

Original

# Niveles de quinasa ligada a la integrina endotelial y calcificación valvular: estudio molecular de la calcificación en la estenosis valvular aórtica



Mercedes Castro-Pinto<sup>a,b,\*</sup>, José López-Menéndez<sup>a</sup>, Sandra Sánchez-Esteban<sup>c,d</sup>, Ignacio Hernández<sup>d,e</sup>, Paula Reventún<sup>c,d</sup>, Jorge Rodríguez-Roda<sup>a</sup>, Carlos Zaragoza<sup>d,e</sup> y Marta Saura<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Servicio de adultos de Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

<sup>b</sup> Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España

<sup>c</sup> Universidad de Alcalá, Departamento Biología de Sistemas / Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Alcalá de Henares, Madrid, España

<sup>d</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, España

<sup>e</sup> Unidad de Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 27 de mayo de 2022

Aceptado el 19 de julio de 2022

On-line el 19 de agosto de 2022

### Palabras clave:

Estenosis aórtica

Calcificación

Quinasa ligada a la integrina

Óxido nítrico

Disfunción endotelial

## R E S U M E N

**Introducción y objetivos:** La quinasa ligada a integrina (ILK) endotelial controla la producción del óxido nítrico, modulando señales de transducción al interior celular. La disminución de ILK endotelial se ha relacionado con la calcificación valvular. Analizamos la asociación de la ILK con la calcificación de la válvula aórtica.

**Métodos:** Estudio observacional, unicéntrico y prospectivo. Recogimos tejido valvular aórtico de pacientes intervenidos de estenosis aórtica, y controles de válvulas no calcificadas. Cuantificamos los niveles de ILK endotelial empleando técnicas de análisis molecular, así como marcadores de crecimiento óseo (BMP2 y RUNX2). Para el control de factores de confusión empleamos regresión logística múltiple por pasos, introduciendo parámetros relacionados con la aterosclerosis y calcificación valvular (edad, DM, HTA, insuficiencia renal).

**Resultados:** Obtuvimos muestras de 75 pacientes y 28 controles. El 69,9% eran varones, la edad media fue de 67 años (DE 9,59 años). Los niveles de ILK fueron significativamente más bajos en válvulas patológicas que en controles (0,96 vs. 0,76;  $p < 0,001$ ). Existió correlación lineal negativa significativa entre la ILK y la calcificación valvular (coeficiente de Pearson =  $-0,35$ ;  $p = 0,002$ ). En el modelo multivariante, ILK presentó una asociación significativa con la calcificación valvular (OR 0,068;  $p < 0,001$ ), así como la DM (OR 11,80;  $p = 0,03$ ). Observamos un aumento de marcadores de crecimiento óseo según avanzaba la calcificación, con correlación inversa significativa de ILK y BMP2 ( $R = -0,417$ ;  $p < 0,001$ ) y RUNX2 ( $R = -0,587$ ;  $p < 0,001$ ).

**Conclusiones:** La disminución de la expresión endotelial de ILK puede influir en la calcificación de la válvula aórtica, marcando el inicio del proceso de transdiferenciación del endotelio valvular a tejido con capacidad osteogénica.

© 2022 Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular y Endovascular. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Endothelial integrin-linked kinase and valvular calcification: Molecular study of calcification in aortic valve

### A B S T R A C T

### Keywords:

Aortic stenosis

Calcification

Integrin-linked kinase

Nitric oxide

Endothelial dysfunction

**Introduction and objectives:** The endothelial integrin-linked kinase (ILK) controls the production of nitric oxide, modulating transduction signals of mechanical stress in the cell. Decreased endothelial ILK has been related to valve calcification. We analyzed the association of ILK expression with aortic valve calcification.

**Methods:** Observational, single-center and prospective study. Aortic valve tissue samples were obtained from patients with aortic stenosis, and controls for non-calcified aortic valves. Endothelial ILK levels were quantified using molecular analysis techniques, as well as bone growth markers (BMP2 and RUNX2). Stepwise multiple logistic regression was used to control for confounding factors, introducing clinical parameters related to atherosclerosis and valve calcification (age, DM, HBP, kidney failure).

