbridos de la cepa T (con alelos causales de VAB y alelos modificadores de tipo A) y cepas control (con alelos salvajes) desarrollaran VAB tipo B, en aquellos casos en los que se seleccionen los alelos causales de VAB junto con alelos salvajes que permitiesen el desarrollo de alteraciones en la formación de los cojines endocárdicos.

Con el fin de testar esta hipótesis, tras la publicación del presente artículo se llevó a cabo un estudio con el objetivo de determinar qué tipos de VAB aparecían en distintas cepas híbridas de hámster. Para ello, se diseñó una estrategia de cruzamientos que permitiera mezclar los diferentes fondos genéticos de cuatro cepas ya empleadas en esta publicación (IT, IB, OC, OJ) (**Figura 12**). Dicha estrategia consistió en llevar a cabo los siguientes cruzamientos: 1) animales de dos cepas *inbred* (IT e IB) que contienen el genotipo de predisposición a VAB y dos fondos genéticos altamente homoalélicos, 2) animales de la cepa *inbred* IT con animales de dos cepas *outbred* con baja (OC) o nula (OJ) incidencia de VAB y un fondo genético predominantemente heterocigótico, 3) animales resultantes de cruzar individuos híbridos de las cepas IT y OC o OJ (TC y TJ). Se generaron entre dos y tres generaciones filiales (F1 – F3) de seis poblaciones de híbridos diferentes (TB, TTB, TC, TJ, TTJ, TTJC). Así se consiguió mezclar la mutación o mutaciones que predisponen al desarrollo de VAB con cuatro fondos genéticos diferentes, dos *inbred* y dos *outbred*, asegurando una alta variabilidad alélica acompañando al alelo o alelos causales. La obtención de varias generaciones filiales permite que el genotipo asociado a VAB esté

contenido en fondos genéticos heterogéneos, con alelos homocigotos y heterocigotos, de un mismo *pool* genético híbrido. El número total de animales empleados para cada cepa y generación se muestra en la **Figura 12** y en la **Tabla 1**.



**Figura 12.** Estrategia de cruzamientos realizados para la obtención de hamsters híbridos TB y TTB (A), TC (B), TJ y TTJ (C), y TTJC (D). F1: primera generación filial; F2: segunda generación filial; F3: tercera generación filial.

Los resultados (**Tabla 1**) mostraron que, como ya se indicaba en esta publicación, las cepas parentales *inbred* IT e IB mostraban VAB tipo A con diferentes incidencias, siendo mucho mayor en la cepa IT (27.9%) que en la IB (4.9%). Además, en ambas cepas se encontraron VAB de tipo B, aunque de manera incidental, con incidencias muy bajas en comparación con la VAB

tipo A (cepa IT: 0.08%, cepa IB: 0.06%). En cuanto a la presencia de válvula aórtica cuatricúspide (VAC), solo se detectaron en animales de la cepa IT también en una proporción muy baja (0.4%). Con respecto a las cepas *outbred*, se observó que mientras que en la cepa OJ no se encontraron animales con VAB, la cepa OC mostraba cierta incidencia de VAB tipo A (4.7%). En ningún caso se detectaron VAB de tipo B ni VAC en estas cepas *outbred*. El análisis de las cepas híbridas reveló que la VAB tipo A era el único tipo de VAB presente en todas las poblaciones estudiadas (**Tabla 1**). Además, se encontraron morfotipos valvulares intermedios entre VAT y VAB (**Tabla 1**; diferentes grados de fusión de valvas, VAT-1 y VAT-2; rafes de distintos tamaños, VAB-3 y VAB-4), que resultaron ser muy similares a los ya descritos en las cepas parentales (**Figura 5-10 de la publicación**).

La incidencia de VAB tipo A en la primera generación híbrida TB era similar a la de la cepa parental IB (IT: 27.9%; IB: 4.9%; F1TB: 5.3%), lo que sugiere una gran influencia de alelos recesivos en la expresión del carácter. Como cabría esperar en esta hipotética situación, en la segunda y tercera generaciones híbridas aumentó la incidencia de VAB (F2TB y F3TB: 14.3%). También como cabría esperar, en los híbridos TTB la incidencia de la anomalía aumentó con respecto a los híbridos TB (F1TTB: 15.4%, F2TTB: 20%, F3TTB: 17.6%). En cuanto a los híbridos TC, cuyas cepas parentales son la cepa *inbred* IT, con elevada incidencia de VAB, y la cepa *outbred* OC, con incidencia baja, la incidencia de VAB también resultó ser similar a la de la parental OC (OC: 4.7%; F1TC: 6.25%, F2TC: 5.7%), aunque en este caso, los híbridos de la segunda generación no aumentaron la incidencia de manera significativa. Esto sugiere la existencia de alelos moduladores en la cepa *outbred* que reducen el riesgo de desarrollo de la anomalía.

**Tabla 1.** Incidencia para los diferentes morfotipos valvulares (continuo anatómico) para las líneas de hámsteres empleadas en este estudio.

CEPA	Total	Genotipo	VAT-0	VAT-1	VAT-2	Total VAT	VAB-3	VAB-4	VAB-5	Total VAB-A	VAB-B	VAC
<b>T</b>	1205	IT	58 (4.8%)	442 (36.7%)	363 (30.1%)	863 (71.6%)	123 (10.2%)	69 (5.7%)	144 (12%)	336 (27.9%)	1 (0.08%)	5 (0.4%)
<b>B</b>	1708	IB	335 (19.6%)	976 (57.1%)	313 (18.3%)	1624 (95.1%)	44 (2.6%)	24 (1.4%)	15 (0.9%)	83 (4.9%)	1 (0.06%)	0
<b>OJ</b>	254	OJ	86 (33.9%)	152 (59.8%)	16 (6.3%)	254 (100%)	0	0	0	0	0	0
<b>OC</b>	129	OC	42 (32.6%)	69 (53.5%)	12 (9.3%)	123 (95.4%)	3 (2.3%)	3 (2.3%)	0	6 (4.7%)	0	0
<b>F1TB</b>	19	50%IT 50%IB	10 (52.6%)	6 (31.6%)	2 (10.5%)	18 (94.7%)	0	0	1 (5.3%)	1 (5.3%)	0	0
<b>F2TB</b>	49	50%IT 50%IB	21 (42.9%)	12 (24.5%)	9 (18.4%)	42 (85.7%)	3 (6.1%)	3 (6.1%)	1 (2%)	7 (14.3%)	0	0
<b>F3TB</b>	56	50%IT 50%IB	17 (30.4%)	18 (32.1%)	13 (23.2%)	48 (85.7%)	2 (3.6%)	2 (3.6%)	4 (7.1%)	8 (14.3%)	0	0
<b>F1TTB</b>	13	75%IT 25%IB	2 (15.4%)	4 (30.8%)	5 (38.5%)	11 (84.6%)	2 (15.4%)	0	0	2 (15.4%)	0	0
<b>F2TTB</b>	25	75%IT 25%IB	7 (28%)	6 (24%)	7 (28%)	20 (80%)	2 (8%)	1 (4%)	2 (8%)	5 (20%)	0	0
<b>F3TTB</b>	17	75%IT 25%IB	5 (29.4%)	4 (23.5%)	5 (29.4%)	14 (82.4%)	0	2 (11.8%)	1 (5.9%)	3 (17.6%)	0	0
<b>F1TC</b>	48	50%IT 50%OC	11 (22.9%)	28 (58.3%)	6 (12.5%)	45 (93.8%)	2 (4.2%)	0	1 (2.1%)	3 (6.25%)	0	0
<b>F2TC</b>	53	50%IT 50%OC	7 (13.2%)	27 (50.9%)	16 (30.2%)	50 (94.3%)	1 (1.9%)	1 (1.9%)	1 (1.9%)	3 (5.7%)	0	0
<b>F1TJ</b>	149	50%IT 50%OJ	50 (26.8%)	62 (41.6%)	32 (21.5%)	134 (89.9%)	4 (2.7%)	2 (1.3%)	8 (5.4%)	14 (9.4%)	0	1 (0.7%)
<b>F2TJ</b>	123	50%IT 50%OJ	31 (25.2%)	54 (43.9%)	29 (23.6%)	114 (92.7%)	5 (4.1%)	1 (0.8%)	3 (2.4%)	9 (7.3%)	0	0
<b>F1TTJ</b>	27	75%IT 25%OJ	8 (29.6%)	7 (25.9%)	7 (25.9%)	22 (81.5%)	2 (7.4%)	0	3 (11.1%)	5 (18.5%)	0	0
<b>F2TTJ</b>	49	75%IT 25%OJ	20 (40.8%)	8 (16.3%)	14 (28.6%)	42 (85.7%)	1 (2%)	1 (2%)	5 (10.2%)	7 (14.3%)	0	0
<b>F1TTJC</b>	41	75%IT 12.5%OJ 12.5%OC	3 (7.3%)	15 (36.6%)	14 (34.1%)	32 (78%)	6 (14.6%)	2 (4.9%)	1 (2.4%)	9 (21.9%)	0	0

VAT-0: válvula aórtica tricúspide sin fusión; VAT-1, VAT-2: válvula aórtica tricúspide con fusión; VAB-3, VAB-4: válvula aórtica bicúspide con rafe grande o pequeño; VAB-5: válvula aórtica bicúspide sin rafe; VAC: válvula aórtica cuadrícúspide.

En los animales híbridos TJ, resultantes del cruzamiento de la cepa *inbred* IT y la otra cepa *outbred* OJ (con incidencia nula de VAB), la incidencia de VAB era intermedia con respecto a la de los parentales (F1TJ: 9.4%) y no aumentó en la siguiente generación (F2TJ: 7.3%). Además, la cepa TJ fue la única cepa híbrida que presentó VAC en una incidencia similar a la de la cepa IT (TJ:0.7%; IT: 0.4%). Al igual que ocurría con los animales TTB, los TTJ mostraron un incremento en la incidencia de VAB respecto a la TJ (F1TTJ: 18.5%; F2TTJ: 14.3%) al aumentar la proporción del genotipo de la cepa afecta IT. Por último, los animales TTJC, procedentes del cruzamiento entre híbridos TJ y TC, con la combinación más heterogénea de fondos genéticos (75% IT + 12.5% OJ + 12.5% OC), presentaron una incidencia de VAB cercana a la de la cepa afecta (F1TTJC: 21.9%).

Para interpretar estos resultados es necesario reconsiderar las hipótesis inicialmente propuestas: 1) el modelo hámster podría ser portador de una o varias mutaciones que conducen al desarrollo específico de VAB tipo A, y 2) el modelo hámster podría presentar un conjunto de alelos causales de VAB no específicos de tipo que, junto con otros alelos, condicionarían la aparición de VAB tipo A. Como resultado de la primera hipótesis, cabría esperar que en todos los animales híbridos analizados la VAB tipo A fuese el único morfotipo valvular detectado. En cuanto a la segunda, el cruzamiento entre las distintas cepas parentales podría dar lugar a la segregación de los alelos causales de VAB y los que condicionan el tipo, lo que implicaría una elevada probabilidad de detectar VAB tipo B en los híbridos resultantes. Los resultados de este análisis muestran únicamente VAB de tipo A, lo que permite interpretar que en el modelo hámster participan solo genes implicados en el desarrollo de este tipo específico de VAB.

Puesto que la incidencia de VAB es diferente en cada una de las cepas parentales analizadas, resulta lógico que esta variabilidad se mantenga en las líneas híbridas generadas, tal y como reflejan los resultados obtenidos en este estudio. Esta variabilidad apunta a la existencia de alelos modificadores que afectan a la incidencia de aparición de la anomalía en los híbridos. Además, los resultados muestran una reducción de la incidencia de VAB en la F1 de todas las poblaciones híbridas estudiadas. Curiosamente, en generaciones filiales posteriores (F2-F3) esta incidencia se mantenía en unos casos o se veía incrementada en otros. Se puede interpretar que los fondos genéticos de las cepas parentales presentan distintas combinaciones de alelos modificadores que influyen en la penetrancia del carácter en cada una de las cepas híbridas.

Por último, el estudio anatómico detallado de las válvulas determinó la presencia de los diferentes morfotipos que constituyen el continuo anatómico de la válvula aórtica del hámster en distintas proporciones para cada cepa híbrida. Esto parece indicar que las diferentes combinaciones de alelos modificadores que se dan en las cepas híbridas afectan no solo a la incidencia del carácter, sino también a su grado de expresividad. Sin embargo, puesto que solo se han detectado VAB de tipo A se puede concluir que estos alelos modificadores no afectan al tipo de VAB.

En definitiva, los datos de este estudio permiten concluir que el modelo hámster (cepa T) porta mutaciones o variantes genéticas que afectan de manera específica a los procesos morfogenéticos implicados en el desarrollo de la VAB tipo A. Además, existen alelos modificadores que modulan tanto la penetrancia como el grado de expresividad del carácter, pero no condicionan la aparición de distintos tipos de VAB. Por lo tanto, los genes modificadores

solo actúan sobre los mecanismos morfogenéticos que dan lugar a la VAB tipo A.

Tal y como se explica en las Publicaciones 1 y 2, la VAB tipo A se debe a una migración defectuosa de las células de la CNC durante el proceso de septación conotruncal, dando lugar a la extra-fusión de las crestas conotruncales durante la formación de los primordios valvulares. Sin embargo, la VAB tipo B se debe en la mayoría de los casos a un defecto en la TEM implicada en la formación de estas crestas, un evento que tiene lugar con anterioridad al proceso de septación (*Fernández et al., 2009*). Teniendo esto en cuenta, y considerando que en el hámster sirio se detectaron únicamente VAB de tipo A, se puede interpretar que los alelos causales presentes en este modelo afectan al comportamiento de la CNC y/o a la TEM implicada en la fusión de las crestas conotruncales, pero no al proceso de TEM necesario para la formación de los cojines. De hecho, puesto que la formación de estos cojines parece no verse afectada, se puede inferir que los genes causales de la anomalía no alteran el proceso celular de la TEM en sí, sino que actúan específicamente sobre las células de la CNC y los procesos morfogenéticos que estas regulan. Debido a que estas células son las responsables de regular la TEM necesaria para que se dé la fusión de las crestas conotruncales, las mutaciones presentes en el modelo hámster podrían alterar no solo la distribución de las células de la CNC durante la formación de la válvula, sino también la comunicación necesaria entre estas células y las del endocardio para inducir la fusión. Como ya se mencionó anteriormente, se ha descrito en la literatura que el gen *Notch1* está implicado en la formación de VAB tanto en modelos animales (*Wang et al., 2015, MacGrogan et al. 2016*) como en pacientes (*Garg et al., 2005*).

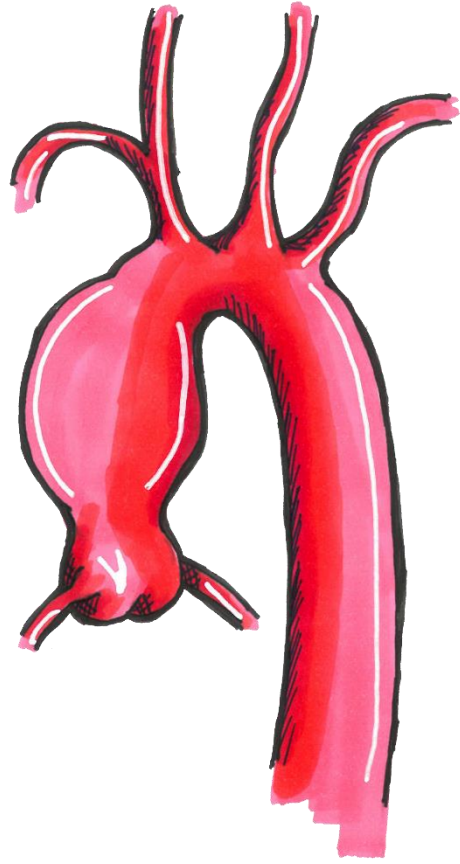
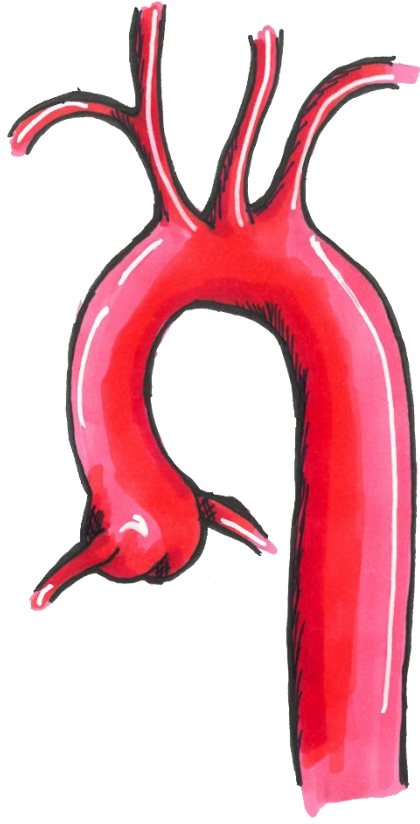
Alteraciones en esta vía de señalización dan lugar a una distribución anómala de las células de la CNC durante la formación del complejo de septación aórtico-pulmonar (*MacGrogan et al., 2016*). Además, la vía de señalización de NOTCH se ha relacionado con la regulación del inicio del proceso de TEM (*Timmerman et al., 2004; Chang et al., 2011*). Considerando que esta vía es conocida por su implicación en la comunicación célula-célula (*Bigas & Espinosa, 2016*), se puede proponer a *Notch1* como un gen clave en el desarrollo de los distintos tipos de VAB.

En cuanto a la existencia de alelos modificadores, resulta interesante que participen en la regulación del grado de expresividad del carácter, que se traduce en el desarrollo de diferentes morfotipos valvulares que constituyen todo un continuo anatómico (esto es, VAT con diferentes grados de fusión y VAB con rafes de diferente tamaño). La presencia de estos morfotipos valvulares intermedios, con diferentes proporciones entre las poblaciones híbridas analizadas, parece indicar que los alelos modificadores actúan durante el proceso de excavación de las válvulas, un evento que tiene lugar tras el proceso de septación conotruncal (valvulogénesis tardía). Como ya se expuso en la Publicación 2, las células de la CNC también tienen un papel relevante durante este proceso, ya que regulan la diferenciación y apoptosis de las células mesenquimática que constituyen el cojín valvular, así como la producción de matriz extracelular durante el remodelado de las válvulas (*Schussler et al., 2020; Aikawa et al., 2006; Hinton & Yutzey, 2011; Jain et al., 2011*). Se ha descrito que una alteración en la distribución de estas células en las válvulas en formación da lugar a una producción defectuosa de matriz extracelular, lo que resulta en distintos grados de fusión de las valvas (*Jain et al., 2011; Dupuis et al., 2013; Toomer et al., 2017; Odelin et al.,*

2018). Curiosamente, *Notch1* también es un buen candidato en este proceso, ya que su manipulación genética resulta en defectos en la proliferación y/o apoptosis de las células mesenquimáticas, dando lugar a un remodelado (excavación) anormal de los cojines (*Jain et al., 2011; Wang et al., 2015*).



