
This is the **published version** of the journal article:

Almendra-Pegueros, Rafael [et al.]. «Identification of new therapeutic targets related to endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction to reduce the risk of rupture in degenerative ascending aortic aneurysm
Identificación de nuevas dianas terapéuticas relacionadas con el estrés del retículo endoplasmático y con la disfunción mitocondrial para reducir el riesgo de rotura en el aneurisma de aorta ascendente degenerativo». *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, Vol. 37, Num. 4 (enero 2025), art. 100740 DOI 10.1016/j.arteri.2024.09.002

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/326684>

under the terms of the  ^{IN}
COPYRIGHT license.

Identificación de nuevas dianas terapéuticas relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico y con la disfunción mitocondrial para reducir el riesgo de ruptura en el aneurisma de aorta ascendente degenerativo

Identification of new therapeutic targets related to endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction to reduce the risk of rupture in degenerative ascending aortic aneurysm

Título abreviado: Nuevas dianas terapéuticas para tratar el aneurisma de aorta degenerativo.

Rafael Almendra-Pegueros¹, Antonio J. Barros-Membrilla², Elvira Pérez-Marlasca³, Josep Julve^{1,4}, José Martínez-González^{5,6}, Cristina Rodríguez^{1,5}, María Galán^{3,5,*}

¹Institut de Recerca Sant Pau (IR SANT PAU), Barcelona, España.

²Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

³Facultad de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón, Madrid, España.

⁴CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, CIBERDEM. Instituto Carlos III (ISCIII). Madrid, España.

⁵CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CIBERCV. Instituto Carlos III (ISCIII). Madrid, España.

⁶Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIBB-CSIC), España.

***Autora de correspondencia:** María Galán. Facultad de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón, Madrid, España. TEL: +34 914884871; Email: maria.galana@urjc.es

RESUMEN

Antecedentes: El aneurisma de aorta torácica ascendente (AATA) es una dilatación progresiva de la aorta que puede complicarse con su disección causando la muerte del 80-90 % de los pacientes. Cuando se asocia con el envejecimiento y la aterosclerosis, su pronóstico es peor siendo la cirugía reconstructiva la única terapia disponible. Nuestro objetivo es caracterizar el perfil de genes expresados diferencialmente (GED) implicados en el estrés del retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial en pacientes con AATA degenerativo.

Métodos: mediante secuenciación de ARN utilizando ARN extraído de AATA de pacientes degenerativos (n=13) y donantes multiorgánicos sanos (n=6) identificamos GED relacionados con el estrés del RE y la disfunción mitocondrial con el paquete DESeq2. El análisis de vías enriquecidas (Reactome) y de interacción de proteínas se realizó con el paquete *clusterProfiles* y se analizó con la base de datos *String* y el software *Cytoscape*.

Resultados: la histología reveló una desorganización completa de la matriz extracelular y pérdida celular en la pared aórtica de los pacientes donde detectamos una regulación positiva de 15 GED y negativa de 13 GED relacionados con el estrés del RE (ATF4, EIF2AK3, HSPA5, ERN1, SEL1L), la disfunción mitocondrial (DNML1, IMMT, MT-CO3, MT-CYB, MT ND2, TIMM17B, MT-ERF1, TOMM5) y la remodelación de la matriz extracelular. Los resultados del análisis del término GO y de las vías enriquecidas confirmaron la relación de estos GED con enfermedades de la aorta.

Conclusiones: Nuestros datos demuestran que las proteínas relacionadas con la disfunción mitocondrial y el estrés del RE podrían postularse como dianas terapéuticas para tratar el AATA.

Palabras clave: aneurisma de aorta ascendente, aterosclerosis, transcriptoma, mitocondria, retículo endoplasmático.

ABSTRACT

Background: Ascending Thoracic Aortic Aneurysm (ATAA) is a progressive dilation of the aorta that can be complicated by its dissection leading to death in 80-90 % of the patients. When associated with aging and atherosclerosis, the outcome is worse and reconstructive surgery is the only effective therapy. Our objective was to characterize differential expressed genes (DEG) involved in endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria dysfunction in patients with degenerative ATAA.