**Results:** Samples from 75 patients with aortic stenosis, and 28 controls were obtained. A percentage of 69.9 were men, mean age 67 years (SD 9.59 years). ILK levels were significantly lower in diseased valves than in controls (0.96 vs. 0.76;  $P < .001$ ). There was a significant negative linear correlation between ILK and degree of valve calcification (Pearson linear correlation coefficient =  $-0.35$ ;  $P = .002$ ). In the multivariate model, ILK was significantly associated with valve calcification (OR adjusted 0.068;  $P < .001$ ), as well

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [MLcp18@gmail.com](mailto:MLcp18@gmail.com) (M. Castro-Pinto).

as DM (OR 11.80;  $P = .03$ ). In addition, an increase in bone growth markers was observed as calcification progressed, with a significant inverse correlation between ILK and BMP2 ( $R = -0.417$ ;  $P < .001$ ) and RUNX2 ( $R = -0.587$ ;  $P < .001$ ).

**Conclusions:** The decrease in the endothelial expression of ILK may influence the calcification of the aortic valve, marking the beginning of the process of transdifferentiation of the valvular endothelium to tissue with osteogenic capacity.

© 2022 Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular y Endovascular. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

La estenosis de la válvula aórtica es la valvulopatía más prevalente en la población adulta, y alrededor del 80% de los casos son debidos a degeneración calcificada<sup>1</sup>, seguidos de la enfermedad reumática y la valvulopatía bicúspide congénita. En mayores de 65 años, la esclerosis valvular aórtica está presente en un 29% de la población, con una tasa de progresión a estenosis aórtica de 1,7% al año<sup>2</sup>.

Se ha relacionado la disfunción del endotelio valvular con el inicio de la inflamación, el acúmulo de lípidos y el inicio de la calcificación valvular. La quinasa ligada a la integrina (ILK) es una proteína endotelial cuya presencia se ha relacionado con la preservación de esta función endotelial<sup>3</sup>.

La ILK es una serina/treonina que interactúa con la integrina beta-1 y se expresa ampliamente en tejidos de mamíferos. Desempeña funciones importantes en la transducción de señales inducida por la interacción entre las células y la matriz extracelular. Es una proteína clave mecanosensible que controla la producción endotelial de óxido nítrico (ON)<sup>4,5</sup>. La ILK endotelial protege y promueve la producción fisiológica del ON y previene la disfunción endotelial. Los mecanismos por los que la ILK influye en la calcificación valvular aún no han sido completamente esclarecidos.

En el siguiente estudio, analizaremos la relación de la expresión endotelial de la ILK a nivel valvular con el desarrollo de la calcificación de la válvula aórtica, en pacientes intervenidos de sustitución valvular aórtica calcificada, así como de un grupo de controles sin calcificación valvular.

## Métodos

### Población a estudio

Estudio observacional de cohortes prospectivo, unicéntrico, realizado en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, desde enero del 2019 hasta diciembre del 2020. Se analizaron válvulas aórticas humanas obtenidas de pacientes intervenidos de sustitución valvular aórtica por estenosis aórtica severa calcificada.

Como grupo de control se incluyeron aquellos pacientes intervenidos de insuficiencia aórtica severa no calcificada.

Criterios de inclusión:

1. Todo paciente intervenido de sustitución de válvula aórtica por estenosis aórtica severa o insuficiencia aórtica severa no candidata a reparación valvular, asociadas o no a otra enfermedad cardíaca.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes menores de 18 años.
2. Pacientes con sustitución previa de válvula aórtica.
3. Pacientes intervenidos por endocarditis de válvula aórtica o alguna otra válvula.

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal autorizó la realización del presente estudio, quedando reflejado en acta 356 el 17/12/2018. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y de forma individual.