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo VI

## Publicación 4

### **Experimental evidence of the genetic hypothesis on the etiology of bicuspid aortic valve aortopathy in the hamster model**

María Teresa Soto-Navarrete, Bárbara Pozo-Vilumbrales, Miguel Ángel López-Unzu, Carmen Rueda-Martínez, M. Carmen Fernández, Ana Carmen Durán, Francisco Javier Pavón-Morón, Jorge Rodríguez-Capitán, Borja Fernández

*Frontiers in Cardiovascular Medicine, (2022) 2153.*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Como se indica en la introducción, se han propuesto dos hipótesis que explican la etiología de la aortopatía bicúspide: la hipótesis hemodinámica, que establece que la morfología de la VAB altera la dirección del flujo sanguíneo, lo que termina ocasionando la degeneración de la pared arterial, y la hipótesis genética, que propone que el defecto morfogénico que conduce al desarrollo de la VAB también altera la estructura histológica de la aorta ascendente, predisponiendo a la dilatación (*Girdauskas et al., 2011; Michelena et al., 2021*). Sin embargo, hasta el momento no se han obtenido evidencias empíricas que apoyen la hipótesis genética, debido a la dificultad que supone el estudio de poblaciones humanas, ya que son genéticamente heterogéneas y muestran diferentes presentaciones clínicas probablemente asociadas a distintas etiologías de enfermedad.

Aunque se han desarrollado numerosos modelos murinos modificados genéticamente para el estudio de la VAB, analizados y revisados en las Publicaciones 2 y 3 de la presente tesis, actualmente no existen modelos animales que repliquen adecuadamente la patología aórtica humana (necrosis cística de la media) y que permitan profundizar en la etiopatogénesis de la enfermedad. La cepa T de hámster sirio es el único modelo animal espontáneo de VAB tipo A (*Sans-Coma et al., 1993, 1996, 2012; Fernández et al., 2009*), el morfotipo valvular más común en pacientes afectados (*Basso et al., 2004; Russo et al., 2008*). Sin embargo, no se han identificado dilataciones conspicuas de la aorta ascendente en los individuos pertenecientes a esta cepa, tras el estudio anatómico detallado de animales jóvenes, adultos y senescentes. Por otra parte, se desconoce si las aortas de los hámsteres con VAB de la cepa T presentan alguna alteración a nivel molecular y/o estructural que no progrese a DA debido a factores intrínsecos a la cepa (genes

moduladores o factores epigenéticos) o a diferencias interespecíficas con la especie humana. La detección de tales alteraciones en especímenes pertenecientes a la cepa T, independientemente de su morfotipo valvular, respecto a una cepa control con incidencia nula de VAB, constituiría una importante evidencia experimental directa en apoyo de la hipótesis genética. Por el contrario, la presencia de alteraciones de manera diferencial entre morfotipos valvulares (VAT vs. VAB), independientemente de la cepa, indicaría que los factores hemodinámicos son los de mayor relevancia.

Considerando estas hipótesis de partida, el objetivo de este trabajo consistió en la búsqueda de posibles alteraciones moleculares y estructurales en la aorta ascendente de animales del modelo hámster que pudiesen validar a la cepa T, con alta incidencia de VAB, como modelo animal de predisposición a aortopatía bicúspide. Para ello, se examinó la anatomía e histomorfología de la aorta ascendente de estos animales, así como el nivel de expresión de varios genes (*Fbn1*, *Fbn2*, *Tgf- $\beta$* , *Mmp2*, *Mmp9* y eNOS) implicados en la patogénesis de la dilatación aórtica humana, comparando animales genéticamente homogéneos con VAB y VAT de la cepa T, y animales con VAT de una cepa control *outbred* con incidencia nula de VAB.

## Resultados y discusión

En la cohorte de animales de la cepa T estudiados, se encontró VAB tipo A en el 42.4% de los especímenes analizados (**Figura 1 de la publicación**).

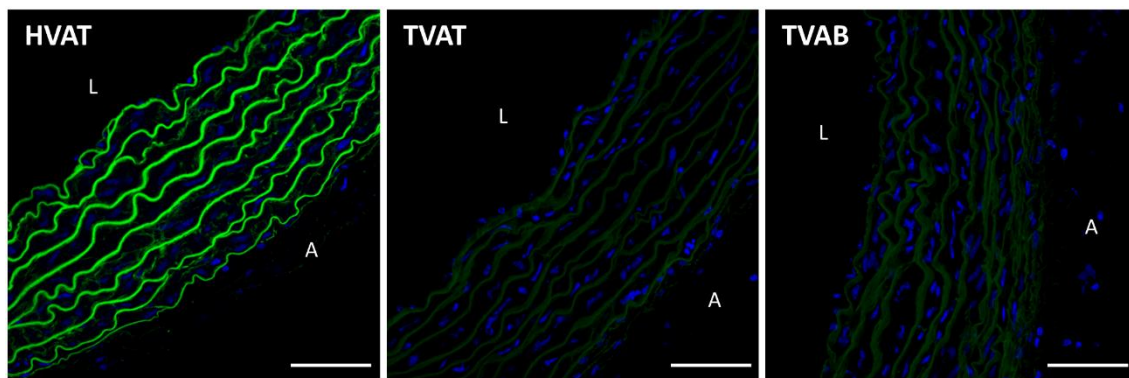
Aunque no se detectaron aneurismas ni dilataciones aparentes de la aorta ascendente, los hámsteres de la cepa T, tanto con VAT como con VAB, presentaban un mayor diámetro aórtico comparados con los animales de la

cepa control (**Figura 1 de la publicación**). Además, se detectaron alteraciones en la estructura de la aorta a nivel histológico, así como en perfiles de expresión génica conocidos por ser relevantes para la patogénesis de la dilatación aórtica humana.

Las alteraciones histomorfológicas detectadas consisten en apoptosis de las células musculares lisas (**Figura 2 de la publicación**) y lamelas elásticas excesivamente onduladas (**Figura 3 de la publicación**), ambas especialmente acentuadas en la región convexa de la aorta ascendente. En ningún caso se detectó fragmentación de las láminas elásticas. En cuanto a las alteraciones moleculares, se halló una reducción de la abundancia de eNOS en la media aórtica (**Figura 4 de la publicación**) y un aumento de la expresión de *Tgf- $\beta$*  y *Fbn-2* (**Figura 5 de la publicación**).

Posteriormente a la publicación de estos resultados, se llevó a cabo un ensayo *ex vivo* con 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA), una sustancia que se transforma en un compuesto fluorescente (triazolofluoresceína, DAF-2T) en presencia de óxido nítrico (NO). El objetivo fue validar la disminución en la expresión de eNOS en los animales de la cepa T y comprobar su efecto, es decir, la reducción en la producción de NO. Para ello, se disecaron las aortas ascendentes de hámsteres pertenecientes a la cepa control (HVAT, n=5) y a la cepa afectada, tanto con VAT (TVAT, n=4) como con VAB (TVAB, n=3). Se incubaron en DAF-2DA 10 $\mu$ M (Sigma-Aldrich, Ref: D2321-1MG) diluido en tampón Tyrode (NaHCO<sub>3</sub> 10 mmol/L, NaCl 158 mmol/L, KCl 4 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.05 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.42 mmol/L y glucosa 5.6 mmol/L) durante 12 horas a 37°C en oscuridad. Los controles negativos se incubaron solo en tampón Tyrode. A continuación, las muestras se fijaron en paraformaldehído 4% diluido en PBS durante toda la

noche y se embebieron en OCT para su procesamiento en criostato (Leica CM3050S). Se obtuvieron secciones transversales de ocho  $\mu\text{m}$  de la aorta ascendente y se tiñeron los núcleos con DAPI. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica SP8. Debido a la autofluorescencia de las lamelas aórticas, la fluorescencia del control negativo se tomó como base de referencia. Los resultados de este experimento permitieron constatar un descenso drástico en la producción de NO concordante con la reducción de eNOS en los animales de la cepa T, tanto con VAT como con VAB (**Figura 13**).



**Figura 13.** Expresión de NO en la aorta ascendente de hámsteres de la cepa control (HVAT) y de la cepa afecta con VAT (TVAT) y VAB (TVAB) tras la incubación con DAF-2DA (verde). La señal se concentra en las láminas elásticas de los animales de la cepa control (HVAT), mientras que los animales de la cepa T tanto con VAT (TVAT) como con VAB (TVAB) muestran una fuerte reducción de la fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Todas las secciones fueron evaluadas con la misma intensidad de láser (488: 3.79%) y ganancia (330.4V) para evitar un exceso de exposición. L: lumen, A: adventicia. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Así pues, todas las alteraciones descritas, tanto histológicas como moleculares, aparecieron en animales de la cepa T, independientemente de la morfología valvular. Dado que la aortopatía bicúspide en humanos se caracteriza por degeneración regional de la media (mayor afectación de la región convexa), incluyendo alteración de las fibras elásticas e incremento de la apoptosis, así como desregulación de vías de señalización específicas tales

como eNOS, TGF- $\beta$  y FBN, se propone que la cepa T de hámsteres constituye un modelo animal de predisposición a aortopatía bicúspide.

Aunque la fragmentación de las láminas elásticas es una de las características más representativas de la necrosis cística de la media, no se detectaron signos de fragmentación elástica en los hámsteres. En cambio, se observó que las láminas elásticas eran más onduladas en los animales de la cepa T, lo que resulta interesante puesto que se trata de una característica descrita en pacientes con síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV (*Dunmore & Roach, 1990*). Brevemente, el síndrome de Ehlers-Danlos engloba un grupo heterogéneo de desórdenes del tejido conectivo, de entre los cuales el tipo IV es el que tiene peor prognosis. Se origina por un defecto en la expresión de colágeno tipo III y, entre otras características, muestra alteraciones de las grandes arterias que pueden llevar a dilatación e incluso a la rotura de la arteria (*Parapia & Jackson, 2008*).

Por otro lado, la apoptosis es otro de los rasgos distintivos descritos en la necrosis cística de la media (*Niwa et al., 2001; Fedak et al., 2002; Tadros et al., 2009; Michelena et al., 2021*). Por ello, la alta incidencia de apoptosis de células musculares lisas en la convexidad aórtica de los animales de la cepa T, independientemente del morfotipo valvular, resulta particularmente reveladora. Sin embargo, puesto que no se detectaron dilataciones conspicuas de la aorta ascendente, el análisis conjunto de las alteraciones estructurales encontradas indica que la cepa T de hámster podría representar un estadio temprano de la patogénesis de la dilatación aórtica asociada a la VAB.

En cuanto a las alteraciones moleculares asociadas a la aortopatía, se han descrito anomalías en el contenido de FBN-1 en la media aórtica en pacientes con VAB y pacientes sometidos a cirugía aórtica. Las fibrilinas son proteínas de unión a calcio que constituyen el componente estructural de las microfibrillas de la matriz extracelular vascular. Tanto FBN-1 como FBN-2 están íntimamente relacionadas con las fibras elásticas e intervienen en su proceso de ensamblaje (*Sakai et al., 1991*). Además, participan en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos mediante la regulación de vías de señalización que implican factores de crecimiento como BMP, GDF o TGF- $\beta$  (*Nistala et al., 2010; Jensen & Handford, 2016*), merced a su afinidad por estas proteínas, a las que mantiene secuestradas en la matriz.

Históricamente, FBN-1 ha recibido mucha más atención que FBN-2 en el contexto de la VAB. Esto se debe a que el síndrome de Marfan, un trastorno del tejido conectivo causado por mutaciones en el gen de FBN-1, va frecuentemente acompañado de VAB y dilatación aórtica (*Dietz & Pyeritz, 1995; Grewal & Gittenberger-de Groot, 2018*). Además, recientemente se ha demostrado que algunos pacientes con VAB aislada no sindrómica también presentan mutaciones en *FBN-1* (*Pepe et al., 2014*). Se ha propuesto que un depósito defectuoso de FBN-1 en la media aórtica podría ser un agente inductor temprano de la aortopatía, responsable de la desconexión y muerte de las células musculares lisas (*Fedak et al., 2003; Tadros et al., 2009; Rueda-Martínez et al., 2017*). Sin embargo, poco se sabe sobre el papel de FBN-2 en el desarrollo del aneurisma y la enfermedad de la VAB, aunque existen evidencias que indican que también está implicada en el proceso, ya que se ha detectado un incremento de *FBN-2* a nivel transcripcional en pacientes con VAB y dilatación aórtica (*Rueda-Martínez et al., 2017*). En

nuestro modelo hámster, se encontró un incremento significativo de los niveles de expresión de *Fbn-2*, dando lugar a una alteración del ratio de expresión *Fbn-1/Fbn-2*. Es posible que en la aorta del hámster la sobreexpresión de *Fbn-2* con respecto a *Fbn-1* altere la arquitectura de las microfibrillas, causando degeneración de la matriz, desconexión de las células musculares lisas y apoptosis.

Aunque tanto FBN-1 como FBN-2 forman parte de las microfibrillas de la matriz vascular, FBN-1 constituye la principal isoforma adulta, mientras que FBN-2 se expresa normalmente durante el desarrollo embrionario (*Carta et al., 2006*). El hecho de que FBN-2 sea la principal isoforma en la media aórtica embrionaria y aumente su expresión en la aorta adulta que dilata, tiene especial relevancia en el contexto de la aortopatía bicúspide. Durante la vida embrionaria, FBN-2 tiene un papel importante no solo en la formación de las lamelas elásticas de la aorta, sino también en la formación y septación del tracto de salida cardiaco. FBN-2 está implicada en el mecanismo de TEM (*Rongish et al., 1998; Waldo et al., 1999b*), responsable tanto de la formación como de la fusión de las crestas conotruncales. Como se ha discutido en las Publicaciones 1 y 2 de la presente tesis, alteraciones en el mecanismo de TEM que opera tanto en la formación como en la septación del tracto de salida cardiaco pueden dar lugar a distintos tipos de VAB. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que una expresión defectuosa de *Fbn*, particularmente de la *Fbn-2*, puede ser un inductor temprano del desarrollo tanto de la VAB como de la estructura anormal de la aorta.

La vía de señalización de TGF- $\beta$  regula diversos procesos celulares que ocurren tanto en el sistema cardiovascular adulto como durante su desarrollo embrionario. Uno de los principales procesos que regula es el mantenimiento

de la homeostasis de la matriz extracelular vascular. La señalización ocurre de manera específica mediante múltiples mecanismos que operan tanto dentro como fuera de la célula. La matriz extracelular actúa como reservorio de los ligandos TGF- $\beta$  necesarios para la activación de la vía, por lo que el control extracelular de la señalización endógena es un aspecto importante para la homeostasis de la matriz. Existen diversas moléculas extracelulares, muchas de las cuales interaccionan con FBN-1 y 2, que junto a receptores de integrinas están implicadas en la liberación de los ligandos de TGF- $\beta$  de la matriz extracelular (*Nistala et al., 2010*). Asimismo, parece ser que TGF- $\beta$  es una molécula clave en la regulación de la expresión de *Fbn* (*Isogai et al., 2003*). Una característica común de los aneurismas sintomáticos, incluyendo la enfermedad de la VAB, parece ser la desregulación de la señalización de TGF- $\beta$ . Esta desregulación podría ser causada por alteraciones en el contenido y composición en FBN de la media aórtica (*Neptune et al., 2003; Ruddy et al., 2009*). En el modelo hámster, los niveles de expresión de *Tgf- $\beta$*  eran significativamente más elevados en la pared aórtica, independientemente de la morfología de la válvula aórtica. Estos datos apoyan la hipótesis de que la vía de señalización de TGF- $\beta$  a través de FBN es un desencadenante temprano de las alteraciones de la pared aórtica.

Otra proteína que juega un papel importante en la regulación de la homeostasis es eNOS. Se trata de una enzima expresada tanto por las células endoteliales de la íntima como por las células musculares lisas de la media aórtica (*Buchwalow et al., 2002; Fleming, 2010*). Su función principal es la síntesis de NO, una molécula crucial en la regulación de la vasodilatación, que se sintetiza en respuesta a estímulos hemodinámicos ejercidos por el flujo sanguíneo (*shear stress* o estrés de cizallamiento) (*Fleming, 2010*). Se cree

que la desregulación de eNOS y, por tanto, la producción anormal de NO en la pared aórtica tiene un papel central en la formación del aneurisma (Mohamed et al., 2012; Henn et al., 2014). Los pacientes con dilatación aórtica muestran alteraciones en los niveles de expresión de la proteína eNOS en áreas específicas de la aorta aneurismática. Se sabe que eNOS se sobreexpresa en respuesta a un elevado estrés de cizallamiento generado por el flujo sanguíneo, aunque no está claro en qué medida el incremento de la expresión de eNOS en la pared aórtica de los pacientes con VAB es debida a alteraciones hemodinámicas, causadas por la morfología de la VAB, o a defectos congénitos (Ruddy et al., 2009; Mohamed et al., 2012; Henn et al., 2014). Nuestros resultados en el modelo hámster indican que la expresión de la proteína eNOS se encuentra significativamente reducida en la media aórtica, especialmente en la región convexa de los animales de la cepa T, independientemente de la morfología de la válvula aórtica. Esto sugiere que la desregulación de eNOS es una característica intrínseca del defecto de la pared de la aorta asociado a la VAB, y no una consecuencia de la alteración hemodinámica. Estos resultados concuerdan con estudios recientes en pacientes que apuntan a que la desregulación de eNOS ocurre independientemente de la dilatación y sugiere que estos cambios son el resultado de un factor genético subyacente, en lugar de una hemodinámica alterada (Gauer et al., 2020).