Methods: a transcriptomic analysis was performed by RNA sequencing using RNA isolated from ATAA of patients classified as degenerative (n=13) and multi-organ healthy donors (n=6). DEGs related to ER stress and mitochondrial dysfunction were identified with the DESeq2 package. Enriched pathway (Reactome) and protein interaction (PPI) analysis was performed with the clusterProfiles package. PPI of the selected DEGs was analyzed based on the string database and visualized by Cytoscape software.

Results: histology revealed a complete disorganization of the extracellular matrix (ECM) and cell loss in the aortic wall of ATAA patients where the upregulation of 15 DEGs and the downregulation of 13 DEGs that encode proteins related to ER stress (ATF4, EIF2AK3, HSPA5, ERN1, SEL1L), mitochondrial dysfunction (DNML1, IMMT, MT-CO3, MT-CYB, MT ND2, TIMM17B, MT-ERF1, TOMM5) and ECM was detected. The results of GO term and enriched pathway analysis indicated that these DEGs are mainly enriched in pathways related to aortic diseases.

Conclusions: our data show that proteins related to mitochondrial dysfunction and ER stress might be therapeutic targets for the treatment of ATAA.

Keywords: Ascending Thoracic Aortic Aneurysm, atherosclerosis, transcriptome, mitochondria, endoplasmic reticulum.

ABREVIATURAS

AATA: Aneurisma de Aorta Torácica Ascendente
AFE: adelgazamiento de fibras elásticas
CLM: colapso laminar medial
CML: células musculares lisas
DFE: desorganización de fibras elásticas
DM: degeneración de la capa media
ERO: especies reactivas de oxígeno
FFEP: fragmentación de fibras elásticas y/o pérdida,
GED: genes expresados diferencialmente
IPP: interacción proteína-proteína
MEXM: acumulación de matriz extracelular mucoide
MEX: matriz extracelular
MMP: metaloproteinasa
NOX: NADPH oxidasa
PNCML: pérdida de núcleos de células musculares lisas
RE: retículo endoplasmático

INTRODUCCIÓN

El aneurisma aórtico es una dilatación localizada y permanente de la aorta que puede afectar tanto a la aorta torácica (AAT) como a la región abdominal (AAA) (1). A medida que la enfermedad progresa, la pared aórtica se debilita y dilata de forma gradual, un proceso que finalmente puede desembocar en una rotura aórtica, la complicación más grave de la enfermedad, que está relacionada con una mortalidad del 50-80% (2). En efecto, el aneurisma aórtico es la decimoquinta causa de muerte en personas mayores de 55 años y la decimonovena causa de muerte en general (2). Los aneurismas de la aorta torácica ascendente (AATA) o descendente y los AAA son entidades patológicas distintas con factores de riesgo que difieren entre sí (3,4).

Ciñéndonos específicamente a los AAT, éstos pueden crecer asintóticamente hasta romperse, con una mortalidad superior al 90%. La verdadera incidencia y prevalencia de esta afección es incierta y los datos epidemiológicos son escasos y dispersos (5-7). No obstante, se estima que el AAT tiene una incidencia de 5,3 por 100.000 personas / año y una prevalencia del 0,16 % (5,6). La incidencia de AAT es similar entre hombres y mujeres, pero se diagnostica una década antes en los hombres (a los 60 años en hombres frente a los 70 en mujeres). Según su localización, los AAT se clasifican en aneurismas de la raíz aórtica o de la aorta ascendente (AATA), que son los más frecuentes ($\approx 60\%$), seguidos de los aneurismas de la aorta descendente ($\approx 35\%$) y del arco aórtico ($< 10\%$) (3,4).