### Características clínicas y cardiológicas

Las características demográficas, clínicas y cardiológicas fueron recogidas de manera prospectiva en el momento de la intervención en la base de datos del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

### Estudio proteico de las válvulas aórticas

Las proteínas se obtuvieron del lisado completo de la válvula aórtica. Las secciones se disgregaron mecánicamente con tampón de lisis para la liberación del contenido proteico, y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de ILK y de los marcadores de calcificación RUNX2 y BMP2 mediante la técnica Western Blot. En resumen, se separaron  $15\ \mu\text{g}$  de proteínas en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Para la detección de proteínas, las membranas se bloquearon durante una hora en BSA al 5% en tampón TTBS, y se incubaron con anticuerpos específicos toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras varios lavados, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario durante una hora. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron con el Pierce™ ECL Western Blotting Substrate según los procedimientos del fabricante (Pierce, Waltham, MA, EE. UU.). La cuantificación de las bandas se realizó usando el *software* ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU.), normalizando los niveles de expresión de las proteínas de interés respecto al control de carga utilizado. Cada muestra se analizó como mínimo por triplicado.

### Clasificación ecocardiográfica de la calcificación valvular

Se realizó la valoración cualitativa mediante ecocardiografía transtorácica del grado de calcificación valvular aórtica. Las calcificaciones de las valvas aórticas se describieron empleando una escala ecocardiográfica ordinal validada, siguiendo el esquema de Bahler et al.<sup>6</sup> mediante la observación de la válvula aórtica en el eje corto paraesternal. La gradación de la calcificación se estableció de acuerdo con la citada escala en 6 grados:

- Grado 1: sin calcificación.
- Grado 2: área localizada con calcificación, sin áreas de calcificación densa.
- Grado 3: marcado aumento de calcificación en uno de los velos.
- Grado 4: aumento notable de calcificación en 2 de los velos.
- Grado 5: con aumento moderado de la calcificación en los 3 velos.
- Grado 6: marcada calcificación en los 3 velos.

Por otro lado, para realizar el análisis univariante, se generó una variable dicotómica en función de la presencia o no de calcificación valvular intensa. Se consideraron como válvulas con calcificación intensa todas las válvulas con calcificación en al menos 2 de los velos de la válvula aórtica (grados 4, 5 y 6).

#### Variables analizadas

Se recogieron datos demográficos y características clínicas preoperatorias (hipertensión arterial [HTA], enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus [DM], presencia y severidad de hipertensión pulmonar, antecedentes de insuficiencia renal, arritmias auriculares, enfermedad coronaria asociada, enfermedad valvular concomitante). Además, se obtuvieron datos ecocardiográficos preoperatorios (función ventricular izquierda, gradiente transvalvular medio y máximo de la válvula aórtica, área de la válvula aórtica indexada y grado de calcificación).

Se analizó la expresión de ILK, BMP2 y RUNX2 en los pacientes con válvulas calcificadas y no calcificadas.

#### Definición de variables

- Función ventricular izquierda, considerando la fracción de eyección del ventrículo izquierdo como normal cuando era mayor o igual a 55%.
- La presión arterial pulmonar sistólica se estimó de forma indirecta por parámetros ecocardiográficos, considerándose hipertensión pulmonar leve si la presión pulmonar sistólica era mayor de 35 mmHg, moderada si era mayor de 40 mmHg y severa si era mayor de 55 mmHg.
- Enfermedad hepática, considerada en aquellos pacientes que presentaban insuficiencia hepática diagnosticada previamente, o hepatitis B o C.
- Enfermedad renal, considerada en aquellos pacientes que presentaban insuficiencia renal crónica diagnosticada previamente.
- Estenosis aórtica severa, se consideró severa cuando el gradiente transvalvular máximo era igual o > 80 mmHg o el gradiente transvalvular medio era igual o > 40 mmHg, o un área valvular aórtica indexada < 0,6 cm<sup>2</sup>.
- Insuficiencia aórtica severa; se consideró severa cuando la vena contracta era ≥ 6 mm o cuando el flujo inverso en la aorta descendente era holodiastólico.
- La estimación de riesgo quirúrgico se realizó mediante las escalas de riesgo EuroSCORE I logístico y EuroSCORE II.
- Dislipidemia: considerada en aquellos pacientes previamente diagnosticados de dislipidemia.