Por último, las MMPs son una superfamilia de proteasas de tipo metzincina con actividad altamente regulada. Contienen un residuo de metionina en su sitio activo y utilizan zinc para llevar a cabo la reacción enzimática. Son responsables de la degradación de la matriz extracelular durante procesos de remodelado de los tejidos (de Almeida et al., 2022). Se ha demostrado que

las MMPs están implicadas en la patogénesis de la dilatación aórtica, puesto que incrementan su actividad en la media aórtica de pacientes con aneurisma. Parece ser que las alteraciones homeostáticas de la matriz extracelular debido a la desregulación de la vía de señalización de TGF- $\beta$  son mediadas por la activación de MMPs, las cuales tienen un papel central en la degradación de la matriz extracelular que conduce a la aortopatía (*Segura et al., 1998; Fedak et al., 2003; LeMaire et al., 2005*). Sin embargo, se han descrito diferencias en cuanto al tipo de MMP que se expresa en función de la región de la aorta afectada: mientras que MMP-9 parece estar ligada al desarrollo del aneurisma de la aorta abdominal asociado a lesiones ateroscleróticas, MMP-2 se sobreexpresa específicamente en la aorta ascendente de los pacientes con VAB (*Segura et al., 1998; LeMaire et al., 2005*). Los resultados en la aorta de hámsteres muestran que la expresión de *Mmp-9* incrementa con la edad, aunque las diferencias solo fueron significativas para los animales TVAT. El análisis conjunto de todos los grupos de estudio determinó que la expresión no cambiaba significativamente de acuerdo a la cepa o a la morfología de la válvula aórtica. Sin embargo, la expresión de *Mmp-2* se ve reducida significativamente en la aorta de animales con VAB, independientemente de la edad. Este cambio en la expresión de *Mmp-2*, contradictorio respecto a la situación en pacientes, sugiere la existencia de diferencias interespecíficas en la homeostasis de la matriz extracelular. Bien podría ser que la reducción de MMP-2 en la aorta de los hámsteres con VAB actúe como un factor protector, siendo responsable de la falta de progresión de la aortopatía en este modelo.

Actualmente, aún se debate si el vínculo etiológico entre la VAB y la dilatación aórtica humana es el resultado de una hemodinámica alterada o de un defecto genético subyacente, si bien la mayoría de las investigaciones

favorecen la combinación de ambos factores etiológicos (*Padang et al., 2013; Prakash et al., 2014; Sophocleous et al., 2018; Michelena et al., 2020*). Aunque existen evidencias que apoyan la hipótesis genética, ninguna de ellas sirve como demostración directa o empírica (*Prakash et al., 2014; Jiao et al., 2016*). En el presente estudio, las diferencias cuantitativas y cualitativas, tanto morfológicas como moleculares, para todos los parámetros estudiados se obtuvieron al comparar animales de dos cepas con diferentes fondos genéticos, pero no al comparar animales genéticamente uniformes con VAT y VAB de la cepa T. Estos resultados indican que, en este modelo, un genotipo específico de cepa causa una alteración estructural de la pared de la aorta ascendente junto a una anomalía valvular (VAB) con baja penetrancia, señalando a una causalidad genética y excluyendo la participación de factores hemodinámicos. Así, los resultados de este estudio constituyen evidencias experimentales directas que demuestran un vínculo genético entre anomalías estructurales de la válvula aórtica y la aorta ascendente en un modelo espontáneo de VAB.

La predisposición conjunta a VAB y aortopatía podría venir determinada por un defecto morfogenético común que ocurre durante el desarrollo embrionario. La VAB tipo A, que constituye el único tipo de VAB detectado en el modelo hámster (resultados de la Publicación 3), resulta de un comportamiento defectuoso de las células de la CNC que colonizan el tracto de salida cardiaco embrionario, tal y como se detalla en las Publicaciones 1 y 2 de esta tesis. Las células de la CNC, además de participar en la formación de las válvulas semilunares, dan lugar a parte de las células musculares lisas que componen la pared de los troncos arteriales intrapericárdicos (*Majesky, 2007; Cheung et al., 2012; Pfaltzgraff et al., 2014; Plein et al., 2015*). De

acuerdo con los resultados del presente trabajo, las células anómalas de la CNC podrían causar un defecto estructural en la aorta ascendente junto con un fenotipo valvular anómalo (VAB) con baja penetrancia, convirtiendo a la cepa T de hámster en el primer modelo animal de predisposición a aortopatía bicúspide.

A día de hoy, solo se han descrito dos modelos animales aparentemente válidos para el estudio de la aortopatía asociada a la VAB. Estos modelos consisten en dos cepas de ratón de laboratorio deficientes para *eNOS* y *ROBO4* (Gould et al., 2019; Peterson et al., 2020). Según Peterson et al., 2020, la falta de *eNOS* altera la distribución de las células de la CNC en la aorta ascendente durante el desarrollo embrionario. Esto conlleva una reducción del número de células musculares lisas derivadas de la CNC en la aorta adulta, dando lugar a una formación defectuosa de las fibras elásticas que conduce a dilatación y disección aórtica. Con respecto a los ratones deficientes para *ROBO4*, Gould et al. 2019 describieron dilataciones tanto de la raíz aórtica como de la aorta ascendente asociadas a la VAB.

A pesar de que se han descrito modelos de ratón con modificaciones genéticas en 28 genes que dan lugar a VAB, revisados en las Publicaciones 2 y 3 de esta tesis, solo mutaciones para dos de estos genes incluyen a la aortopatía como único fenotipo cardíaco alterado. El resto de las cepas transgénicas muestran malformaciones cardiovasculares adicionales asociadas a la modificación genética. Se puede decir que estos modelos no replican la enfermedad de la VAB, sino condiciones sindrómicas que incluyen a la VAB en su fenotipo. La cepa T de hámster constituye el único modelo espontáneo de VAB no sindrómica descrito hasta el momento. Aunque la VAB se hereda en este modelo (Sans-Coma et al., 1993, 2012), se desconocen

los reguladores genéticos que podrían estar implicados en su desarrollo. Se trata de un carácter poligénico, con penetrancia incompleta y expresividad variable tanto en el hombre (*Huntington et al., 1997; Cripe et al., 2004; Ellison et al., 2007; Loscalzo et al., 2007; McBride & Garg, 2011; Robledo et al., 2013*) como en el hámster (*Sans-Coma et al., 1993, 2012*). El hecho de que en la cepa T la VAB aparezca de manera espontánea, y que tanto la anatomía como la herencia sean similares a las descritas en los pacientes, apunta a que el grado de extrapolación de la cepa T al humano es probablemente alto en comparación con los modelos animales modificados genéticamente.

La falta de progresión de la aortopatía en los individuos de la cepa T puede tener diferentes causas. Entre ellas se incluyen la corta esperanza de vida del hámster sirio; diferencias biomecánicas con respecto a los humanos debido al pequeño tamaño de la aorta del hámster; o la existencia de factores genéticos que impiden la progresión de la aortopatía, es decir, alelos protectores que habrían sido seleccionados junto a alelos de predisposición durante la generación de la cepa T. Para testar esta última hipótesis, se realizó un estudio anatómico exploratorio con los animales híbridos incluidos en la Publicación 3 (**Tabla 1 del capítulo correspondiente**). La base lógica de esta estrategia fue segregar, mediante cruzamientos híbridos, los alelos causales de VAB y alteraciones aórticas de los alelos protectores de aortopatía. En ausencia de los alelos protectores, los animales híbridos portadores de alelos causales podrían desarrollar VAB junto a dilatación de la aorta ascendente. Se analizó de manera cualitativa la presencia de dilataciones, aneurismas o cualquier alteración patológica de la aorta ascendente en un total de 3965 hámsteres híbridos. Se encontraron

variaciones entre cepas en cuanto a la incidencia y grado de expresividad (fenotipos intermedios) de la VAB tipo A (**Tabla 1 de la Publicación 3**). Sin embargo, no se detectaron cambios aparentes en el diámetro o anatomía de la aorta ascendente. Estos datos sugieren que la falta de progresión de la aortopatía en el modelo hámster no se debe a la existencia de alelos protectores seleccionados junto a los alelos causales de VAB durante la generación de la cepa T. Aunque la estrategia experimental utilizada no permite descartar por completo la hipótesis de los alelos protectores, todo apunta a que la falta de progresión de la aortopatía en el modelo hámster se debe a diferencias interespecíficas entre el hámster y el hombre.

La penetrancia incompleta del fenotipo VAB no es exclusiva de la especie humana, sino que también se pone de manifiesto en el modelo hámster y en la mayoría de los modelos de ratón mutantes, tal y como se explica en la Publicación 3. La penetrancia de un carácter se refiere a la proporción de individuos con un genotipo específico que expresan el fenotipo correspondiente. Cuando el 100% de los individuos manifiestan el fenotipo en cuestión, se considera que la penetrancia es completa. Sin embargo, cuando esto no ocurre se dice que la penetrancia es incompleta (*Raj et al., 2010; Cooper et al., 2013*). En la especie humana, la penetrancia incompleta de la VAB se pone claramente de manifiesto por la discordancia del fenotipo valvular descrita entre gemelos univitelinos, uno de ellos con VAT y el otro con VAB (*van Engelen et al., 2014*). La penetrancia de un carácter puede verse reducida por factores genéticos, como la existencia de genes moduladores, que suelen interactuar de manera epistática con el gen causal, modulando la expresión del fenotipo; factores epigenéticos; o factores ambientales tales como las denominadas variaciones intangibles o ruido de

desarrollo, definidos como fluctuaciones estocásticas en la expresión de genes durante el desarrollo embrionario, que resultan en cambios fenotípicos incluso cuando los factores genéticos y ambientales no cambian (*Raj et al., 2010; Cooper et al., 2013*). Considerando lo expuesto, resulta evidente que tanto en hámsteres como pacientes existen individuos que presentan el “genotipo bicúspide” y su fenotipo asociado, la VAB, así como individuos con “genotipo bicúspide”, pero con una válvula aórtica normal debido a la penetrancia incompleta del carácter. Cuando estos datos se trasladan al contexto de la aortopatía, es posible inferir que una porción de los pacientes con VAT y dilatación presentan, de hecho, el genotipo bicúspide. Esto implica, por tanto, que deben existir pacientes con aortopatía bicúspide, pero con válvula aórtica tricúspide.

Este paradigma puede ayudar a explicar por qué los mecanismos patogénicos de la aortopatía bicúspide siguen eludiendo las extensas investigaciones de los últimos años, tal y como han alertado especialistas recientemente (*Messner & Bernhard, 2019*). Las estrategias experimentales empleadas en estos estudios se basan normalmente en comparaciones entre muestras de pacientes con VAT y VAB con y sin aortopatía. Esta estrategia, sin embargo, no es capaz de distinguir entre pacientes con VAT y una genética normal, y pacientes con VAT y una genética bicúspide, pero cuya reducida penetrancia respecto a la válvula ha permitido el desarrollo de un fenotipo valvular normal, desarrollando sin embargo la aortopatía.

Nuestros resultados muestran que esta población de pacientes (esto es, aortopatía bicúspide en pacientes con VAT) podría existir. Algunos pacientes con VAT podrían tener una aorta estructuralmente anómala resultante de un genotipo alterado, mostrando el mismo riesgo de desarrollar dilatación

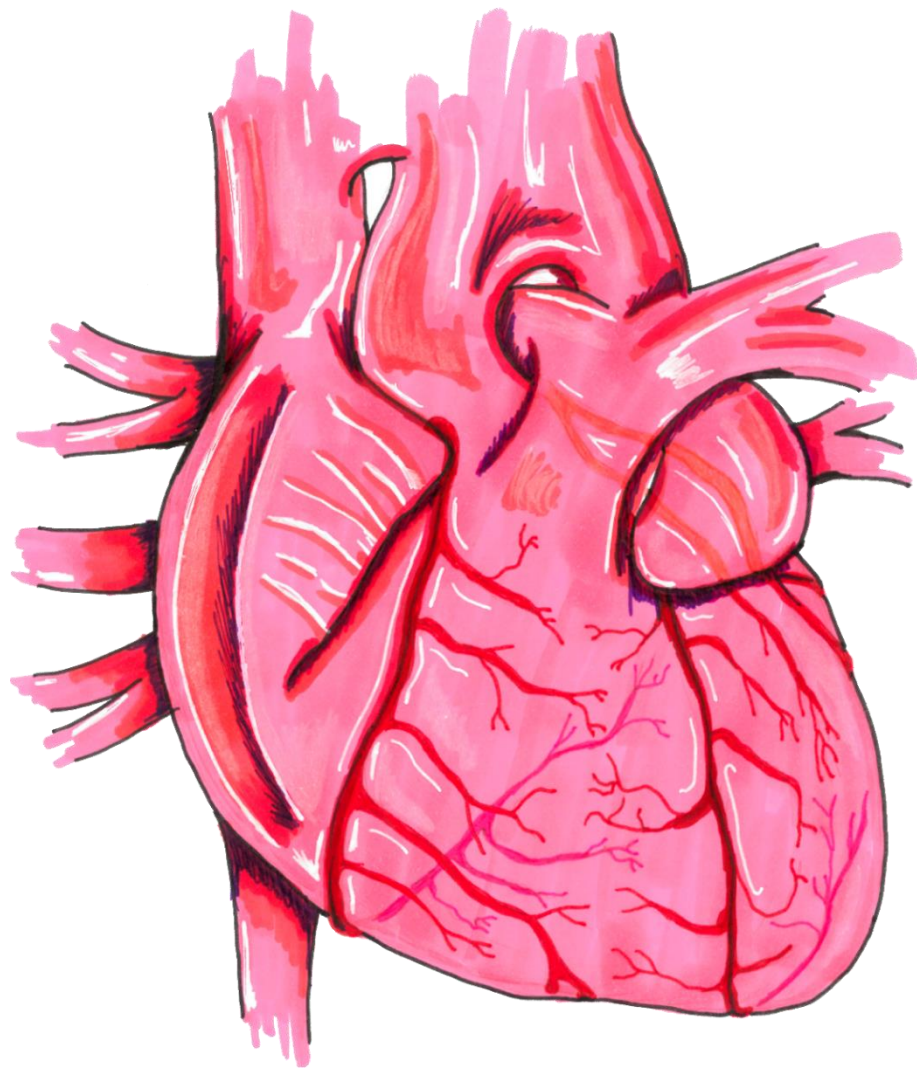
aórtica que un paciente con VAB. Curiosamente, los estudios con pedigrís humanos favorecen la hipótesis de la existencia de pacientes con VAT y predisposición a aortopatía bicúspide, puesto que los parientes de primer grado de pacientes con VAB que poseen una VAT normal muestran mayor riesgo de dilatación aórtica (*Loscalzo et al., 2007; Biner et al., 2009; Galian-Gay et al., 2019*). Esta hipótesis es capaz de explicar por qué la anatomía de la válvula aórtica no puede considerarse un biomarcador predictivo y diagnóstico preciso de aortopatía bicúspide, como se viene planteando desde hace tiempo en el contexto clínico. El defecto genético que confiere la predisposición a la enfermedad no tiene que afectar concordantemente a la morfología de la válvula aórtica y a la estructura de la aorta ascendente. Esta noción debería considerarse cuando se establezcan grupos experimentales de pacientes en estudios que buscan biomarcadores y mecanismos de enfermedad, ya que una muestra de un paciente con VAT podría ser incluida erróneamente en un grupo control, cuando en realidad correspondería a un paciente con alta predisposición.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo VII

## Publicación 5

### **The Bicuspid Condition of the Aortic Valve Does Not Alter the Incidence of Accessory Coronary Artery Ostia in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*)**

M. Carmen Fernández, María Teresa Soto-Navarrete, Ana C. Durán, Valentín Sans-Coma, Borja Fernández

*Journal of Comparative Pathology*, (2019) 166:9-16.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Tal y como se explica en la introducción de la presente tesis, los pacientes con VAB presentan mayor predisposición a mostrar anomalías en el origen de las arterias coronarias que los pacientes con una válvula normal (*Naito et al., 2018*). Estas anomalías, aunque aparecen con una incidencia muy baja, predisponen a isquemia miocárdica y muerte súbita cardiaca, y por ello son de gran relevancia clínica (*Roberts, 1987b; Angelini et al., 1999; Basso et al., 2000*). El grupo de investigación al que pertenece la autora ya demostró durante el siglo pasado la asociación entre la VAB y estas anomalías coronarias utilizando el hámster sirio como modelo animal (*Sans-Coma et al., 1991; Cardo et al., 1994, 1995; Fernández et al., 2000*). Las anomalías que presentaban estos animales consistían en coronaria única, origen anómalo de la arteria coronaria izquierda del tronco pulmonar, y origen anómalo de la arteria coronaria izquierda del seno aórtico no coronario, las cuales resultaron ser muy similares a las descritas en pacientes (*Sans-Coma et al., 1993*). La asociación muy significativa entre VAB y anomalías coronarias en este modelo permitió plantear la hipótesis de que ambas alteraciones tienen un origen etiológico común (*Sans-Coma et al., 1991; Cardo et al., 1994, 1995; Fernández et al., 2000*).

Existen otras alteraciones en el patrón coronario humano, también con baja incidencia, que no suponen un riesgo clínico relevante para los pacientes, por lo que son consideradas meras variantes del patrón coronario normal: los ostia coronarios accesorios o supernumerarios (*Becker, 1981; Angelini, 1989b, 1999; Pérez-Pomares et al. 2016*). Puesto que en el hámster sirio también se ha descrito la presencia de ostia accesorios (*Durán et al., 2007a, 2007b*), cabe preguntarse si la presencia de VAB influye también en la incidencia de esta variante anatómica, lo que permitiría afinar el

planteamiento de la hipótesis sobre una etiología común para patrones anatómicos valvulares y coronarios.

El objetivo de este estudio, por tanto, era profundizar en la hipótesis propuesta sobre el origen etiológico común de la VAB y las alteraciones en el patrón coronario, analizando si la presencia de VAB afecta al número de ostia coronarios que aparecen en el seno aórtico anterior. Para cumplir con este objetivo, se llevaron a cabo análisis retrospectivos y prospectivos de tipo anatómico e histomorfológico de corazones con VAT (datos publicados en *Durán et al., 2007b*) y VAB tipo A (datos nuevos) de hámsteres pertenecientes a la cepa T.