El AATA afecta al 1 % de la población general y en estos pacientes la aorta incrementa su diámetro un promedio de 0,14 cm por año (5, 6). Se trata de una patología silente y potencialmente mortal debido a la disección de la pared aórtica (8-10). Alrededor del 22% de los pacientes con síndrome aórtico agudo mueren en casa, antes de recibir atención médica, mientras que la mortalidad hospitalaria llega al 34% (5,7). Hasta la fecha, el tratamiento quirúrgico es la única estrategia terapéutica capaz de limitar la incidencia de disección aórtica, por lo que precisamos urgentemente de una terapia farmacológica efectiva que reduzca la progresión y el riesgo de rotura del aneurisma. Este aspecto se ha visto

dificultado por el desconocimiento acerca de la asociación entre las propiedades biomecánicas a nivel local y los cambios a nivel tisular, celular y molecular que intervienen en la patogénesis de la AATA (11).

Se ha demostrado que el AATA, a diferencia del AAT descendente, se desencadena mayoritariamente por causas genéticas (6,12). La aterosclerosis no se considera una de las principales causas del AATA ya que los pacientes con disección de la aorta ascendente normalmente no presentan signos de aterosclerosis o calcificación y la enfermedad no está asociada con factores de riesgo aterosclerótico (13-16). Sin embargo, existe un grupo de pacientes con AATA asociado con aterosclerosis y envejecimiento, clasificados como sujetos con aortopatía degenerativa aterosclerótica en los que no se han encontrado causas genéticas. La esperanza de vida de los pacientes con AAT se puede mejorar si la enfermedad se diagnostica a tiempo, se interviene quirúrgicamente y se realiza un control adecuado de la presión arterial (9,10,17). La identificación de los mecanismos subyacentes al AATA puede contribuir a mejorar la comprensión de esta enfermedad y la estratificación de los pacientes atendiendo al riesgo de rotura del AATA y permitir la identificación de nuevas dianas terapéuticas para contrarrestar el remodelado mecanosensible de la matriz.

Recientemente, en estudios realizados por nuestro grupo y por otros autores se ha demostrado la implicación del estrés del retículo endoplasmático (RE) y de la disfunción mitocondrial tanto en la fisiopatología del AAA en humanos como en la formación de aneurismas en pacientes con síndrome de Marfan (18-22). De hecho, existe una estrecha interrelación entre el estrés del RE, la disfunción mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), estas últimas con un papel fundamental en enfermedades cardiovasculares (23-25). El mal funcionamiento del RE puede verse empeorado por la disfunción mitocondrial que, provoca cambios en el comportamiento celular causando agotamiento energético y finalmente, muerte celular, lo que eventualmente contribuye al desarrollo de la enfermedad aneurismática (26-29). Sin embargo, se desconoce si estos procesos juegan un papel relevante en el AATA. Este estudio tiene como objetivo caracterizar la contribución del estrés de RE y la disfunción mitocondrial a la formación de AATA en pacientes de edad avanzada con aortopatía aterosclerótica, con el objetivo último de identificar nuevas dianas terapéuticas que mejoren el manejo de estos pacientes. Para ello, hemos realizado un análisis transcriptómico que nos ha permitido identificar genes asociados al estrés del RE y a la disfunción mitocondrial potencialmente implicados en la patología y ha caracterizado su relación funcional con proteínas que participan en el remodelado de la matriz extracelular (MEC) y en la producción de especies reactivas de oxígeno.

METODOLOGÍA

Muestras de pacientes

La población de estudio está compuesta por 19 sujetos entre los que se incluyen pacientes con AATA y donantes multiorgánicos. Las muestras se obtuvieron durante la cirugía de raíz aórtica electiva o de emergencia a causa de la disección del AATA. Los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio se recogieron respetando su anonimato. La Unidad Funcional de Patología de la Aorta del Servicio de Cardiología del Hospital de la Santa Creu I Sant Pau (HSCSP, Barcelona), proporcionó las muestras de aneurisma ascendente aórtico humano procedentes de pacientes con aterosclerosis aórtica (58-83 años) sometidos a cirugía correctiva de aneurisma de la aorta ascendente. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital de la Santa Creu I Sant Pau (HSCSP, Barcelona; Ref. IIBSP-MAR-2019-08), y todas las muestras recolectadas forman parte de la colección C.0005273 registrada en el Instituto de Salud Carlos III. Las aortas ascendentes procedentes de los donantes multiórganicos (controles sanos; CS) no presentaban signos de aterosclerosis y/o aneurisma en la aorta y fueron proporcionadas por el Banco de Tejidos de Barcelona para su uso con fines de investigación que fue aprobado por el comité ético de esta institución. Este trabajo se ha llevado a cabo siguiendo la Declaración de Helsinki. La participación de los pacientes y la recogida de muestras de sujetos tomados como control se realizó con el consentimiento informado de los pacientes o de sus representantes legales. Se recogieron muestras de tejido y se almacenaron a -80°C para los estudios posteriores. Parte de los tejidos se fijaron inmediatamente en paraformaldehído, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 horas y se incluyeron en parafina para la caracterización histológica de las muestras.