#### Objetivos del estudio

- Estudiar la correlación de la expresión de la ILK con la calcificación valvular.
- Estudiar la correlación de la proteína morfogenética ósea con la calcificación valvular.
- Estudiar la correlación de la expresión de marcadores osteogénicos como RUNX2 con la calcificación valvular.

#### Análisis estadístico

Todos los pacientes seleccionados en el estudio y evaluables según los criterios de inclusión y exclusión fueron considerados en el análisis.

Los datos fueron analizados utilizando el *software* estadístico Stata 14 (StataCorp. LP, College Station, TX, EE. UU.). Los datos estadísticos descriptivos se expresaron con un intervalo de confianza del 95%.

**Tabla 1**  
Características clínicas y cardiológicas, y comorbilidades preoperatorias

Variable	Valor
<i>Características y comorbilidades</i>	
Edad (años), media (DE)	67 (12,61)
Sexo masculino, n (%)	72 (69,90)
Diabetes mellitus, n (%)	27 (26,21)
Dislipidemia, n (%)	54 (52,43)
Enfermedad vascular periférica, n (%)	19 (18,45)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, n (%)	17 (16,50)
Enfermedad hepática, n (%)	3 (2,91)
Insuficiencia renal, n (%)	11 (10,68)
Disfunción sistólica de VI, n (%)	50 (48,54)
Hipertensión arterial, n (%)	70 (67,96)
Insuficiencia cardíaca congestiva, n (%)	15 (14,56)
Enfermedad coronaria, n (%)	16 (15,53)
Clase funcional de la NYHA III-IV, n (%)	51 (49,52)
Hipertensión pulmonar, n (%)	44 (42,72)
Fibrilación auricular preoperatoria, n (%)	24 (23,30)
QxVM concomitante, n (%)	15 (14,56)
QxVT concomitante, n (%)	6 (5,82)
Qx aorta concomitante, n (%)	18 (17,48)
EuroSCORE I logístico, media (DE)	8,47 (8,77)
EuroSCORE II, media (DE)	4,67 (6,6)

DE: desviación estándar; NYHA: New York Heart Association; VI: ventrículo izquierdo.

Las variables categóricas fueron descritas mediante distribuciones de frecuencias absolutas y relativas y se compararon mediante el test de chi cuadrado o el test de Fischer, según la frecuencia observada en las tablas de contingencia.

Las variables continuas con distribución normal fueron descritas utilizando la media y la desviación estándar; las variables no normales se expresaron con la mediana y el rango intercuartílico. Para analizar la correlación de variables numéricas se utilizó el test de Pearson para variables con distribución normal y el test de Spearman para variables con distribución no normal.

Para analizar las comorbilidades relacionadas con la calcificación valvular y el control de factores de confusión se empleó la regresión logística múltiple por pasos. Se creó un modelo multivariante, introduciendo para el control de posibles factores de confusión aquellas variables que *a priori* tienen plausibilidad biológica relacionadas con la calcificación valvular. Se generó un modelo multivariante en el que se incluyó la edad, el grado de calcificación, los niveles de ILK y comorbilidades relacionadas con la aterosclerosis y la calcificación valvular como son la DM, la HTA, la dislipidemia y la insuficiencia renal.

Se consideraron como valores significativos aquellos cuya probabilidad fuera menor del 5% ( $p < 0,05$ ). Se realizó el cálculo de la potencia estadística a través de un test de medias de variables independientes, obteniendo una potencia del 99%.

## Resultados

### Características clínicas preoperatorias y comorbilidades

Durante el periodo de estudio se incluyeron un total de 103 pacientes, 75 con estenosis aórtica y 28 con insuficiencia aórtica.

Las características clínicas y cardiológicas y las comorbilidades preoperatorias más relevantes se presentan en la [tabla 1](#). El 69,90% eran varones y la edad media de 67 años (DE 9,59). Las comorbilidades más prevalentes fueron la HTA (67,96%), la DM (26,21%) y la dislipidemia (52,43%).

El 87,38% se encontraban en clase funcional II-III de la NYHA, y un 9,71% se encontraba en clase funcional IV de la NYHA.