### **Resultados y discusión**

El análisis conjunto de los datos reportados por Durán et al., (2007b) y Fernández et al., (2000) mostraba que en la cepa T de hámster sirio utilizada en este estudio, la incidencia de anomalías congénitas en el origen de las arterias coronarias es significativamente mayor en animales con VAB (56.6%) que en aquellos que presentaban VAT (11.7%) (**Figura 1 de la Publicación**), por lo que estas anomalías coronarias parecen estar estrechamente relacionadas con la VAB desde el punto de vista etiológico. Sin embargo, de acuerdo con los resultados del presente trabajo, aunque se encontraron ostia coronarios accesorios en los individuos con VAB (**Figuras 1 y 2 de la Publicación**), no hay diferencias significativas en cuanto a su incidencia entre los morfotipos valvulares VAT y VAB. Asimismo, no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a la incidencia de orificios accesorios cuando se compararon las regiones derecha e izquierda de la

válvula aórtica para cada condición valvular. No obstante, al analizar conjuntamente las condiciones VAT y VAB, es decir, al analizar toda la población de hámsteres en conjunto, se encontró que la incidencia de los ostia accesorios era significativamente más baja en el lado izquierdo que en el lado derecho de la válvula (**Tablas 1 y 2 de la publicación**). Cabe interpretar, por tanto, que la presencia de ostia supernumerarios preferentemente en el lado derecho de la válvula aórtica es una característica propia de la cepa T o del hámster sirio como especie, pero no asociada a la etiología de las malformaciones valvulares.

El proceso de formación de las válvulas semilunares ocurre de manera simultánea al de las arterias coronarias y en la misma región del tracto de salida cardiaco embrionario (*Bogers et al., 1989*), por lo que se planteó la hipótesis de que las alteraciones durante la embriogénesis que dan lugar a la VAB tipo A afectan también al proceso de formación de las arterias coronarias. A este respecto, debería tenerse en cuenta, por un lado, que existen varias líneas de evidencia que indican que la CNC está implicada en el desarrollo normal de las arterias coronarias, en particular en la localización de los ostia coronarios (*Kappetein et al., 1991; Hood & Rosenquist, 1992; Waldo et al., 1994; Schievink & Mokri, 1995; Fernández et al., 2000; Macatee et al., 2003*) y, por otro, que tal y como se indica en la Publicación 2 de la presente tesis, la VAB tipo A del hámster resulta del comportamiento anómalo de la CNC durante la valvulogénesis. En el modelo hámster, las anomalías coronarias se caracterizan por ausencia de las arterias que surgen del seno izquierdo en el caso de los animales con VAT, o del lado izquierdo del seno anterior cuando se trata de una VAB (*Durán et al., 2006, 2007a, 2007b*). Atendiendo a la hipótesis planteada, estos datos sugieren que, en el hámster, puede existir

una alteración específica en la parte izquierda de la válvula aórtica en desarrollo, consistente en una distribución anómala de las células de la CNC en esa zona, que impide la correcta conexión y formación de la arteria coronaria.

Se sabe que la porción proximal de las arterias coronarias, los troncos coronarios, se forman a partir de un plexo vascular que contacta y se anastomosa a la raíz aórtica durante el desarrollo embrionario, un proceso morfogénico denominado *coronary ingrowth*, que subsecuentemente desencadena la diferenciación del sistema arterial (Bogers et al., 1989; Mikawa & Fischman, 1992; Poelmann et al., 1993; Waldo et al., 1994; Tomanek, 1996; Chen et al., 2014; Ivins et al., 2015). Estos contactos se establecen en múltiples localizaciones de la raíz aórtica, pero solamente dos de ellos se seleccionan para formar los precursores de las arterias coronarias derecha e izquierda, mientras que los otros degeneran (Poelmann et al., 1993; Ando et al., 2004). Se ha propuesto que la falta de penetración del plexo coronario en el lado izquierdo de la válvula de hámsteres afectados podría deberse a la reducción de la región que puede ser invadida por dicho plexo, un evento causado por la alteración de la migración y distribución de las células de la CNC. Esta hipótesis parece consistente con la literatura, puesto que la CNC parece tener un papel importante en la determinación del área de conexión del plexo vascular coronario a la raíz aórtica (Bogers et al., 1989; Hood & Rosenquist, 1992; Fernández et al., 2000; Arima et al., 2012). Además, el trabajo de Théveniau-Ruissy y colaboradores (2008) describe una elevada incidencia de coronaria única derecha (ausencia de coronaria izquierda en el seno aórtico izquierdo) en una cepa de ratones deficientes para el gen *Tbx1*. TBX1 es un factor de transcripción expresado por las células

del SHF que es esencial para la regulación de la interacción de estas células con las de la CNC. En este estudio determinan que la ausencia de TBX1 altera la interacción entre ambos linajes celulares y, por tanto, la migración y distribución de las células de la CNC en la válvula aórtica.

Considerando todo lo anterior, cabe prever que la distribución anómala de la CNC puede causar una baja incidencia de ostia coronarios accesorios en el lado izquierdo del seno anterior aórtico de hámsteres con VAB, impidiendo la conexión independiente de las arterias septal o conal a la raíz aórtica. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre individuos con VAT y VAB al comparar la incidencia global de ostia coronarios accesorios. Asimismo, tampoco se detectaron diferencias al comparar los senos/regiones izquierda y derecha de la válvula tanto en individuos con VAT como con VAB. Estos resultados indican, por tanto, que el defecto de la CNC que da lugar a la VAB tipo A no condiciona el desarrollo de ostia supernumerarios, sugiriendo una etiología diferente para esta variante anatómica. Se puede interpretar que la distribución anómala de las células de la CNC en la cepa T puede impedir, pero no limitar la formación de coronarias, es decir, la anomalía en estas células puede causar la ausencia de conexiones coronarias, pero si no lo hace, el número de ostia que se forman no se ve afectado.

Por último, cabe destacar que en el modelo hámster, la característica más constante en el patrón coronario es la presencia de una arteria septal bien desarrollada, incluso cuando aparecen disposiciones anómalas de las arterias coronarias izquierda y derecha (*Durán et al., 1992; Sans-Coma et al., 1993*). Estas disposiciones anómalas suelen implicar una reorganización del patrón arterial coronario, de tal manera que la ausencia de una rama principal es compensada por la expansión del territorio de irrigación de otra rama. Se

trata de un fenómeno frecuente que también se ha descrito en pacientes. En éstos, la irrigación del septo interventricular depende de ramas perforantes procedentes de una u otra rama coronaria, según la variación del patrón coronario establecido. Sin embargo, la variación del patrón coronario no afecta nunca a la arteria septal de los roedores, que puede ramificarse de uno de los dos troncos coronarios principales o presentar un ostium propio en el seno aórtico izquierdo o derecho (**Figuras 3 y 4 de la Publicación**), pero siempre está presente en el corazón de estos animales (*Durán et al., 2007b*). Los datos del presente estudio apoyan la noción de que, en el hámster, la arteria septal debería ser considerada como una tercera arteria coronaria.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Capítulo VIII

Conclusiones

Conclusions



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

1. La fusión de las crestas conotruncales, responsables del proceso de septación conotruncal, tiene lugar por la desaparición de las células endocárdicas que recubren la porción central de estos cojines tras su contacto. Este evento es mediado por un proceso de TEM completa, probablemente inducido por las células de la CNC del complejo de septación aórtico-pulmonar.
2. La CNC parece inducir el proceso de TEM en el endocardio que cubre las crestas enfrentadas, por lo que anomalías en el comportamiento de estas células podrían alterar el proceso de TEM y la fusión de las crestas, dando lugar a la extra-fusión subyacente a la formación de la VAB tipo A.
3. Existen tres procesos morfogénéticos clave para el desarrollo de la VAB:
  - 3.1 Formación anómala de los cojines endocárdicos, debido a un defecto en el proceso de TEM o a una migración celular defectuosa de las células CNC, que resulta en la coalescencia de dos cojines endocárdicos previo a la septación normal del tracto de salida. Este mecanismo resulta en el desarrollo de dos cojines valvulares en lugar de tres, cuyo remodelado da lugar a VAB tipo B o C.
  - 3.2 Fusión excesiva de las crestas conotruncales, mediada por una alteración en el proceso de TEM, que tiene lugar durante el proceso de septación del tracto de salida, debido a alteraciones en el comportamiento de las células de la CNC que colonizan las crestas conotruncales. Este mecanismo resulta en la coalescencia de los cojines valvulares aórticos izquierdo y derecho y, por tanto, da lugar a VAB tipo A.
  - 3.3 Alteración del proceso de excavación de los cojines valvulares como consecuencia de una distribución anómala de las células de

la CNC, una proliferación alterada de las células mesenquimáticas que componen los cojines y/o un defecto en la producción de matriz extracelular, generando VAB de distintos tipos con diferentes grados de severidad.

4. Las evidencias experimentales apoyan un papel central de la vía de señalización de NOTCH durante la formación de los distintos tipos de VAB, ya que su alteración puede afectar tanto al proceso de TEM que forma los cojines endocárdicos, como a la migración de la CNC.
5. Los tres procesos clave en la formación de la VAB son regulados por la CNC en tres etapas consecutivas del desarrollo. Así, un defecto genético específico puede alterar el comportamiento de la CNC en tres posibles momentos del desarrollo, determinando el proceso embrionario afectado y el tipo anatómico de VAB resultante.
6. El hámster sirio muestra un amplio espectro de anomalías que incluyen VAT y VAB con distintos grados de fusión de valvas similares a las descritas en humanos (continuo fenotípico), aunque con representación en exceso de la VAB tipo A. En cambio, el ratón de laboratorio presenta un espectro reducido de defectos valvulares entre los que predomina la VAB tipo B sin rafe. Estos resultados alertan de la existencia de diferencias interespecíficas e intraespecíficas entre los humanos y los modelos animales en cuanto a la expresión fenotípica de las malformaciones de la válvula aórtica. Dada la similitud entre el espectro de anomalías mostradas por el hámster sirio y los humanos, este modelo muestra una mejor capacidad de extrapolación de los resultados, lo que se traduce en una mayor bondad del modelo.

7. Entre las mutaciones asociadas a VAB, algunas pueden conducir al desarrollo de VAB tipo A o B dependiendo de modificadores genéticos, factores ambientales, o factores epigenéticos, mientras que otras pueden ser específicas de tipo.
8. El modelo hámster (cepa T) porta mutaciones o variantes genéticas que afectan de manera específica a los procesos morfogenéticos implicados en el desarrollo de la VAB tipo A. Además, existen alelos modificadores que modulan tanto la penetrancia como el grado de expresividad del carácter, pero no condicionan la aparición de distintos tipos de VAB. Por lo tanto, los genes modificadores solo actúan sobre los mecanismos morfogenéticos que dan lugar a la VAB tipo A.
9. Los animales de la cepa T de hámster sirio, independientemente del morfotipo valvular, presentan alteraciones histológicas y moleculares similares a la necrosis cística de la media que caracteriza la aortopatía bicúspide humana, aunque no muestran dilataciones conspicuas de la aorta ascendente. Las alteraciones histomorfológicas detectadas consisten en apoptosis de las células musculares lisas y lamelas elásticas excesivamente onduladas, ambas especialmente acentuadas en la región convexa de la aorta ascendente. En cuanto a las alteraciones moleculares, se halló una reducción de la abundancia de eNOS en la media aórtica y un aumento de la expresión de *Tgf- $\beta$*  y *Fbn-2*. Se propone que la cepa T de hámsteres constituye un modelo animal de predisposición a aortopatía bicúspide.
10. En la cepa T de hámster existe un genotipo específico que causa una alteración estructural de la pared de la aorta ascendente junto a una anomalía valvular (VAB) con baja penetrancia, lo que sugiere una

causalidad genética y excluye la participación de factores hemodinámicos. Así, los resultados de este estudio constituyen evidencias experimentales directas que demuestran un vínculo genético entre anomalías estructurales de la válvula aórtica y la aorta ascendente en un modelo espontáneo de VAB.

11. Tanto en hámsteres como pacientes existen individuos que presentan el "genotipo bicúspide" y su fenotipo asociado, la VAB, así como individuos con "genotipo bicúspide", pero con una válvula aórtica normal debido a la penetrancia incompleta del carácter. Cuando estos datos se trasladan al contexto de la aortopatía, es posible inferir que una porción de los pacientes con VAT y dilatación presentan, de hecho, el genotipo bicúspide. Esto implica, por tanto, que deben existir pacientes con válvula aórtica tricúspide (normal) con alta predisposición a la aortopatía bicúspide.
12. La cepa T podría estar representando a un grupo de pacientes en el cual una migración anómala de la CNC durante el desarrollo del tracto de salida cardiaco da lugar a un defecto estructural en la media de la aorta ascendente, junto con una baja penetrancia de VAB.
13. La presencia de ostia coronarios supernumerarios, preferentemente en el lado derecho de la válvula aórtica, es una característica propia de la cepa T o del hámster sirio como especie, pero no está asociada a la etiología de las malformaciones valvulares. En la cepa T podría existir una alteración específica en la parte izquierda de la válvula aórtica en desarrollo, consistente en una distribución anómala de las células de la CNC, que impide la correcta conexión y formación de la arteria coronaria. Sin embargo, parece que el defecto de la CNC no modifica el número de

conexiones que se establecen con la raíz aórtica durante el desarrollo, lo que sugiere una etiología diferente para esta variante anatómica.

14. En el hámster, los ostia coronarios accesorios se corresponden en la mayoría de los casos con la arteria septal, una arteria bien desarrollada que siempre está presente en esta especie. Puesto que las variaciones del patrón anatómico coronario no afectan nunca a la arteria septal, los datos del presente estudio apoyan la noción de que, en el hámster, la arteria septal debe considerarse una tercera arteria coronaria.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

1. Fusion of the conotruncal cushions, responsible for the process of conotruncal septation, occurs by the disappearance of the endocardial cells lining the central part of these cushions after their contact. This event is mediated by a complete EMT process, probably induced by the CNC cells of the aortic-pulmonary septation complex.
2. CNC appears to induce the EMT process in the endocardium overlying the opposing ridges, so that abnormalities in the behavior of these cells could alter the EMT process and the fusion of the ridges, resulting in the extra-fusion underlying the BAV type A formation.
3. There are three key morphogenetic processes for the development of BAV:
  - 3.1 Abnormal endocardial cushion formation due to a defect in the EMT process or defective cell migration of CNC cells, resulting in coalescence of two endocardial cushions prior to normal outflow tract septation. This mechanism results in the development of two cushions instead of three, whose remodeling leads to BAV type B or C.
  - 3.2 Excessive fusion of the conotruncal cushions mediated by an alteration in the EMT process. It occurs during the process of outflow tract septation due to changes in the behavior of the CNC cells that colonize the conotruncal cushions. This mechanism leads to the coalescence of the left and right aortic cushions, resulting in BAV type A.

- 3.3 Alteration of the process of excavation of the valvular cushions as a result of an abnormal distribution of CNC cells, an altered proliferation of the mesenchymal cells that compose the cushions and/or a defect in the production of the extracellular matrix, generating different types of BAV with varying degrees of severity.
4. Experimental evidence supports a central role of the NOTCH signaling pathway in the formation of different types of BAV, as its alteration can affect both the EMT process that forms endocardial cushions and the migration of CNC.
  5. The three key morphogenetic processes of BAV formation are regulated by CNC at three consecutive developmental stages. Thus, a specific genetic defect can alter CNC behavior at three possible developmental stages, determining the embryonic process affected and the resulting anatomical type of BAV.
  6. The Syrian hamster shows a broad spectrum of anomalies including VAT and BAV with different degrees of leaflet fusion similar to those described in humans (phenotypic continuum), but with an overrepresentation of BAV type A. In contrast, the laboratory mouse shows a reduced spectrum of valvular defects with a predominance of BAV type B without raphe. These results suggest the existence of inter- and intraspecific differences between humans and animal models in the phenotypic expression of aortic valve coarctation. Given the similarity between the spectrum of abnormalities displayed by the Syrian hamster and humans, this model shows a better ability to extrapolate the results.

7. Among the mutations associated with BAV, some may lead to the development of BAV type A or B depending on genetic modifiers, environmental factors, or epigenetic factors, while others may be type specific.
8. The hamster model (T strain) carries mutations or genetic variants that specifically affect the morphogenetic processes involved in the development of BAV type A. In addition, there are modifier alleles that modulate both the penetrance and the level of expression of the trait, but do not condition the appearance of different types of BAV. Thus, modifier genes act only on the morphogenetic mechanisms that give rise to BAV type A.
9. Syrian hamsters from the T strain, regardless of valve morphotype, show histological and molecular alterations similar to the cystic medial necrosis that characterizes human bicuspid aortopathy, although they do not show conspicuous dilatation of the ascending aorta. The histomorphologic changes observed consisted of apoptosis of smooth muscle cells and excessively wavy elastic lamellae, both of which were particularly accentuated in the convex region of the ascending aorta. Regarding molecular changes, we found a reduced abundance of eNOS in the aortic media and an increased expression of *Tgf- $\beta$*  and *Fbn-2*. It is proposed that the hamster T strain represents an animal model of predisposition to bicuspid aortopathy.
10. In the hamster T strain, there is a specific genotype that causes a structural alteration of the ascending aortic wall together with a valvular anomaly (BAV) with low penetrance, suggesting genetic causality and excluding the involvement of hemodynamic factors. Thus, the results of

this study provide direct experimental evidence of a genetic link between structural abnormalities of the aortic valve and ascending aorta in a spontaneous model of BAV.

11. In both hamsters and patients, there are individuals with the "bicuspid genotype" and its associated phenotype (BAV), as well as individuals with the "bicuspid genotype" but a normal aortic valve due to incomplete penetrance of the trait. When these data are translated into the context of aortopathy, it can be concluded that a proportion of patients with BAV and dilatation actually have the bicuspid genotype. This implies that there must be patients with tricuspid (normal) aortic valve with a high predisposition to bicuspid aortopathy.
12. The T strain could be representing a group of patients in which anomalous CNC migration during cardiac outflow tract development results in a structural defect in the medial ascending aorta, together with low BAV penetrance.
13. The presence of supernumerary coronary ostia, preferentially on the right side of the aortic valve, is a characteristic of the T strain or of the Syrian hamster as a species, but is not associated with the etiology of valvular malformations. In the T strain, there could be a specific alteration in the left side of the developing aortic valve, consisting of an abnormal distribution of CNC cells, which prevents the correct connection and formation of the coronary artery. However, it seems that the defect in the CNC does not alter the number of connections made with the aortic root during development, suggesting a different etiology for this anatomical variant.