Aislamiento de ARN a partir de tejido humano, control de calidad, construcción de bibliotecas y secuenciación.

Para identificar los genes expresados diferencialmente entre la aorta de controles sanos y pacientes con AATA, se realizó un análisis del genoma completo mediante secuenciación de ARN (Novogene). El ARN total se extrajo de 25 muestras de tejido de la aorta ascendente que son representativas de la condición patológica (AATA, n = 18) y de los donantes multiórganicos tomados como controles sanos (CS, n = 7) utilizando el mini kit RNeasy Fibrous (Qiagen, Venlo, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN total se determinó y cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y su integridad y calidad se evaluaron en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Para la secuenciación del ARN, aquellas muestras que no alcanzaron los valores de integridad del ARN requeridos se excluyeron del ensayo, en el que finalmente se incluyeron 13 AATA y 6 CS. Se utilizó ARN total como material de partida para sintetizar bibliotecas de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit Illumina Stranded mRNA Prep basado en el método de selección de poli-A, siguiendo el protocolo del fabricante (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

Brevemente, el ARN mensajero se purificó a partir del ARN total utilizando perlas magnéticas unidas a oligo poli-T. Después de la fragmentación, se sintetizó el ADNc de la primera cadena utilizando cebadores hexámeros aleatorios, seguido de la síntesis de ADNc de la segunda cadena utilizando dUTP para la biblioteca direccional o dTTP para la biblioteca no direccional. Finalmente se secuenciaron simultáneamente en el sistema de secuenciación Illumina NextSeq 500 con el kit de reactivos de alto rendimiento NextSeq 500/550 v2.5 de 150 ciclos (extremo emparejado de 2x74 pb) de Illumina. Los archivos de secuencia emparejados en formato FASTQ se analizaron en la plataforma BaseSpace Sequence Hub con Dragen RNA Pipeline v3.7.5 (Illumina). El genoma de referencia utilizado fue UCSC hg19. El archivo de datos original de plataformas de secuenciación de alto rendimiento (Illumina) se transformó en lecturas secuenciadas mediante el reconocimiento de base CASAVA (Base Calling).

Los datos sin procesar se almacenaron en archivos de formato FASTQ(fq), que contienen secuencias de lecturas y la calidad de base correspondiente. Para normalizar las lecturas del RNA-seq y obtener los Fragmentos por kilobase de transcritos por millón de fragmentos mapeados (FPKM), se utilizaron los paquetes “limma”, “DEseq2” y “conuntToFPKM” del programa estadístico R versión 4.4.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (<http://www.r-project.org/>)).

Análisis de la expresión génica.