La etiología con mayor incidencia fue la degenerativa calcificada, presente en 63 pacientes (61,17%), seguida de la valvulopatía reumática, presente en 6 pacientes (5,83%), y bicúspide en 6 pacientes

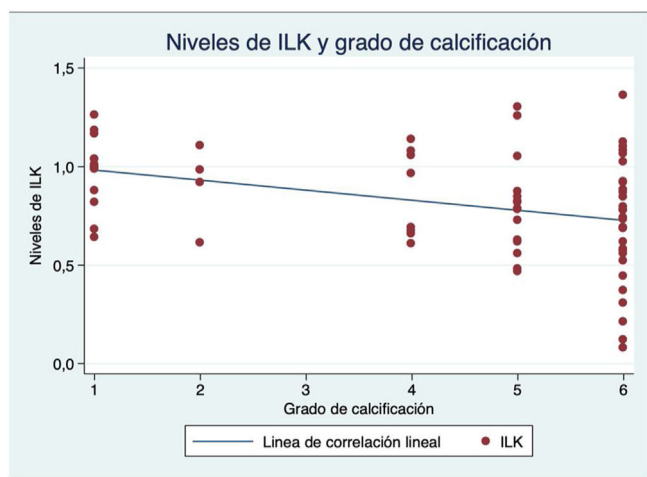
**Tabla 2**  
Etiología de la estenosis aórtica y niveles medios de quinasa ligada a integrina

Etiología	Niveles medios de ILK
Degenerativa calcificada	0,74
Reumática	0,92
Bicúspide	0,87
Insuficiencia aórtica (control)	0,93

ILK: quinasa ligada a integrina.

**Tabla 3**  
Clasificación ecocardiográfica de la calcificación valvular

Grado de calcificación	n (%)
1	21 (21,65)
2	6 (6,19)
3	3 (3,09)
4	13 (13,40)
5	16 (16,49)
6	38 (39,18)



**Figura 1.** Correlación entre niveles de ILK y grado de calcificación.

(5,83%). Los niveles medios de ILK se encuentran reflejados en la [tabla 2](#).

Los grados de calcificación se presentan en la [tabla 3](#).

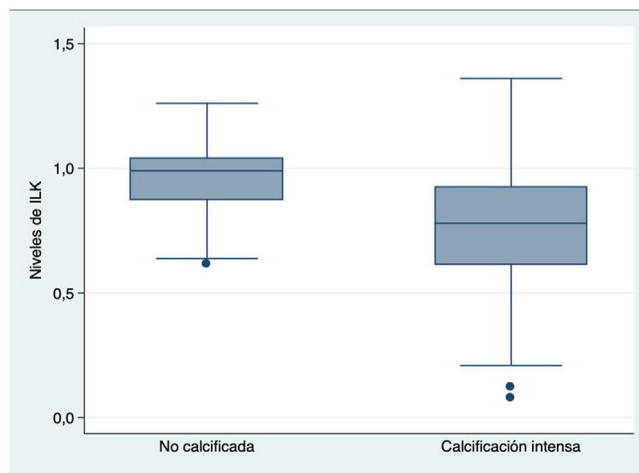
Los niveles de ILK medios en las muestras obtenidas fueron de 0,82, comparados con la proteína basal, con un rango desde 0,31 a 1,36. Existió una correlación lineal negativa significativa entre la ILK y el grado ordinal de calcificación valvular por ecocardiografía (coeficiente de correlación lineal de Pearson =  $-0,35$ ,  $p = 0,002$ ) ([fig. 1](#)).

Los niveles medios de ILK fueron significativamente más bajos en las válvulas con calcificación intensa que en las válvulas sin calcificación intensa (0,76 vs. 0,96;  $p < 0,001$ ) ([fig. 2](#)), principalmente en las válvulas de etiología degenerativa calcificada con niveles medios de ILK de 0,74, en relación con las otras etiologías previamente descritas.