14. In the hamster, the accessory coronary ostia correspond in most cases to the septal artery, a well-developed artery that is always present in this species. Since variations in the anatomical pattern of the coronary arteries never affect the septal artery, the data of the present study support the notion that the septal artery should be considered a third coronary artery in the hamster.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Referencias



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Abbott M. E. 1928.** Coarctation of the aorta of the adult type. II. A statistical study and historical retrospect of 200 recorded cases with autopsy, of stenosis or obliteration of the descending arch in subjects above the age of two years. *Am. Heart J.*, 3(5):574–618. DOI: 10.1016/S0002-8703(28)90281-1

**Abdulla T., Luna-Zurita L., De La Pompa J. L., Schleich J. M., Summers R. 2013.** Epithelial to mesenchymal transition—The roles of cell morphology, labile adhesion and junctional coupling. *Comput. Methods Programs Biomed.*, 111(2):435-446. DOI: 10.1016/j.cmpb.2013.05.018

**Abdulkareem N., Smelt J., Jahangiri M. 2013.** Bicuspid aortic valve aortopathy: genetics, pathophysiology and medical therapy. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 17(3):554–9. DOI: 10.1093/icvts/ivt196

**Acloque H., Adams M. S., Fishwick K., Bronner-Fraser M., Nieto M. A. 2009.** Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.*, 119(6):1438-49. DOI: 10.1172/JCI38019

**Aikawa E., Whittaker P., Farber M., Mendelson K., Padera R. F., Aikawa M., et al. 2006.** Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation*, 113(10):1344-1352. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591768

**Akerberg B. N., Sarangam M. L., Stankunas K. 2015.** Endocardial Brg1 disruption illustrates the developmental origins of semilunar valve disease. *Dev. Biol.*, 407(1):158–172. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.06.015

**Amalinei C., Căruntu I. D. 2013.** Etiology and Pathogenesis of Aortic Aneurysm. Editor: Aortic Aneurysm - Recent Advances. *IntechOpen*, chapter 1. DOI: 10.5772/56093

**Anderson R. H., Becker A. E., Meun W. P., Verhoeven R. E., Kirklin J. W., Aris A. 1981.** Atlas fotográfico de anatomía cardiaca. *Doyma*.

## Referencias

**Anderson R. H., Chaudhry B., Mohun T. J., Bamforth S. D., Hoyland D., Phillips H. M., et al. 2012.** Normal and abnormal development of the intrapericardial arterial trunks in humans and mice. *Cardiovasc. Res.*, 95(1):108-115. DOI: 10.1093/cvr/cvs147

**Anderson R.H., Devine W.A., Ho S.Y., Smith A., Mckay R. 1991.** The myth of the aortic annulus: the anatomy of the subaortic outflow tract. *Ann. Thorac. Surg.*, 52(3):640-646. DOI: 10.1016/0003-4975(91)90966-T

**Anderson R. H., Webb S., Brown N. A., Lamers W., Moorman A. 2003.** Development of the heart: (3) formation of the ventricular outflow tracts, arterial valves, and intrapericardial arterial trunks. *Heart*, 89(9):1110-1118. DOI: 10.1136/heart.89.9.1110

**Ando K., Nakajima Y., Yamagishi T., Yamamoto T., Nakamura H. 2004.** Development of proximal coronary arteries in quail embryonic heart. Multiple capillaries penetrating the aortic sinus fuse to form main coronary trunk. *Circ. Res.*, 94(3):346-352. DOI: 10.1161/01.RES.0000112963.79064.09

**Andrus B. W., O'Rourke D. J., Dacey L. J., Palac R. T. 2003.** Stability of ascending aortic dilatation following aortic valve replacement. *Circulation*, 108:II-295-II-299. DOI: 10.1161/01.cir.0000087385.63569.79

**Angelini A., Ho S. Y., Anderson R. H., Devine W. A., Zuberbuhler J. R., Becker A. E. 1989a.** The morphology of the normal aortic valve as compared with the aortic valve having two leaflets. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 98(3):362-367. DOI: 10.1016/S0022-5223(19)34382-X.

**Angelini P. 1989b.** Normal and anomalous coronary arteries: definitions and classification. *Am. Heart J.*, 117(2):418-434. DOI: 10.1016/0002-8703(89)90789-8

**Angelini P., Villason S., Chan A. V., Díez J. G. 1999.** Normal and anomalous coronary arteries in humans. En: P. Angelini (ed). *Coronary artery anomalies. A comprehensive approach*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 27-79.

- Arima Y., Miyagawa-Tomita S., Maeda K., Asai R., Seya D., Minoux M., et al. 2012.** Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nat. Commun.*, 3(1):1267. DOI: 10.1038/ncomms2258
- Basso C., Boschello M., Perrone C., Mecenero A., Cera A., Bicego D., et al. 2004.** An echocardiographic survey of primary school children for bicuspid aortic valve. *Am. J. Card.*, 93(5):661-663. DOI: 10.1016/j.amjcard.2003.11.031
- Basso C., Maron B., Corrado D., Thiene G. 2000.** Clinical profile of congenital coronary arteries anomalies with origin from wrong aortic sinus leading to sudden death in young competitive athletes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 35(6):1493-1501. DOI: 10.1016/S0735-1097(00)00566-0
- Becker A. E. 1981.** Variations of the main coronary arteries. En: (A. E. Becker, G. Losekoot, G. Marcelletti and R. H. Anderson, eds). *Paediatric Cardiology 3*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 263-277.
- Benavides F. J., Guénet J. L. 2003.** Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios Básicos y Aplicaciones. *Lab. Anim.*, Universidad de Alcalá y SECAL.
- Biben C., Weber R., Kesteven S., Stanley E., McDonald L., Elliott D. A., et al. 2000.** Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene *Nkx2-5*. *Circ. Res.*, 87(10):888-895. DOI: 10.1161/01.RES.87.10.888
- Bigas A., Espinosa L. 2016.** Notch signaling in cell-cell communication pathways. *Curr. Stem Cell Rep.*, 2:349-355. DOI: 10.1007/s40778-016-0065-1
- Biner S., Rafique A. M., Ray I., Cuk O., Siegel R. J., Tolstrup K. 2009.** Aortopathy is prevalent in relatives of bicuspid aortic valve patients. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 53(24):2288-2295. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.03.027

## Referencias

- Blaser M. C., Wei K., Adams R. L. E., Zhou Y. Q., Caruso L. L., Mirzaei Z., et al. 2018.** Deficiency of natriuretic peptide receptor 2 promotes bicuspid aortic valves, aortic valve disease, left ventricular dysfunction, and ascending aortic dilatations in mice. *Circ. Res.*, 122(3):405–416. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311194
- Bogers A. J., Gittenberger-de-Groot A. C., Poelmann R. E., Péault B. M., Huysmans H. A. 1989.** Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat. Embryol.*, 180:437-441. DOI: 10.1007/BF00305118
- Bosse K., Hans C. P., Zhao N., Koenig S. N., Huang N., Guggilam A., et al. 2013.** Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 60:27–35. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.001
- Braverman A. C., Guven H., Beardslee M. A., Makan M., Kates A. M., Moon M. R. 2005.** The bicuspid aortic valve. *Curr. Probl. Cardiol.*, 30:470-522. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2005.06.002
- Bravo-Jaimes K., Prakash S. K. 2020.** Genetics in bicuspid aortic valve disease: Where are we? *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 63(4):398-406. DOI: 10.1016/j.pcad.2020.06.005
- Buchwalow I. B., Podzuweit T., Böcker W., SamoiloVA V. E., Thomas S., Wellner M., et al. 2002.** Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *FASEB J.*, 16(6):500-508. DOI: 10.1096/fj.01-0842com
- Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. 2005.** Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.*, 6(11):826-835. DOI: 10.1038/nrg1710
- Butany J., Collins M. J., Duchnay M., Demellawy D. E., Karski J., Ralph-Edwards A. C. 2005.** A quadricuspid aortic valve. *J. Card. Surg.*, 20(2):193-197. DOI: 10.1111/j.0886-0440.2005.200402.x

- Calloway T. J., Martin L. J., Zhang X., Tandon A., Benson D. W., Hinton R. B. 2011.** Risk factors for aortic valve disease in bicuspid aortic valve: a family-based study. *Am. J. Med. Genet. A.*, 155(5):1015–1020. DOI: 10.1002/ajmg.a.33974
- Cardo M., Fernández B., Durán A. C., Arquá J. M., Franco D., Sans-Coma V. 1994.** Anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery trunk and its relationship with the morphology of the cardiac semilunar valves in Syrian hamsters. *Basic Res. Cardiol.*, 89:94-9. DOI: 10.1007/BF00788680
- Cardo M., Fernández B., Durán A. C., Fernández M. C., Arqué J. M., Sans-Coma V. 1995.** Anomalous origin of the left coronary artery from the dorsal aortic sinus and its relationship with aortic valve morphology in Syrian hamsters. *J. Comp. Pathol.*, 112(4):373-80. DOI: 10.1016/S0021-9975(05)80018-0
- Carlson R. G., Lillehei C. W., Edwards J. E. 1970.** Cystic medial necrosis of the ascending aorta in relation to age and hypertension. *Am. J. Card.*, 25(4):411-415. DOI: 10.1016/0002-9149(70)90006-8
- Carta L., Pereira L., Arteaga-Solis E., Lee-Arteaga S. Y., Lenart B., Starcher B., et al. 2006.** Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J. Biol. Chem.*, 281(12):8016–23. doi: 10.1074/jbc.m511599200
- Chang A. C., Fu Y., Garside V. C., Niessen K., Chang L., Fuller M., et al. 2011.** Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase. *Dev. Cell*, 21(2):288-300
- Chen H. I., Poduri A., Numi H., Kivela R., Saharinen P., McKay A. S., et al. 2014.** VEGF-C and aortic cardiomyocytes guide coronary artery stem development. *J. Clin. Investig.*, 124(11):4899-4914. DOI: 10.1172/JCI77483
- Cheung C., Bernardo A. S., Trotter M. W., Pedersen R. A., Sinha, S. 2012.** Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into embryological origin-dependent disease susceptibility. *Nat. Biotechnol.*, 30(2):165–173. DOI: 10.1038/nbt.2107.

## Referencias

**Cooper D. N., Krawczak M., Polychronakos C., Tyler-Smith C., Kehrer-Sawatzki H. 2013.** Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum. Genet.*, 132:1077-1130. DOI: 10.1007/s00439-013-1331-2

**Correiro E. E., Griffin L. R., Hart P. E. 2008.** A constructivist approach to inquiry-based learning: A TUNEL assay for the detection of apoptosis in cheek cells. *Am. Biol. Teach.*, 70(8):457-460. DOI: 10.1662/0002-7685(2008)70[457:ACATIL]2.0.CO;2

**Cripe L., Andelfinger G., Martin L. J., Shoener K., Benson D. W. 2004.** Bicuspid aortic valve is heritable. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 44:138-43. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.03.050

**Davis C. L. 1924.** The cardiac jelly of the chick embryo. *Anat. Rec.*, 27:201-202.

**de Almeida L. G., Thode H., Eslambolchi Y., Chopra S., Young D., Gill S., et al. 2022.** Matrix metalloproteinases: From molecular mechanisms to physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 74(3):714-770. DOI: 10.1124/pharmrev.121.000349

**Della Corte A., Bancone C., Quarto C., Dialetto G., Covino F. E., Scardone M., et al. 2007.** Predictors of ascending aortic dilatation with bicuspid aortic valve: a wide spectrum of disease expression. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 31(3):397-404; discussion 404-405. DOI: 10.1016/j.ejcts.2006.12.006

**Desgrosellier J. S., Mundell N. A., McDonnell M. A., Moses H. L., Barnett J. V. 2005.** Activin receptor-like kinase 2 and Smad6 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Dev. Biol.*, 280(1):201-210. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.12.037

**Dickman E. D., Rogers R., Conway S. J. 1999.** Abnormal skeletogenesis occurs coincident with increased apoptosis in the Splotch (Sp2H) mutant: putative roles for Pax3 and PDGFR $\alpha$  in rib patterning. *Anat. Rec.*, 255(3):353-361. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(19990701)255:3<353::AID-AR11>3.0.CO;2-H

**Dietz H. C., Pyeritz R. E. 1995.** Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 4(suppl\_1), 1799-1809. DOI: 10.1093/hmg/4.suppl\_1.1799

**Doty D. B. 2001.** Anomalous origin of the left circumflex coronary artery associated with bicuspid aortic valve. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 122(4):842-3. DOI: 10.1067/mtc.2001.118043

**Duband J. L. 2010.** Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. *Cell. Adhes.*, 4(3):458-482. DOI: 10.4161/cam.4.3.12501

**Dunmore P. J., Roach M. R. 1990.** The effects of age, vessel size, and Ehlers-Danlos type IV syndrome on the waviness index of arteries. *Clin. Invest. Med.*, 13(2):67-70.

**Dupuis L. E., Osinska H., Weinstein M. B., Hinton R. B., Kern C. B. 2013.** Insufficient versican cleavage and Smad2 phosphorylation results in bicuspid aortic and pulmonary valves. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 60:50-59. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.03.010

**Durán A. C., Arqué J. M., Fernández B., Fernández M. C., Fernández-Gallego T., Sans-Coma V. 2007a.** Separate origin of the main components of the left coronary artery in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Vet. Med., A*, 54(6):297-301. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2007.00928.x

**Durán A. C., Fernández-Gallego T., Fernández B., Fernández M. C., Arqué J. M., Sans-Coma V. 2006.** Anomalous origin of the left coronary artery from the right side of the aortic valve in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Pathol.*, 134(4):290-296. DOI: 10.1016/j.jcpa.2005.11.005

**Durán A. C., Fernández M. C., Fernández B., Fernández-Gallego T., Arqué J. M., Sans-Coma V. 2007b.** Number of coronary ostia in Syrian hamsters

## Referencias

(*Mesocricetus auratus*) with normal and anomalous coronary arteries. *Anat. Histol. Embryol.*, 36(6):460-465. DOI: 10.1111/j.1439-0264.2007.00788.x

**Durán A. C., Sans-Coma V., Arqué J. M., Cardo M., Fernández B., Franco D. 1992.** Blood supply to the interventricular septum of the heart in rodents with intramyocardial coronary arteries. *Acta Zoo.*, 73(4):223-229. DOI: 10.1111/j.1463-6395.1992.tb01086.x

**Edwards W. D., Leaf D. S., Edwards J. E. 1978.** Dissecting aortic aneurysm associated with congenital bicuspid aortic valve. *Circulation*, 57(5):1022-1025. DOI: 10.1161/01.CIR.57.5.1022

**Egorova A. D., Khedoe P. P., Goumans M. J. T., Yoder B. K., Nauli S. M., ten Dijke, P., et al. 2011.** Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Circ. Res.*, 108(9):1093-1101. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231860

**Eley L., Alqahtani A. M., MacGrogan D., Richardson R. V., Murphy L., Salguero-Jimenez A., et al. 2018.** A novel source of arterial valve cells linked to bicuspid aortic valve without raphe in mice. *Elife*, 7:e34110. DOI: 10.7554/eLife.34110

**Ellison J. W., Yagubyan M., Majumdar R., Sarkar G., Bolander M. E., Atkinson E. J., et al. 2007.** Evidence of genetic locus heterogeneity for familial bicuspid aortic valve. *J. Surg. Res.*, 142(1):28-31. DOI: 10.1016/j.jss.2006.04.040

**Falk V., Baumgartner H., Bax J. J., De Bonis M., Hamm C., Holm P. J., et al. 2017.** 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 52(4):616-664. DOI: 10.1093/ejcts/ezx324

**Fedak P., Verma S., David T. E., Leask R. L., Weisel R. D., Butany J. 2002.** Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve. *Circulation*, 106:900-4. DOI: 10.1161/01.cir.0000027905.26586.e8

- Fedak P., de Sa M. P., Verma S., Nili N., Kazemian P., Butany J, et al. 2003.** Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 126(3):797–806. DOI: 10.1016/s0022-5223(03)00398-2
- Fernandes S., Khairy P., Graham D. A., Colan S. D., Galvin T. C., Sanders S. P., et al. 2012.** Bicuspid aortic valve and associated aortic dilation in the young. *Heart*, 98(13):1014-1019. DOI: 10.1136/heartjnl-2012-301773
- Fernández B., Durán A. C., Fernández-Gallego T., Fernández M. C., Such M., Arqué J. M., et al. 2009.** Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 54(24):2312-2318. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.07.044
- Fernández M. C., Durán A. C., Real R., López D., Fernández B., De Andrés A. V., et al. 2000.** Coronary artery anomalies and aortic valve morphology in the Syrian hamster. *Lab. Anim.*, 34(2):145–154. DOI: 10.1258/002367700780457545
- Fleming, I. 2010.** Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.*, 459(6):793-806. DOI: 10.1007/s00424-009-0767-7
- Foffa I., Ait Alì L., Panesi P., Mariani M., Festa P., Botto N., et al. 2013.** Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC Med. Genet.*, 14(1):1-8. DOI: 10.1186/1471-2350-14-44
- Freeman R. V., Otto C. M. 2013.** Bicuspid aortic valve and aortopathy: see the first, then look at the second. *JACC Cardiovasc. Imaging.*, 6(2):162–4. DOI: 10.1016/j.jcmg.2013.01.001
- Galian-Gay L., Carro Hevia A., Teixido-Turà G., Rodríguez Palomares J., Gutiérrez-Moreno L., Maldonado G., et al. 2019.** Familial clustering of bicuspid aortic valve and its relationship with aortic dilation in first degree relatives. *Heart*, 105(8):603–8. DOI: 10.1136/heartjnl-2018-313802

## Referencias

**Garg V., Muth A. N., Ransom J. F., Schluterman M. K., Barnes R., King I. N., et al. 2005.** Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*, 437(7056):270–274. DOI: 10.1038/nature03940

**Gauer S., Balint B., Kollmann C., Federspiel J. M., Henn D., Bandner-Risch D., et al. 2020.** Dysregulation of endothelial nitric oxide synthase does not depend on hemodynamic alterations in bicuspid aortic valve aortopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 9(18), e016471. DOI: 10.1161/JAHA.120.016471

**Gharibeh L., Komati H., Bossé Y., Boodhwani M., Heydarpour M., Fortier M., et al. 2018.** GATA6 regulates aortic valve remodeling and its haploinsufficiency leads to RL-type bicuspid aortic valve. *Circulation*; 138(10):1025–1038. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029506

**Girdauskas E., Borger M. A., Secknus M. A., Girdauskas G., Kuntze T. 2011.** Is aortopathy in bicuspid aortic valve disease a congenital defect or a result of abnormal hemodynamics? A critical reappraisal of a one-sided argument. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 39(6):809-814. DOI: 10.1016/j.ejcts.2011.01.001

**Gittenberger-de Groot A. C., Bartelings M. M., DeRuiter M. C., Poelmann R. E. 2005.** Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations. *Pediatr. Res.*, 57(2):169-176. DOI: 10.1203/01.PDR.0000148710.69159.61

**Gould R. A., Aziz H., Woods C. E., Seman-Senderos M. A., Sparks E., Preuss C., et al. 2019.** ROBO4 variants predispose individuals to bicuspid aortic valve and thoracic aortic aneurysm. *Nat. Genet.*, 51(1):42-50. DOI: 10.1038/s41588-018-0265-y

**Grewal N., Gittenberger-de Groot A. C. 2018.** Pathogenesis of aortic wall complications in Marfan syndrome. *Cardiovasc. Pathol.*, 33:62-69. DOI: 10.1016/j.carpath.2018.01.005

**Gross L., Kugel M. 1931.** Topographic anatomy and histology of the valves in the human heart. *Am. J. Pathol.*, 7(5):445- 445–474.7.