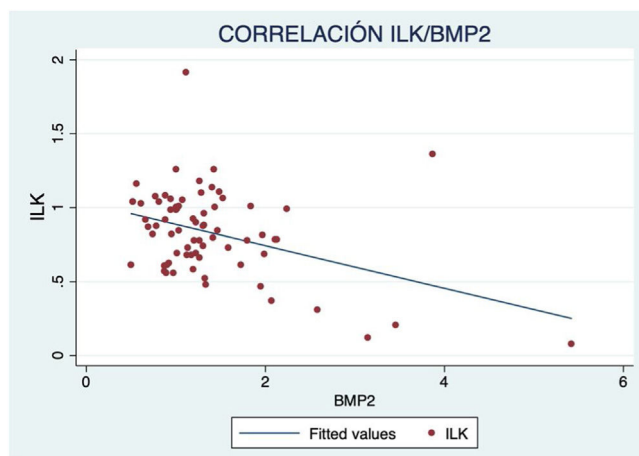
Esta diferencia en los niveles de ILK se mantenía a pesar del ajuste por posibles factores de confusión (edad, HTA, DM, insuficiencia renal y dislipidemia).

En el modelo multivariante en el que se incluyeron la edad, el grado de calcificación, los niveles de ILK, DM, HTA, dislipidemia e insuficiencia renal, la ILK presentó una asociación significativa con la calcificación valvular (OR ajustada 0,068;  $p < 0,001$ ).

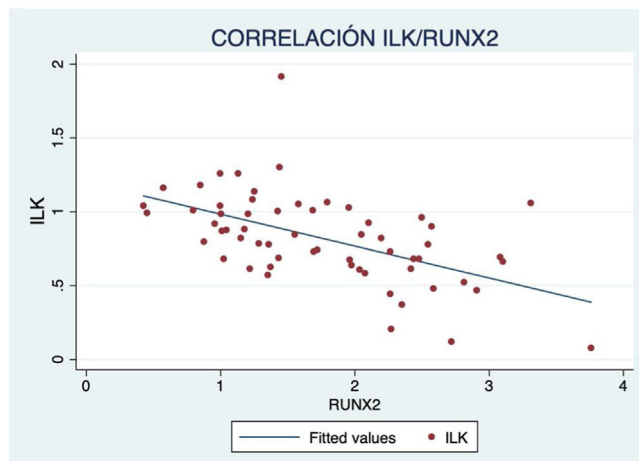
Además, se observó un aumento de marcadores de crecimiento óseo según avanzaba el grado de calcificación, con correlación inversa significativa de ILK y BMP2 ( $R = -0,417$ ;  $p < 0,001$ ) ([fig. 3](#)) y RUNX2 ( $R = -0,587$ ;  $p < 0,001$ ) ([fig. 4](#)).



**Figura 2.** Niveles de ILK. Los niveles de ILK fueron significativamente menores en las válvulas con calcificación intensa (0,96 vs. 0,76;  $p < 0,001$ ).



**Figura 3.** Correlación ILK/BMP2 ( $R = -0,417$ ;  $p < 0,001$ ).



**Figura 4.** Correlación ILK/RUNX2 ( $R = -0,587$ ;  $p < 0,001$ ).

## Discusión

Los mecanismos moleculares por los que acontece la calcificación de la válvula aórtica aún no son bien conocidos; en el siguiente estudio hemos relacionado la disminución de la ILK en el endotelio valvular con la etiopatogenia de la calcificación valvular y la trans-

diferenciación celular a células con capacidad osteogénica. La ILK es una proteína mecanosensible, implicada en la transducción de señales de estrés a través del endotelio. En el presente estudio analizamos la correlación de la ILK en el proceso de la calcificación de la válvula aórtica en la estenosis aórtica degenerativa, y observamos en nuestra muestra que los niveles de ILK eran menores en las muestras calcificadas que en los controles (0,76 vs. 0,96;  $p < 0,001$ ), lo que puede confirmar esta etiopatogenia de la estenosis valvular aórtica.

A lo largo del tiempo, la calcificación de la válvula aórtica se ha considerado consecuencia del envejecimiento, y aunque los mecanismos de la calcificación de la válvula aórtica siguen siendo desconocidos, en la actualidad se considera la calcificación de la válvula como un proceso activo de osificación, en el que la matriz extracelular valvular pierde su arquitectura debido a un daño en el endotelio<sup>7</sup>.

Se estima que la estenosis aórtica por calcificación valvular aórtica afecta a en torno al 2% de la población mayor de 65 años<sup>8</sup>, y probablemente esta incidencia tienda a aumentar por el envejecimiento de la población.

En primer lugar, es importante resaltar la estructura de los velos de la válvula aórtica, que se componen de una capa externa de células endoteliales valvulares, que está en continuidad con el endotelio de la aorta y el endocardio del ventrículo izquierdo, y 3 capas internas, compuestas por células intersticiales valvulares conocidas como capa fibrosa, capa esponjosa y capa ventricularis. Las células intersticiales valvulares *in situ* tienen características de fibroblastos en reposo, pero una vez activadas, pueden diferenciarse en otro tipo de células, como miofibroblastos y osteoblastos, que responden a señales celulares diferentes que los osteoblastos esqueléticos<sup>1,9</sup>.

La inflamación y el estrés oxidativo son los principales mecanismos de daño endotelial, producidos por factores de riesgo ateroscleróticos, similares a los de la aterosclerosis vascular<sup>9</sup>. La disfunción endotelial hace que haya una menor disponibilidad de los valores fisiológicos de ON en el endotelio valvular. El ON endotelial inhibe la calcificación regulando la vía de señalización Noch1<sup>10,11</sup>.

El Noch1, conocido como una vía de señalización encargada del destino celular, se ha relacionado en el proceso del desarrollo óseo, de células sanguíneas y en diferenciación celular y la formación de válvulas cardíacas. En estudios previos, desarrollados con ratones, se ha observado que la presencia del Noch1 puede reprimir la actividad de BMP2 y RUNX2, y en su ausencia, un aumento de los niveles de los marcadores de crecimiento óseo anteriormente mencionados, teniendo como resultado un mayor calcificación de la válvula aórtica en los ratones<sup>12</sup>.

Consideramos que la ILK endotelial protege y promueve la producción fisiológica del ON y previene la disfunción endotelial. Un adecuado nivel de expresión de ILK es crítico para mantener una adecuada producción de ON por parte de la eNOS<sup>13</sup>.

Las citocinas proinflamatorias también juegan un papel importante en la calcificación valvular; una de ellas es el factor de crecimiento transformante B1, que tiene propiedades «formadoras de hueso» y pertenece a la familia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP2) y son un potente factor proosteogénico<sup>12,13</sup>.

La RUNX2 es un regulador transcripcional central del destino de los osteoblastos. En otros estudios se ha demostrado que la presencia de los marcadores BMP2 y RUNX2 en válvulas aórticas calcificadas aumenta antes de que aparezca la calcificación en las valvas aórticas<sup>14</sup>.

Por ello, se estudió el papel de la ILK en diferentes rutas de señalización implicadas en la formación de hueso y cartílago, como con la proteína morfogénica ósea (BMP) y RUNX2, debido a su implicación en la calcificación de la válvula.

Las BMP2 tienen la capacidad de modificar las células intersticiales valvulares a un fenotipo similar a osteoblastos, y de esta

forma crear proteínas de matriz ósea con posterior formación de nódulos calcificados<sup>2</sup>.

En nuestro estudio, observamos una correlación inversa significativa entre niveles de BMP2 e ILK, lo que nos indica que a menor disponibilidad de ILK, existe mayor actividad osteogénica en las válvulas. Lo mismo se observó al correlacionarlo con el RUNX2, existiendo también una correlación inversa significativa.

La calcificación de la válvula aórtica se ha descrito anteriormente asociada a comorbilidades como la insuficiencia renal, la HTA, la dislipidemia y la DM. Incluso se ha planteado que el sistema renina-angiotensina podría estar involucrado en el proceso de calcificación en la válvula aórtica<sup>13</sup>; sin embargo, en nuestra muestra de pacientes la HTA no resultó ser factor independiente de riesgo de calcificación valvular. En nuestro análisis, las comorbilidades como la dislipidemia, la insuficiencia renal, e incluso la edad no resultaron ser factores de riesgo independientes asociados con la calcificación de la válvula aórtica.