**Halushka M. K., Angelini A., Bartoloni G., Basso C., Batoroeva L., Bruneval P., et al. C. 2016.** Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases—nomenclature and diagnostic criteria. *Cardiovasc. Pathol.*, 25(3):247-257. DOI: 10.1016/j.carpath.2016.03.002

**Harmon A. W., Nakano A. 2013.** Nkx2-5 lineage tracing visualizes the distribution of second heart field-derived aortic smooth muscle. *Gen.*, 51(12):862–869. DOI: 10.1002/dvg.22721

**Hay E. D. 1968.** Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In *Epithelial-Mesenchymal Interactions*; 18th Hahnemann Symposium. Williams & Wilkins.

**Henn D., Perttunen H., Gauer S., Schmied W., Porras C., Such M., et al. 2014.** GATA5 and endothelial nitric oxide synthase expression in the ascending aorta is related to aortic size and valve morphology. *Ann. Thorac. Surg.*, 97(6):2019–25. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2014.02.050

**High F. A., Zhang M., Proweller A., Tu L., Parmacek M. S., Pear W. S., et al. 2007.** An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation. *J. Clin. Investig.*, 117(2):353-363. DOI: 10.1172/JCI30070

**High F. A., Jain R., Stoller J. Z., Antonucci N. B., Lu M. M., Loomes K. M., et al. 2009.** Murine Jagged1/Notch signaling in the second heart field orchestrates Fgf8 expression and tissue-tissue interactions during outflow tract development. *J. Clin. Investig.*, 119(7):1986-1996. DOI: 10.1172/JCI38922

## Referencias

**Hinton R. B., Yutzey K. E. 2011.** Heart valve structure and function in development and disease. *Annu. Rev. Physiol.*, 73:29-46. DOI: 10.1146/annurev-physiol-012110-142145

**Hinton R. B. 2012.** Bicuspid aortic valve and thoracic aortic aneurysm: three patient populations, two disease phenotypes, and one shared genotype. *Cardiol. Res. Pract.*, 2012:926975. DOI: 10.1155/2012/926975

**Hiratzka L. F., Bakris G. L., Beckman J. A., Bersin R. M., Carr V. F., Casey D. E., et al. 2010.** ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM Guidelines for the Diagnosis and Management of Patients With Thoracic Aortic Disease: Executive Summary. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 55(14):1509–1544. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.02.015

**Hood L. C., Rosenquist T. H. 1992.** Coronary artery development in the chick: origin and deployment of smooth muscle cells, and the effects of neural crest ablation. *Anat. Rec.*, 234(2):291-300. DOI: 10.1002/ar.1092340215

**Hogers B., DeRuiter M. C., Gittenberger-de Groot A. C., Poelmann R. E. 1997.** Unilateral vitelline vein ligation alters intracardiac blood flow patterns and morphogenesis in the chick embryo. *Circ. Res.*, 80(4):473-481. DOI: 10.1161/01.RES.80.4.473

**Hokken R. B., Bartelings M. M., Bogers A. J. J. C., Gittenberger de Groot A. C. 1997.** Morphology of the pulmonary and aortic roots with regard to the pulmonary autograft procedure. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 113 (3):453-461. DOI: 10.1016/S0022-5223(97)70357-X

**Hope M. D., Hope T. A., Meadows A. K., Ordovas K. G., Urbania T. H., Alley M. T., et al. 2010.** Bicuspid aortic valve: four-dimensional MR evaluation of ascending aortic systolic flow patterns. *Radiology*, 255(1):53-61. DOI: 10.1148/radiol.09091437

**Hope M. D., Meadows A. K., Hope T. A., Ordovas K. G., Reddy G. P., Alley M. T., et al. 2008.** Evaluation of bicuspid aortic valve and aortic coarctation with 4D flow magnetic resonance imaging. *Circ.*, 117(21):2818-2819. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.760124

**Huntington K., Hunter A. G., Chan K. L. 1997.** A prospective study to assess the frequency of familial clustering of bicuspid aortic valve. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 30(7):1809-1812. DOI: 10.1016/S0735-1097(97)00372-0

**Hurst J. W. (ed.) 1990.** The Heart. McGraw-Hill, New York, NY.

**Hurlé J. M., Colvee E. 1983.** Changes in the endothelial morphology of the developing semilunar heart valves. *Anat. Embryol.*, 167(1):67-83. DOI: 10.1007/BF00304601

**Hurlé J. M., Colvee E., Blanco A. M. 1980.** Development of mouse semilunar valves. *Anat. Embryol.*, 160(1):83-91. DOI: 10.1007/BF00315651

**Hutchinson S. J. 2009.** Aortic Diseases: Clinical Diagnostic Imaging Atlas. 1st ed. Saunders Elsevier, 6-8.

**Ishikawa H., Marshall W. F. 2011.** Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(4):222-234. DOI: 10.1038/nrm3085

**Isogai Z., Ono R. N., Ushiro S., Keene D. R., Chen Y., Mazzieri R., et al. 2003.** Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem.*, 278(4):2750-2757. DOI: 10.1074/jbc.M209256200

**Ivins S., Chappell J., Vernay B., Suntharanlingham J., Martineau A., Mohun T. J., et al. 2015.** The CXCL12/CXCR4 axis plays a critical role in coronary artery development. *Dev. Cell.*, 33(4):455-468. DOI: 10.1016/j.devcel.2015.03.026

**Jain R., Engleka K. A., Rentschler S. L., Manderfield L. J., Li L., Yuan L., Epstein J. A. 2011.** Cardiac neural crest orchestrates remodeling and

## Referencias

functional maturation of mouse semilunar valves. *J. Clin. Invest.*, 121(1):422-430. DOI: 10.1172/JCI44244

**Jensen S. A., Handford P. A. 2016.** New insights into the structure, assembly and biological roles of 10–12 nm connective tissue microfibrils from fibrillin-1 studies. *Biochem. J.*, 473(7):827-838. DOI: 10.1042/BJ20151108

**Jiao J., Xiong W., Wang L., Yang J., Qiu P., Hirai H., et al. 2016.** Differentiation defect in neural crest-derived smooth muscle cells in patients with aortopathy associated with bicuspid aortic valves. *EBioMedicine*. 10:282–90. DOI: 10.1016/j.ebiom. 2016.06.045

**Kaartinen V., Dudas M., Nagy A., Sridurongrit S., Lu M. M., Epstein J. A. 2004.** Cardiac outflow tract defects in mice lacking ALK2 in neural crest cells. *Development*, 131(14):3481–3490. DOI: 10.1242/dev.01214

**Kappetein A. P., Gittenberger-de Groot A. C., Zwinderman A. H., Rohmer J., Poelmann R. E., Huysmans H. A. 1991.** The neural crest as a possible pathogenetic factor in coarctation of the aorta and bicuspid aortic valve. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 102(6):830-836. DOI: 10.1016/S0022-5223(19)33931-5

**Kelly R. G., Evans S. M. 2010.** The second heart field. *Heart Development and Regeneration*, 143-169. DOI: 10.1016/B978-0-12-381332-9.00007-4

**Kelly R. G., Buckingham M. E., Moorman A. F. 2014.** Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 4(10):a015750. DOI: 10.1101/cshperspect.a015750

**Kirby M. L., Gale T. F., Stewart D. E. 1983.** Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*, 220(4601):1059-1061. DOI: 10.1126/science.6844926

**Kovacic J. C., Mercader N., Torres M., Boehm M., Fuster V. 2012.** Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular

development to disease. *Circ.*, 125(14):1795-1808. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352

**Kurn H., Daly D. T. 2021.** Histology, epithelial cell. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

**Laforest B., Andelfinger G., Nemer M. 2011.** Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J. Clin. Invest.*, 121(7):2876–2887. DOI: 10.1172/JCI44555

**Laforest B., Nemer, M. 2011.** GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Dev. Biol.*, 358(2):368-378. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.07.037.

**Larson E. W., Edwards W. D. 1984.** Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am. J. Card.*, 53(6):849-855. DOI: 10.1016/0002-9149(84)90418-1

**Lee T. C., Zhao Y. D., Courtman D. W., Stewart, D. J. 2000.** Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circ.*, 101(20):2345-2348. DOI: 10.1161/01.CIR.101.20.2345

**LeMaire S. A., Wang X., Wilks J. A., Carter S. A., Wen S., Won T., et al. 2005.** Matrix metalloproteinases in ascending aortic aneurysms: Bicuspid versus trileaflet aortic valves. *J. Surg. Res.*, 123:40–8. DOI: 10.1016/j.jss.2004.06.007

**Lescroart F., Dumas C. E., Adachi N., Kelly R. G. 2022.** Emergence of heart and branchiomeric muscles in cardiopharyngeal mesoderm. *Exp. Cell Res.*, 410(1):112931. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112931

**Li R. G., Xu Y. J., Wang J., Liu X. Y., Yuan F., Huang R. T., et al. 2018.** GATA4 loss-of-function mutation and the congenitally bicuspid aortic valve. *Am. J. Card.*, 121(4):469-474. DOI: 10.1016/j.amjcard.2017.11.012

**Liu Y., Feng Q. 2012.** NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation*, 84(1):54-61. DOI: 10.1016/j.diff.2012.04.004

## Referencias

**López-García A., Fernández M. C., Durán A. C., Sans-Coma V., Fernández B. 2015.** Quadricuspid aortic valves in Syrian hamsters and their formation according to current knowledge on valvulogenesis. *Jpn. J. Vet. Res.*, 63(1):37-43. DOI: 10.14943/jjvr.63.1.37

**López-García A., Soto-Navarrete M. T., Fernández M. C., Moncayo-Arlandi J., Durán A. C., López-Unzu M. A., et al. 2016.** Unusual anatomical origins of the coronary arteries in C57BL/6 mice. Are they strain-specific? *J. Anat.*, 229(5):703-709. DOI: 10.1111/joa.12512

**Loscalzo M. L., Goh D. L. M., Loeys B., Kent K. C., Spevak P. J., Dietz H. C. 2007.** Familial thoracic aortic dilation and bicommissural aortic valve: a prospective analysis of natural history and inheritance. *Am. J. Med. Genet.*, 143A:1960-1967. DOI: 10.1002/ajmg.a.31872

**Losenno K. L., Goodman R. L., Chu M. W. 2012.** Bicuspid aortic valve disease and ascending aortic aneurysms: gaps in knowledge. *Cardiol. Res. Pract.*, 2012:145202. DOI: 10.1155/2012/145202

**Luna-Zurita L., Prados B., Grego-Bessa J., Luxán G., Del Monte G., Benguría A., et al. 2010.** Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J. Clin. Investig.*, 120(10):3493-3507. DOI: 10.1172/JCI42666

**Macatee T. L., Hammond B. P., Arenkiel B. R., Francis L., Frank D. U., Moon A. M. 2003.** Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived FGF8 during cardiovascular and pharyngeal development. *Development*; 130(25):6361-6374. DOI: 10.1242/dev.00850

**MacGrogan D., D'Amato G., Travisano S., Martinez-Poveda B., Luxán G., del Monte-Nieto G., et al. 2016.** Sequential ligand-dependent notch signaling activation regulates valve primordium formation and morphogenesis. *Circ. Res.*, 118(10):1480-1497. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.308077

- Majesky M. W. 2007.** Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27(6):1248-1258. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.141069
- Makki N, Capecchi MR. 2012.** Cardiovascular defects in a mouse model of HOXA1 syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 21(1):26–31. DOI: 10.1093/hmg/ddr434
- Markwald R. R., Fitzharris T. P., Manasek F. J. 1977.** Structural development of endocardial cushions. *Am. J. Anat.*, 148(1):85-119. DOI: 10.1002/aja.1001480108
- Martinez-Alvarez C., Tudela C., Perez-Miguelsanz J., O'kane S., Puerta J., Ferguson M. W. J. 2000.** Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev. Biol.*, 220(2):343-357. DOI: 10.1006/dbio.2000.9644
- Martínez-Vargas J., Ventura J., Machuca Á., Muñoz-Muñoz F., Fernández M. C., Soto-Navarrete M. T., et al. 2017.** Cardiac, mandibular and thymic phenotypical association indicates that cranial neural crest underlies bicuspid aortic valve formation in hamsters. *PLoS one*, 12(9):e0183556. DOI: 10.1371/journal.pone.0183556
- McBride K. L., Garg V. 2011.** Heredity of bicuspid aortic valve: is family screening indicated? *Heart*, 97:1193-5. DOI: 10.1136/hrt.2011.222489
- McBride K. L., Riley M. F., Zender G. A., Fitzgerald-Butt S. M., Towbin J. A., Belmont J. W., et al. 2008.** NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Hum. Mol. Genet.*, 17(18):2886-2893. DOI: 10.1093/hmg/ddn187
- McKay R., Smith A., Leung M., Arnold R., Anderson R. 1992.** Morphology of the ventriculoaortic junction in critical aortic stenosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 104(2):434-442. DOI: 10.1016/S0022-5223(19)34800-7
- McKellar S. H., Tester D. J., Yagubyan M., Majumdar R., Ackerman M. J., Sundt III T. M. 2007.** Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic

## Referencias

valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 134(2):290–296. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.02.041

**Messner B., Bernhard D. 2019.** Bicuspid aortic valve-associated aortopathy: Where do we stand? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 133:76–85. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.023

**Michałowska I. M., Hryniewiecki T., Kwiatek P., Stokłosa P., Swoboda-Rydz U., Szymański P. 2016.** Coronary artery variants and anomalies in patients with bicuspid aortic valve. *J. Thorac. Imaging*, 31(3):156–162. DOI: 10.1097/RTI.0000000000000205

**Michelena H. I. 2022.** Speaking a common language: the international consensus on bicuspid aortic valve nomenclature and classification. *Ann. Cardiothorac. Surg.*, 11(4):402. DOI: 10.21037/acs-2022-bav-24

**Michelena H. I., Della Corte A., Evangelista A., Maleszewski J. J., Enriquez-Sarano M., Bax J. J., et al. 2020.** Speaking a common language: introduction to a standard terminology for the bicuspid aortic valve and its aortopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 63(4):419–424. DOI: 10.1016/j.pcad.2020.06.006

**Michelena H. I., Della Corte A., Evangelista A., Maleszewski J. J., Edwards W. D., Roman M. J., et al. 2021.** International consensus statement on nomenclature and classification of the congenital bicuspid aortic valve and its aortopathy, for clinical, surgical, interventional and research purposes. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 60:448–76. DOI: 10.1093/ejcts/ezab038

**Michelena H. I., Della Corte A., Prakash S. K., Milewicz D. M., Evangelista A., Enriquez-Sarano M. 2015.** Bicuspid aortic valve aortopathy in adults: incidence, etiology, and clinical significance. *Int. J. Cardiol.*, 201:400–407. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.08.106

**Michelena H. I., Khanna A. D., Mahoney D., Margaryan E., Topilsky Y., Suri R. M., et al. 2011.** Incidence of aortic complications in patients with bicuspid aortic valves. *J. Am. Med. Assoc.*, 306(10):1104-1112. DOI: 10.1001/jama.2011.1286

**Michelena H. I., Prakash S. K., Della Corte A., Bissell M. M., Anavekar N., Mathieu P., et al. 2014.** Bicuspid aortic valve: identifying knowledge gaps and rising to the challenge from the International Bicuspid Aortic Valve Consortium (BAVCon). *Circulation*, 129:2691-704. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007851

**Mikawa T., Fischman D. A. 1992.** Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(20):9504-9508. DOI: 10.1073/pnas.89.20.9504

**Mills P., Leech G., Davies M., Leathan A. 1978.** The natural history of a non-stenotic bicuspid aortic valve. *Heart*, 40(9):951-957. DOI: 10.1136/hrt.40.9.951

**Miyabara S., Ando M., Yoshida M., Saito N., Sugihara H. 1994.** Absent aortic and pulmonary valves: investigation of three fetal cases with cystic hygroma and review of the literature. *Heart Vessels*, 9(1):49-55. DOI: 10.1007/BF01744495

**Moens C. B., Selleri L. 2006.** Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.*, 291(2):193-206. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.10.032

**Mohamed S. A., Aherrahrou Z., Liptau H., Erasmi A. W., Hagemann C., Wrobel S., et al. 2006.** Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345:1460-1465. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.046

**Mohamed S. A., Radtke A., Saraei R., Bullerdiek J., Sorani H., Nimzyk R., et al. 2012.** Locally different endothelial nitric oxide synthase protein levels in ascending aortic aneurysms of bicuspid and tricuspid aortic valve. *Cardiol. Res. Pract.*, 2012:165957. DOI: 10.1155/2012/165957

## Referencias

**Mommersteeg M. T., Yeh M. L., Parnavelas J. G., Andrews W. D. 2015.**

Disrupted Slit-Robo signalling results in membranous ventricular septum defects and bicuspid aortic valves. *Cardiovasc. Res.*, 106(1):55–66. DOI: 10.1093/cvr/cvv040

**Monda E., Verrillo F., Rubino M., Palmiero G., Fusco A., Cirillo A., et al. 2022.**

Thoracic aortic dilation: Implications for physical activity and sport participation. *Diagnostics*, 12(6):1392. DOI: 10.3390/diagnostics12061392

**Moore G. W., Hutchins G. M., Brito J. C., Kang H. 1980.**

Congenital malformations of the semilunar valves. *Hum. Pathol.*, 11(4):367-372. DOI: 10.1016/S0046-8177(80)80033-5

**Naito S., Petersen J., Reichenspurner H., Girdauskas E. 2018.**

The impact of coronary anomalies on the outcome in aortic valve surgery: comparison of bicuspid aortic valve versus tricuspid aortic valve morphotype. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 26(4):617-622. DOI: 10.1093/icvts/ivx396

**Nakaya Y., Sheng G. 2008.**

Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev. Growth Differ.*, 50(9):755-766. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2008.01070.x