Hemos propuesto un modelo multivariante incluyendo las variables mencionadas anteriormente, en el que a pesar del ajuste estadístico la ILK presentó asociación significativa con la calcificación valvular (OR ajustada 0,068;  $p < 0,001$ ).

La diabetes ha sido relacionada anteriormente en el estudio MESA (estudio multiétnico de aterosclerosis), en el que se incluyeron 5.723 pacientes y donde se demostró que la DM aumenta las probabilidades de desarrollar estenosis aórtica (OR 2,06). En el estudio CANHEART, realizado por el Equipo de Investigación de Atención Ambulatoria en salud cardiovascular, se observó en una cohorte de 9,8 millones de adultos que también se asocia la DM a un mayor riesgo de estenosis aórtica<sup>15</sup>. En nuestro estudio, la DM presentó una OR de 2,15, sin embargo, no fue significativo; es posible que se deba a un factor de confusión, aun así, es probable que debamos considerar realizar estudios de imagen de forma precoz a pacientes diabéticos.

Nuestro trabajo plantea que la calcificación de la válvula aórtica podría iniciarse a través de la disminución de la ILK con el inicio de la disfunción endotelial. Los mecanismos que inducen a la disminución de esta proteína de membrana no están claros en la actualidad, y se necesitan más estudios para clarificar este proceso.

En conclusión, con estos hallazgos se abre una puerta a la búsqueda de una diana terapéutica o un biomarcador que nos pueda ayudar a un diagnóstico temprano del inicio de la degeneración valvular, incluso antes de producir repercusión clínica, o incluso prevenir las consecuencias que se derivan de esta enfermedad.

#### Limitaciones del estudio

Dentro de las limitaciones del estudio se encuentra la falta del score de calcio guiado por tomografía computarizada, para obtener valores cuantitativos en el momento de analizar los marcadores de crecimiento óseo.

#### Conclusiones

La disminución de la expresión endotelial de ILK puede influir en la calcificación de la válvula aórtica, marcando el inicio del proceso de transdiferenciación del endotelio valvular a tejido con capacidad osteogénica.

#### Financiación

Esta investigación ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III (PI20/00930) (MS) sostenido por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16006.
2. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012;5:605–14.
3. Herranz B, Marquez S, Guijarro B, Aracil E, Aicart-Ramos C, Saura M, et al. Integrin-linked kinase regulates vasomotor function by preventing endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Role in atherosclerosis. *Circ Res*. 2012;110:439–49.
4. Qin J, Wu C. ILK: A pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24:607–13.
5. Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2291–301.
6. Bahler RC, Desser DR, Finkelhor RS, Brenner SJ, Youssefi M. Factors leading to progression of valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol*. 1999;84:1044–8.
7. Di Vito A, Donato A, Presta I, Mancuso T, Brunetti FS, Mastroroberto P, et al. Extracellular matrix in calcific aortic valve disease: Architecture, dynamic and perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021;22:913.
8. Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, et al. Global Burden of Disease Study 2017 Nonrheumatic Valve Disease Collaborators. Global, regional, and national burden of calcific aortic valve and degenerative mitral valve diseases, 1990–2017. *Circulation*. 2020;141:1670–80.
9. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: Not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011;124:1783–91.
10. Koenig SN, Bosse KM, Nadorlik HA, Lilly B, Garg V. Evidence of aortopathy in mice with haploinsufficiency of *Notch1* in *Nos3*-null background. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2015;2:17–30.
11. Chang AC, Fu Y, Garside VC, Niessen K, Chang L, Fuller M, et al. Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase. *Dev Cell*. 2011;21:288–300.
12. Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47:828–34.
13. Mohler ER 3rd. Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol*. 2004;94:1396–402. A6.
14. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Castaneda LE, Brooks RM, Zimmerman K, et al. Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2482–6.
15. Mourino-Alvarez L, Corbacho-Alonso N, Sastre-Oliva T, Corros-Vicente C, Solis J, Tejerina T, et al. Diabetes mellitus y sus implicaciones en pacientes con estenosis aórtica. *Int J Mol Sci*. 2021;22:6212.