**Nemer G., Nemer M. 2002.**

Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development*, 129(17):4045–4055. DOI: 10.1242/dev.129.17.4045

**Neptune E. R., Frischmeyer P. A., Arking D. E. 2003.**

Dysregulation of TGF- $\beta$  activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet.*, 33(3):407-411. DOI: 10.1038/ng1116

**Netter F. 1976.** Colección de ilustraciones médicas: Corazón. Tomo V. Masson.

**Niaz T., Poterucha J. T., Olson T. M., Johnson J. N., Craviari C., Nienaber T,**

**et al. 2018.** Characteristic morphologies of the bicuspid aortic valve in patients with

genetic syndromes. *J. Am. Soc. Echocardiograph.*, 31(2):194-200. DOI: 10.1016/j.echo.2017.10.008

**Nistala H., Lee-Arteaga S., Smaldone S., Siciliano G., Carta L., Ono R. N., et al. 2010.** Fibrillin-1 and-2 differentially modulate endogenous TGF- $\beta$  and BMP bioavailability during bone formation. *J. Cell Biol.*, 190(6):1107-1121. DOI: 10.1083/jcb.201003089

**Niwa K., Perloff J. K., Bhuta S. M., Laks H., Drinkwater D. C., Child J. S., et al. 2001.** Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease: light and electron microscopic analyses. *Circ.*, 103(3):393-400. DOI: 10.1161/01.CIR.103.3.393

**Noiri E., Lee E., Testa J., Quigley J., Colflesh D., Keese C. R., et al. 1998.** Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 274(1):C236-C244. DOI: 10.1152/ajpcell.1998.274.1.C236

**O'Riordan E., Mendeleev N., Patschan S., Patschan D., Eskander J., Cohen-Gould L., et al. 2007.** Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 292(1):H285-H294. DOI: 10.1152/ajpheart.00560.2006

**Odelin G., Faure E., Couplier F., Di Bonito M., Bajolle F., Studer M, et al. 2018.** Krox20 defines a subpopulation of cardiac neural crest cells contributing to arterial valves and bicuspid aortic valve. *Development*, 145(1):dev151944. DOI: 10.1242/dev.151944

**Odelin G., Faure E., Maurel-Zaffran C., Zaffran S. 2019.** Krox20 regulates endothelial nitric oxide signaling in aortic valve development and disease. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, 6(4):39. DOI: 10.3390/jcdd6040039

**Padang R., Bagnall R. D., Richmond D. R., Bannon P. G., Semsarian C. 2012.** Rare non-synonymous variations in the transcriptional activation domains of GATA5

## Referencias

in bicuspid aortic valve disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 53(2):277-281. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.05.009

**Padang R., Bannon P. G., Jeremy R., Richmond D. R., Semsarian C., Vallely M., et al. 2013.** The genetic and molecular basis of bicuspid aortic valve associated thoracic aortopathy: a link to phenotype heterogeneity. *Ann. Cardiothorac. Surg.*, 2:83-91. DOI: 10.3978/j.issn.2225-319X.2012.11.17

**Parapia L. A., Jackson C. 2008.** Ehlers-Danlos syndrome—a historical review. *Br. J. Haematol.*, 141(1):32-35. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.06994.x

**Pepe G., Nistri S., Giusti B., Sticchi E., Attanasio M., Porciani C., et al. 2014.** Identification of fibrillin 1 gene mutations in patients with bicuspid aortic valve (BAV) without Marfan syndrome. *BMC Med. Genet.*, 15(1):1-7. DOI: 10.1186/1471-2350-15-23

**Pérez-Pomares J. M., De La Pompa J. L., Franco D., Henderson D., Ho S. Y., Houyel L., et al. 2016.** Congenital coronary artery anomalies: a bridge from embryology to anatomy and pathophysiology—a position statement of the development, anatomy, and pathology ESC Working Group. *Cardiovasc. Res.*, 109:204-16. DOI: 10.1093/cvr/cvv251

**Peterson J. C., Chughtai M., Wisse L. J., Gittenberger-de Groot A. C., Feng Q., Goumans M. J. T., et al. 2018.** Bicuspid aortic valve formation: Nos3 mutation leads to abnormal lineage patterning of neural crest cells and the second heart field. *Dis. Mod. Mech.*, 11(10):mm034637. DOI: 10.1242/dmm.034637

**Peterson, J. C., Wisse, L. J., Wirokromo, V., van Herwaarden, T., Smits, A. M., Gittenberger-de Groot, A. C., et al. 2020.** Disturbed nitric oxide signalling gives rise to congenital bicuspid aortic valve and aortopathy. *Dis. Mod. Mech.* 13(9):dmm044990. DOI: 10.1242/dmm.044990

**Pfaltzgraff E. R., Shelton E. L., Galindo C. L., Nelms B. L., Hooper C. W., Poole S. D., et al. 2014.** Embryonic domains of the aorta derived from diverse origins exhibit distinct properties that converge into a common phenotype in the adult. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 69:88-96. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.016

**Phillips H. M., Mahendran P., Singh E., Anderson R. H., Chaudhry B., Henderson D. J. 2013.** Neural crest cells are required for correct positioning of the developing outflow cushions and pattern the arterial valve leaflets. *Cardiovasc. Res.*, 99(3):452-460. DOI: 10.1093/cvr/cvt132

**Plein A., Fantin A., Ruhrberg C. 2015.** Neural crest cells in cardiovascular development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 111:183-200. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.006

**Poelmann R., Gittenberger-de Groot A. C., Mentink M., Bokenkamp R., Hogers B. 1993.** Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with anti-endothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ. Res.*, 73:559-568. DOI: 10.1161/01.RES.73.3.559

**Poelmann R. E., Mikawa T., Gittenberger-de Groot A. C. 1998.** Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: differentiation and apoptosis. *Dev. Dyn.*, 212(3):373-384. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3<373::AID-AJA5>3.0.CO;2-E

**Prakash S. K., Bossé Y., Muehlschlegel J. D. 2014.** A roadmap to investigate the genetic basis of bicuspid aortic valve and its complications: insights from the international BAVCon (Bicuspid Aortic Valve Consortium). *J. Am. Coll. Cardiol.*, 64:832-9. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.04.073

**Punovuori K., Malaguti M., Lowell S. 2021.** Cadherins in early neural development. *Cell. Mol. Life Sci.*, 78(9):4435-4450. DOI: 10.1007/s00018-021-03815-9

## Referencias

**Quintero-Rivera F., Xi Q. J., Keppler-Noreuil K. M., Lee J. H., Higgins A. W., Anchan R. M, et al. 2015.** MATR3 disruption in human and mouse associated with bicuspid aortic valve, aortic coarctation and patent ductus arteriosus. *Hum. Mol. Genet.*, 24(8):2375–2389. DOI: 10.1093/hmg/ddv004

**Raj A., Rifkin S. A., Andersen E., van Oudenaarden A. 2010.** Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature*, 463:913–8. DOI: 10.1038/nature08781

**Rajiah P. 2013.** CT and MRI in the evaluation of thoracic aortic diseases. *Int. J. Vasc. Med.*, 2013: 797189. DOI: 10.1155/2013/797189

**Rana M. S., Sizarov A., Chistoffels V., Moorman A. F. M. 2014.** Development of the human aortic arch system captured in an interactive three-dimensional reference model. *Am. J. Med. Genet. A.*, 164A:1372-1383. DOI: 10.1002/ajmg.a.35881

**Ray H. J., Niswander L. 2012.** Mechanisms of tissue fusion during development. *Development*, 139(10):1701-1711. DOI: 10.1242/dev.068338

**Roberts W.C. 1970.** The congenitally bicuspid aortic valve. A study of 85 autopsy cases. *Am. J. Card.*, 26:72-83. DOI: 10.1016/0002-9149(70)90761-7

**Roberts W.C. 1987a.** Congenital cardiovascular abnormalities usually silent until adulthood. En: W.C. Roberts (ed). *Adult Congenital Heart Disease*. Edit. F.A. Davis Co, Philadelphia: 631-690.

**Roberts W.C. 1987b.** Congenital coronary arterial anomalies unassociated with mayor anomalies of the heart or great vessels. En: W.C. Roberts (ed). *Adult Congenital Heart Disease*. Edit. F.A. Davis Co, Philadelphia: 583-629.

**Roberts C. S., Roberts W. C. 1991.** Dissection of the aorta associated with congenital malformation of the aortic valve. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 17(3):712-716. DOI: 10.1016/S0735-1097(10)80188-3

**Robicsek F., Thubrikar M. J., Cook J.W., Fowler B. 2004.** The congenitally bicuspid aortic valve: how does it function? Why does it fail? *Ann. Thorac. Surg.*, 77(1):177-185. DOI: 10.1016/S0003-4975(03)01249-9

**Robledo-Carmona J., Rodríguez-Bailón I., Carrasco-Chinchilla F., Fernández B., Jiménez-Navarro M., Porrás-Martin C., et al. 2013.** Hereditary patterns of bicuspid aortic valve in a hundred families. *Int. J. Cardiol.*, 168(4):3443-9. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.04.180

**Ruddy J. M., Jones J. A., Stroud R. E., Mukherjee R., Spinale F. G., Ikonomidis J. S. 2009.** Differential effects of mechanical and biological stimuli on matrix metalloproteinase promoter activation in the thoracic aorta. *Circulation*, 120:262-8. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843581

**Rueda-Martínez C., Lamas O., Mataró M. J., Robledo-Carmona J., Sánchez-Espín G., Moreno-Santos I., et al. 2017.** Fibrillin 2 is upregulated in the ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 51(1):104-11. DOI: 10.1093/ejcts/ezw277

**Russo C. F., Cannata A., Lanfranconi M., Vitali E., Garatti A., Bonacina E. 2008.** Is aortic wall degeneration related to bicuspid aortic valve anatomy in patients with valvular disease? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 136(4):937-942. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.11.072

**Sakai L. Y., Keene D. R., Glanville R. W., Bächinger H. P. 1991.** Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J. Biol. Chem.*, 266(22):14763-14770. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)98752-1

**Saliba E., Sia Y., Dore A., El Hamamsy I. 2015.** The ascending aortic aneurysm: When to intervene? *IJC Heart Vasc.*, 6:91-100. DOI: 10.1016/j.ijcha.2015.01.009

## Referencias

**Sans-Coma V., Arque J. M., Duran A. C., Cardo M., Fernandez B. 1991.** Coronary artery anomalies and bicuspid aortic valves in the Syrian hamster. *Basic Res. Cardiol.*, 86:148-53. DOI: 10.1007/BF02190547

**Sans-Coma V., Arque J. M., Duran A. C., Carda M., Fernandez B., Franco D. 1993.** The coronary arteries of the Syrian hamster, *Mesocricetus auratus* (Waterhouse 1839). *Anat. Anz.*, 175(1):53-57. DOI: 10.1016/S0940-9602(11)80239-6

**Sans-Coma V., Fernández B., Durán A. C., Thiene G., Arqué J. M., Muñoz-Chápuli R. et al. 1996.** Fusion of valve cushions as a key factor in the formation of congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters. *Anat. Rec.*, 244(4):490-498. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199604)244:4<490::AID-AR7>3.0.CO;2-Z

**Sans-Coma V., Fernández M. C., Fernández B., Duran A. C., Anderson R. H., Arque J. M. 2012.** Genetically alike Syrian hamsters display both bifoliate and trifoliate aortic valves. *J. Anat.*, 220(1):92-101. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2011.01440.x

**Satoh K., Fukumoto Y., Shimokawa H. 2011.** Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, 301(2):H287-H296. DOI: 10.1152/ajpheart.00327.2011

**Schievink W. I., Mokri B. 1995.** Familial aortocervicocephalic arterial dissections and congenitally bicuspid aortic valve. *Stroke*, 26:1935-1940. DOI: 10.1161/01.STR.26.10.1935

**Schiffmacher A. T., Adomako-Ankomah A., Xie V., Taneyhill L. A. 2018.** Cadherin-6B proteolytic N-terminal fragments promote chick cranial neural crest cell delamination by regulating extracellular matrix degradation. *Dev. Biol.*, 444:S237-S251. DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.06.018

**Schlesinger M. J., Zoll P. M., Wessler S. 1949.** The conus artery: a third coronary artery. *Am. Heart J.*, 38(6):823-836. DOI: 10.1016/0002-8703(49)90884-4

**Schussler O., Gharibeh L., Mootosamy P., Murith N., Tien V., Rougemont A. L., et al. 2021.** Cardiac neural crest cells: their rhombomeric specification, migration, and association with heart and great vessel anomalies. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 41:403-429. DOI: 10.1007/s10571-020-00863-w

**Segura A. M., Luna R. E., Horiba K., Stetler-Stevenson W. G., McAllister H. A. Jr., Willerson J. T., et al. 1998.** Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation*, 98(19 Suppl):II331-7.

**Shaner R. F. 1963.** Abnormal pulmonary and aortic semilunar valves in embryos. *Anat. Rec.*, 147(1):5-13. DOI: 10.1002/ar.1091470103

**Shi L. M., Tao J. W., Qiu X. B., Wang J., Yuan F., Xu L., et al. 2014.** GATA5 loss-of-function mutations associated with congenital bicuspid aortic valve. *Int. J. Mol. Med.*, 33(5):1219-1226. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1700

**Siu S. C., Silversides C. K. 2010.** Bicuspid aortic valve disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 55(25):2789-2800. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.12.068

**Sophocleous F., Milano E., Pontecorboli G., Chivasso P., Caputo M., Rajakaruna C., et al. 2018.** Enlightening the association between bicuspid aortic valve and aortopathy. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, 5(2):21. DOI: 10.3390/jcdd5020021

**Spicer D. E., Bridgeman J. M., Brown N. A., Mohun T. J., Anderson R. H. 2014.** The anatomy and development of the cardiac valves. *Cardiol. Young*, 24(6):1008-1022. DOI: 10.1017/S1047951114001942

**Stankunas K., Shang C., Twu K. Y., Kao S. C., Jenkins N. A., Copeland N. G., et al. 2008.** Pbx/Meis deficiencies demonstrate multigenetic origins of congenital heart disease. *Circ. Res.*, 103(7):702-709. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.175489

## Referencias

**Sutton J. P., Ho S. Y., Anderson R. H. 1995.** The forgotten interleaflet triangles: a review of the surgical anatomy of the aortic valve. *Ann. Thorac. Surg.*, 59(2):419-427. DOI: 10.1016/0003-4975(94)00893-C

**Takada Y., Fukuda A., Chiba T., Seno H. 2016.** Brg1 plays an essential role in development and homeostasis of the duodenum through regulation of Notch signaling. *Development*, 143(19):3532-3539. DOI: 10.1242/dev.141549

**Tadros T. M., Klein M. D., Shapira O. M. 2009.** Ascending aortic dilatation associated with bicuspid aortic valve: pathophysiology, molecular biology, and clinical implications. *Circulation*, 119(6):880-890. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.795401

**Takahashia M., Ikedab U., Shimadab K., Takedaa H. 1994.** Rare association of congenital bicuspid aortic valve, annuloaortic ectasia, and anomalous origin of the left circumflex coronary artery. *Cardiology*, 84(1):61-4. DOI: 10.1159/000176329

**Tejada J. G., Albarran A., Hernandez F., Jimenez S., Tascon J. C. 2001.** Anomalous coronary artery origin associated with bicuspid aortic valve in a patient with rheumatic mitral stenosis: a case report. *Angiology*, 52(9):649-52. DOI: 10.1177/000331970105200911

**Théveniau-Ruissy M., Dandonneau M., Mesba K., Ghez O., Mattei M. G., Miquerol L., et al. 2008.** The del22q11.2 candidate gene Tbx1 controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. *Circ. Res.*, 103(2):142-148. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.172189

**Thomas P. S., Sridurongrit S., Ruiz-Lozano P., Kaartinen V. 2012.** Deficient signaling via Alk2 (Acvr1) leads to bicuspid aortic valve development. *PLoS One*, 7(4):e35539. DOI: 10.1371/journal.pone.0035539

**Timmerman L. A., Grego-Bessa J., Raya A., Bertrán E., Pérez-Pomares J. M., et al. 2004.** Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac

development and oncogenic transformation. *Genes Dev.*, 18(1):99-115. DOI: 10.1101/gad.276304

**Tomanek R. J. 1996.** Formation of coronary vasculature: a brief review. *Cardiovasc. Res.*, 31(supp1):E46-E51.

**Toomer K. A., Fulmer D., Guo L., Drohan A., Peterson N., Swanson P., et al. 2017.** A role for primary cilia in aortic valve development and disease. *Dev. Dyn.*, 246(8):625-634. DOI: 10.1002/dvdy.24524

**Treasure T., Takkenberg J. J. M., Pepper J. 2014.** Surgical management of aortic root disease in Marfan syndrome and other congenital disorders associated with aortic root aneurysms. *Heart*, 100(20):1571-1576. DOI: 10.1136/heartjnl-2013-305132

**Van Engelen K., Bartelings M. M., Gittenberger-de Groot A. C., Baars M. J., Postma A. V., Bijlsma E. K, et al. 2014.** Bicuspid aortic valve morphology and associated cardiovascular abnormalities in fetal Turner syndrome: a pathomorphological study. *Fetal. Diagn. Ther.*; 36(1):59-68. DOI: 10.1159/000357706

**van Mierop L. H., Kutsche L. M. 1986.** Cardiovascular anomalies in DiGeorge syndrome and importance of neural crest as a possible pathogenetic factor. *Am. J. Cardiol.*, 58(1):133-137. DOI: 10.1016/0002-9149(86)90256-0

**Verma S., Siu S. C. 2014.** Aortic Dilatation in Patients with Bicuspid Aortic Valve. *N. Engl. J. Med.*, 370(20):1920-1929. DOI: 10.1056/NEJMra1207059

**von Gise A., Pu W. T. 2012.** Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ. Res.*, 110(12):1628-1645. DOI: /10.1161/CIRCRESAHA.111.259960

**Waldo K. L., Hutson M. R., Ward C. C., Zdanowicz M., Stadt H. A., Kumiski D., et al. 2005.** Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to

## Referencias

the arterial pole of the developing heart. *Dev. Biol.*, 281(1):78–90. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.02.012

**Waldo K. L., Kumiski D. H., Kirby M. L. 1994.** Association of the cardiac neural crest with the development of the coronary arteries in the chick embryo. *Anat. Rec.*, 239(3):315-331. DOI: 10.1002/ar.1092390310

**Waldo K. L., Miyagawa-Tomita S., Kumiski D., Kirby M. L. 1998.** Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure. *Dev. Biol.*, 196(2):129-144. DOI: 10.1006/dbio.1998.8860

**Waldo K. L., Lo C. W., Kirby M. L. 1999a.** Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Dev. Biol.*, 208(2):307-323. DOI: 10.1006/dbio.1999.9219

**Waldo K., Zdanowicz M., Burch J., Kumiski D. H., Stadt H. A., Godt R. E., et al. 1999b.** A novel role for cardiac neural crest in heart development. *J. Clin. Invest.*, 103(11):1499–507. DOI: 10.1172/JCI6501

**Wang J., Sridurongrit S., Dudas M., Thomas P., Nagy A., et al. 2005.** Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart. *Dev. Biol.*, 286(1):299–310. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.07.035

**Wang Y., Wu B., Farrar E., Lui W., Lu P., Zhang D., et al. 2017.** Notch-Tnf signalling is required for development and homeostasis of arterial valves. *Eur. Heart J.*, 38(9):675-686. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv520

**Xu Y. J., Di R. M., Qiao Q., Li X. M., Huang R. T., Xue S., et al. 2018.** GATA6 loss-of-function mutation contributes to congenital bicuspid aortic valve. *Gene*, 663:115-120. DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.018

**Yang J., Antin P., Berx G., Blanpain C., Brabletz T., Bronner M., et al. 2020.** Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 21(6):341-352. DOI: 10.1038/s41580-020-0237-9

**Yassine N. M., Shahram J. T., Body S. C. 2017.** Pathogenic mechanisms of bicuspid aortic valve aortopathy. *Front. Physiol.*, 8:687. DOI: 10.3389/fphys.2017.00687

**Zhang X., Lu Y., Wang J., He N. 2019.** Overexpression of Brg1 alleviates high glucose-induced retinal ganglion cell apoptosis through regulating Notch/Hes1 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 514(4):1160-1166. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.069



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Publicaciones originales



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Endocardial-mesenchymal transition underlies fusion of the conotruncal ridges during normal and bicuspid aortic valve development**

María Teresa Soto-Navarrete<sup>1,2</sup>, Bárbara Pozo-Vilumbrales<sup>1,2</sup>, Miguel Á. López-Unzu<sup>3</sup>, Ana Carmen Durán<sup>1,2</sup>, Miguel Such<sup>2,4</sup>, Borja Fernández<sup>1,2,5</sup>

1. Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain
2. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA-Plataforma BIONAND), Málaga, Spain
3. Spanish National Centre for Cardiovascular Research (CNIC), Madrid, Spain.
4. Departamento de Especialidades Quirúrgicas, Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, Spain.
5. Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Málaga, Spain

*In press*

### **Abstract**

**Background:** Bicuspid aortic valve (BAV) type A is the most frequent phenotype of the most common congenital heart disease. Its etiology is based on two associated morphogenetic defects during cardiac outflow tract (OFT) septation: abnormal migration of cardiac neural crest (CNC) cells, and excessive fusion of the conotruncal ridges (CRs). The aim of this study is to elucidate the mechanism involved in the fusion of the CRs that could explain the extra-fusion. Two mechanisms have been proposed: endocardial apoptosis and endocardial-mesenchymal transition (EMT).

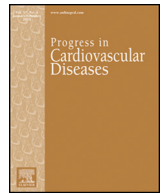
**Results:** Apoptotic cells were absent in the fusion area of CRs. However, we detected endocardial cells (CD34<sup>+</sup>;VE-Cadherin<sup>+</sup>) showing positive signals for migration markers ( $\alpha$ -actin<sup>+</sup>) in the fusion area of the CRs of both normal and BAV embryos. These cells showed an intermediate morphological phenotype between endocardial and mesenchymal cells.

**Conclusions:** The findings clearly indicate that EMT, and not apoptosis, is the cellular mechanism underlying the normal and excessive fusion of CRs that give rise to TAV and BAV. Furthermore, our results show that the fusion of CRs in BAV embryos continue after the OFT septation, suggesting over-induction of EMT by abnormally distributed CNC cells.

**Keywords:** bicuspid aortic valve, conotruncal ridge, fusion, endocardial-mesenchymal transition, hamster



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# Embryonic development of bicuspid aortic valves

María Teresa Soto-Navarrete <sup>a,b</sup>, Miguel Ángel López-Unzu <sup>a,b</sup>, Ana Carmen Durán <sup>a,b</sup>, Borja Fernández <sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain

<sup>c</sup> CIBERCV Enfermedades Cardiovasculares, Málaga, Spain

## ABSTRACT

**Keywords:**  
 Bicuspid aortic valve  
 Development  
 Animal model  
 Cardiac neural crest  
 Epithelial-mesenchymal transition  
 Review

Bicuspid aortic valve (BAV) is the most common congenital cardiac malformation, frequently associated with aortopathies and valvulopathies. The congenital origin of BAV is suspected to impact the development of the disease in the adult life. During the last decade, a number of studies dealing with the embryonic development of congenital heart disease have significantly improved our knowledge on BAV etiology. They describe the developmental defects, at the molecular, cellular and morphological levels, leading to congenital cardiac malformations, including BAV, in animal models. These models consist of a spontaneous hamster and several mouse models with different genetic manipulations in genes belonging to a variety of pathways. In this review paper, we aim to gather information on the developmental defects leading to BAV formation in these animal models, in order to tentatively explain the morphogenetic origin of the spectrum of valve morphologies that characterizes human BAV.

BAV may be the only defect resulting from gene manipulation in mice, but usually it appears as the less severe defect of a spectrum of malformations, most frequently affecting the cardiac outflow tract. The genes whose alterations cause BAV belong to different genetic pathways, but many of them are direct or indirectly associated with the NOTCH pathway. These molecular alterations affect three basic cellular mechanisms during heart development, i.e., endocardial-to-mesenchymal transformation, cardiac neural crest (CNC) cell behavior and valve cushion mesenchymal cell differentiation. The defective cellular functions affect three possible morphogenetic mechanisms, i.e., outflow tract endocardial cushion formation, outflow tract septation and valve cushion excavation. While endocardial cushion abnormalities usually lead to latero-lateral BAVs and septation defects to antero-posterior BAVs, alterations in cushion excavation may give rise to both BAV types. The severity of the original defect most probably determines the specific aortic valve phenotype, which includes commissural fusions and raphes.

Based on current knowledge on the developmental mechanisms of the cardiac outflow tract, we propose a unified hypothesis of BAV formation, based on the inductive role of CNC cells in the three mechanisms of BAV development. Alterations of CNC cell behavior in three possible alternative key valvulogenic processes may lead to the whole spectrum of BAV.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

Introduction . . . . .	408
Normal formation of the aortic valve . . . . .	408
Mechanisms of BAV formation . . . . .	411
1. Endocardial cushion formation defects . . . . .	411
1.1 Alterations in EMT . . . . .	412
1.2 Alterations in CNC migration/aggregation . . . . .	412
2. Outflow tract septation defects. . . . .	414

Abbreviations: BAV, Bicuspid aortic valve; CNC, Cardiac neural crest; CR, Conotruncal ridge; EMT, Endocardial-to-mesenchymal transformation; FHF, First heart field; IC, Intercalated cushion; L-NC, Fusion of left and non-coronary leaflets; OFT, Outflow tract; R-L, Fusion of right and left leaflets; R-NC, Fusion of right and non-coronary leaflets; SHF, Second heart field; TAV, Tricuspid aortic valve.

\* Corresponding author at: Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain.

E-mail address: [borjafe@uma.es](mailto:borjafe@uma.es) (B. Fernández).

<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2020.06.008>

0033-0620/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Bicuspid Aortic Valve in 2 Model Species and Review of the Literature

Veterinary Pathology  
2020, Vol. 57(2) 321-331  
© The Author(s) 2020  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/0300985819900018  
journals.sagepub.com/home/vet



Borja Fernández<sup>1,2,3</sup> , María Teresa Soto-Navarrete<sup>1,2</sup>,  
Alejandro López-García<sup>1</sup>, Miguel Ángel López-Unzu<sup>1,2</sup>,  
Ana Carmen Durán<sup>1,2</sup>, and M. Carmen Fernández<sup>1,2</sup>

## Abstract

Bicuspid aortic valve (BAV) is the most common human congenital cardiac malformation. Although the etiology is unknown for most patients, formation of the 2 main BAV anatomic types (A and B) has been shown to rely on distinct morphogenetic mechanisms. Animal models of BAV include 2 spontaneous hamster strains and 27 genetically modified mouse strains. To assess the value of these models for extrapolation to humans, we examined the aortic valve anatomy of 4340 hamsters and 1823 mice from 8 and 7 unmodified strains, respectively. In addition, we reviewed the literature describing BAV in nonhuman mammals. The incidences of BAV types A and B were 2.3% and 0.03% in control hamsters and 0% and 0.3% in control mice, respectively. Hamsters from the spontaneous model had BAV type A only, whereas mice from 2 of 27 genetically modified strains had BAV type A, 23 of 27 had BAV type B, and 2 of 27 had both BAV types. In both species, BAV incidence was dependent on genetic background. Unlike mice, hamsters had a wide spectrum of aortic valve morphologies. We showed interspecific differences in the occurrence of BAV between humans, hamsters, and mice that should be considered when studying aortic valve disease using animal models. Our results suggest that genetic modifiers play a significant role in both the morphology and incidence of BAV. We propose that mutations causing anomalies in specific cardiac morphogenetic processes or cell lineages may lead to BAV types A, B, or both, depending on additional genetic, environmental, and epigenetic factors.

## Keywords

anatomy, bicuspid aortic valve, congenital heart defects, etiology, hamsters, mouse, quadricuspid aortic valve, review

In mammals, the aortic valve prevents the blood backflow from the aorta to the left ventricle. The normal condition, so-called tricuspid aortic valve, is characterized by the presence of 3 aortic sinuses—right, left, and dorsal (posterior in humans)—each supporting 1 leaflet (or cusp). Nevertheless, an alternative number of leaflets can exist, being considered a cardiac anomaly or malformation. This is the case of the bicuspid aortic valve (BAV), which has 2 sinuses and 2 corresponding leaflets.<sup>2,29</sup> BAV is the most frequent congenital cardiac malformation in humans, with an incidence of 0.5% to 2% in the general population.<sup>3,21,46</sup> BAV is clinically relevant because most affected patients develop functional valve defects and/or aortopathies during their lifetime.<sup>62</sup> In addition, the occurrence of BAV is frequently associated with other congenital cardiac malformations, such as ventricular septal defect or aortic coarctation.<sup>13,25,36</sup> Overall, it has been estimated that BAV disease is responsible for more human deaths than the sum of all the other congenital cardiac malformations.<sup>66</sup>

Three different types of BAV have been distinguished<sup>48</sup> depending on the spatial orientation of the anatomical elements (Fig. 1). BAV type A or anteroposterior is the most frequent

type in humans (~74%). It shows 2 leaflets and 2 sinuses located at the anterior and posterior halves of the aortic root. BAV type A is also called right/left (R/L) BAV because it is the result of the anatomical fusion of the normal right and left developing leaflets to form the anterior leaflet. The remaining 2 types of BAV have 2 leaflets and 2 sinuses located at the right and left halves of the aortic root (latero-lateral BAV). They are the result of the anatomical fusion of the right and noncoronary (type B or right/noncoronary “R/N”) or the left and noncoronary (type C or left/noncoronary “L/N”) developing leaflets. BAV types B and C are less frequent in humans (B, ~24%; C, ~2%).

<sup>1</sup>Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

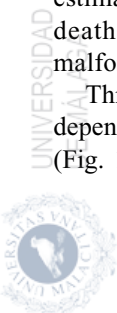
<sup>2</sup>Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, Spain

<sup>3</sup>CIBERCV Enfermedades Cardiovasculares, Málaga, Spain

## Corresponding Author:

Borja Fernández Corujo, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Málaga, 29071, Málaga, Spain.

Email: borjafec@uma.es





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Constance G. Weismann,  
Lund University, Sweden

## REVIEWED BY

Vidu Garg,  
Nationwide Children's Hospital,  
United States  
Yongshi Wang,  
Fudan University, China  
Simon Body,  
Boston University, United States  
Laura Galian-Gay,  
Vall d'Hebron University Hospital, Spain

## \*CORRESPONDENCE

Jorge Rodríguez-Capitán  
capijorge@hotmail.com

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Heart Valve Disease,  
a section of the journal  
Frontiers in Cardiovascular Medicine

RECEIVED 25 April 2022

ACCEPTED 19 July 2022

PUBLISHED 08 August 2022

## CITATION

Soto-Navarrete MT,  
Pozo-Vilumbrales B, López-Unzu MÁ,  
Rueda-Martínez C, Fernández MC,  
Durán AC, Pavón-Morón FJ,  
Rodríguez-Capitán J and Fernández B  
(2022) Experimental evidence of the  
genetic hypothesis on the etiology  
of bicuspid aortic valve aortopathy  
in the hamster model.  
*Front. Cardiovasc. Med.* 9:928362.  
doi: 10.3389/fcvm.2022.928362

## COPYRIGHT

© 2022 Soto-Navarrete,  
Pozo-Vilumbrales, López-Unzu,  
Rueda-Martínez, Fernández, Durán,  
Pavón-Morón, Rodríguez-Capitán and  
Fernández. This is an open-access  
article distributed under the terms of  
the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution  
or reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Experimental evidence of the genetic hypothesis on the etiology of bicuspid aortic valve aortopathy in the hamster model

María Teresa Soto-Navarrete<sup>1,2</sup>, Bárbara Pozo-Vilumbrales<sup>1,2</sup>, Miguel Ángel López-Unzu<sup>1,2,3</sup>, Carmen Rueda-Martínez<sup>1</sup>, M. Carmen Fernández<sup>1,2,4</sup>, Ana Carmen Durán<sup>1,2</sup>, Francisco Javier Pavón-Morón<sup>2,5,6</sup>, Jorge Rodríguez-Capitán<sup>2,5,6\*</sup> and Borja Fernández<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas de Málaga y Plataforma en Nanomedicina, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, <sup>3</sup>Spanish National Centre for Cardiovascular Research, Madrid, Spain, <sup>4</sup>Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, <sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Málaga, Spain, <sup>6</sup>Unidad de Gestión Clínica del Corazón, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain

Bicuspid aortopathy occurs in approximately 50% of patients with bicuspid aortic valve (BAV), the most prevalent congenital cardiac malformation. Although different molecular players and etiological factors (genetic and hemodynamic) have been suggested to be involved in aortopathy predisposition and progression, clear etiopathological mechanisms of disease are still missing. The isogenic (genetically uniform) hamster (T) strain shows 40% incidence of BAV, but aortic dilatations have not been detected in this model. We have performed comparative anatomical, histological and molecular analyses of the ascending aorta of animals with tricuspid aortic valve (TAV) and BAV from the T strain (TTAV and TBAV, respectively) and with TAV from a control strain (HTAV). Aortic diameter, smooth muscle apoptosis, elastic waviness, and *Tgf-β* and *Fbn-2* expression were significantly increased in T strain animals, regardless of the valve morphology. Strain and aortic valve morphology did not affect *Mmp-9* expression, whereas *Mmp-2* transcripts were reduced in BAV animals. eNOS protein amount decreased in both TBAV and TTAV compared to HTAV animals. Thus, histomorphological and molecular alterations of the ascending aorta appear in a genetically uniform spontaneous hamster model irrespective of the aortic valve morphology. This is a direct experimental evidence supporting the genetic association between BAV and aortic dilatation. This model may represent a population of patients with predisposition to BAV aortopathy, in which increased expression of *Tgf-β* and *Fbn-2* alters elastic lamellae structure



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## SPONTANEOUSLY ARISING DISEASE

# The Bicuspid Condition of the Aortic Valve Does Not Alter the Incidence of Accessory Coronary Artery Ostia in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*)

M. C. Fernández<sup>\*,†</sup>, M. T. Soto-Navarrete<sup>\*,†</sup>, A. C. Durán<sup>\*,†</sup>,  
V. Sans-Coma<sup>\*,†</sup> and B. Fernández<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>\*</sup> Department of Animal Biology, Faculty of Science, <sup>†</sup> Biomedical Research Institute of Málaga, University of Málaga and <sup>‡</sup> CIBERCV Enfermedades Cardiovasculares, Málaga, Spain

## Summary

In man and Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), the prevalence of anomalies in the origin of the coronary arteries is significantly higher in individuals with bicuspid than with normal aortic valves. In hamsters, the incidence of accessory ostia is similar in individuals with normal and anomalous coronary arteries, all of them possessing a normal (tricuspid) aortic valve. In order to evaluate whether or not the presence of bicuspid aortic valves alters the incidence of accessory ostia, 1,050 hearts from hamsters with bicuspid valves were examined. In 594 of them the coronary arteries were normal. The remaining 456 hearts showed coronary artery anomalies characterized by the absence of any artery arising from the left side of the valve. The incidence of accessory ostia was 3.9% in hamsters with normal coronary arteries and 2.2% in those with anomalous coronary patterns. Overall, 3.1% of the accessory ostia were associated with a septal artery and another 0.2% with a conal artery. These data referring to the bicuspid valves were compared with those already published on normal valves. The results of statistical analyses showed that having a bicuspid aortic valve does not alter the incidence of accessory coronary ostia. In the set of tricuspid and bicuspid valves, the incidence of accessory ostia was significantly lower on the left side than on the right side of the valve. This, together with the fact that in the present animal model the coronary anomalies were characterized by the absence of arteries on the left side of the valve, suggests that the embryonic region corresponding to the left side of the aortic valve primordium is particularly associated with preventing the normal development of coronary vessels.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** accessory coronary ostium; bicuspid aortic valve; coronary artery anomaly; Syrian hamster

## Introduction

In mammals there are usually two coronary arteries, right and left, originating from the right and left sinuses of the aortic valve, respectively. Occurrence of accessory, or supernumerary coronary artery ostia, coexisting with the right and left coronary orifices has been reported in man and several non-human mammalian species (Durán *et al.*, 2007a). Knowledge

of the presence of such ostia and the cardiac regions supplied by the vessels originating from them is of interest, because it provides information on the establishment of the coronary artery system in each species. In addition, it can aid in assessing the possible morphogenetic defects implicated in the development of congenital anomalies in the origin of the coronary arteries.

Durán *et al.* (2007b) reported the presence of accessory coronary artery ostia in Syrian hamsters

Correspondence to: B. Fernández (e-mail: [borjafe@uma.es](mailto:borjafe@uma.es)).