Con los datos del análisis transcriptómico y a partir de los FPKM calculados en cada muestra y comparando entre los grupos de estudio AATA y CS, se cuantificó la expresión génica de los genes relacionados con el remodelado de la MEC que codifican para las metaloproteinasas MMP1, MMP2 y MMP9; para la elastina (ELN), fibrilina 1 (FBN1) y fibulina 5 (FBLN5) y para los colágenos COL1A1, COL3A1, COL5A1, COL7A1, COL24A1 y COL26A1. Se cuantificó la expresión de los genes relacionados con el estrés del retículo endoplásmico: ATF(activating transcription factor)-4 que codifica para el factor de activación de la transcripción 4, EIF2AK3, que codifica para la quinasa del retículo endoplásmico similar a la proteína quinasa R (PERK); HSPA5, que codifica la chaperona molecular GRP78/BIP; ERN1, que codifica la enzima 1 α que requiere inositol (inositol requiring enzyme 1, IRE-1); SEL1L que codifica la proteína homóloga 1 de la proteína sel-1 y con el estrés oxidativo: NOX2 y NOX4. Finalmente se cuantificó la expresión de los genes implicados en la disfunción mitocondrial: DNML1 que codifica la proteína similar a la dinamina-1 (dynamamin related protein 1, DRP1); IMMT, que codifica la proteína mitofilina; MFF que codifica el factor de fisión mitocondrial; MT-CO3, que codifica la subunidad 3 de la citocromo C oxidasa, MT-CYB, que codifica el citocromo B; MT ND2 que codifica la subunidad 2 de la enzima NADH deshidrogenasa; TIMM17B, que codifica la translocasa 17B de la membrana interna mitocondrial; MT-ERF1, que codifica el factor 1 de la terminación de la transcripción mitocondrial y; TOMM5, que codifica la translocasa de la membrana externa mitocondrial 5.

Análisis de interacción proteína-proteína (IPP)

El análisis IPP de genes relacionados con los procesos de remodelado de la MEC, estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial se realizó utilizando la base de datos String, estableciéndose como puntuación mínima de interacción > 0.4 , considerándose estadísticamente significativos con un valor de $p < 0.05$ y un valor de FDR de 5 %, los resultados se visualizaron en el software Cytoscape (v3.7.2).

Análisis de enriquecimiento ORA (Over Representing Analysis) en DisGeNET (Disease Gene Network) y OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).

Los genes relacionados con los procesos de remodelado de la MEC, estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial con expresión genética diferencial fueron anotados para el análisis de enriquecimiento ORA con el paquete “clusterProfiler” del programa estadístico R y el WEB-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt) con las categorías de enriquecimiento de las bases de datos DisGeNET y OMIM por el método Benjamini & Hochberg (BH) y con un valor de False Discovery Rate (FDR) $< 0,05$.

Análisis histológico

Las muestras de tejido se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina. La caracterización histológica de las muestras de aorta humana se llevó a cabo mediante tinciones con tricrómico de Mason y rojo sirio, mientras que la integridad de las fibras elásticas se evaluó mediante tinción con orceína utilizando un kit comercial (Casa Álvarez, Madrid, España), tal y como se describió previamente (30, 31). Para ello, las secciones se desparafinaron en xilol, se rehidrataron mediante una batería de alcoholes de gradación descendente y se sumergieron en agua destilada durante 5 minutos. Después de los distintos procedimientos de tinción, las muestras se deshidrataron lavándolas en alcohol de 100° (3 x 2 min), seguido de dos lavados en xilol de 3 min. Finalmente, los portaobjetos se montaron con medio de montaje DPX (Casa Álvarez, España). Las muestras se escanearon con un escáner Panoramic Midi I Automatic brightfield scan (3DHISTECH) para su visualización

y captación de imágenes representativas con el software CaseViewer 2.3.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R, versión 4.3.3 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria (<http://www.r-project.org/>) y el software GraphPad Prism versión 9.2.20 (La Jolla, CA, EE.UU.). Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron significativos mediante el test estadístico bilateral. Además, se comprobó la distribución normal de las variables continuas mediante el test de Shapiro-Wilks.

Las características demográficas y clínicas de los participantes se expresaron como media $\pm$ SEM si eran variables continuas. Las variables categóricas se presentaron como frecuencia y se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Los resultados de la expresión génica se expresan como mediana y rango intercuartil (IR) y las diferencias entre grupos (pacientes con AATA versus CS) se evaluaron mediante la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. El número (n) de muestras se indica en las leyendas de las figuras.

RESULTADOS

La media de edad de los pacientes con AATA fue de 66 años, diez años mayor que la de los sujetos controles. La mayoría padecían hipertensión (84,56%), pero no dislipemia (30,7%) y sólo un 38.5 % recibían tratamiento antihipertensivo. Alrededor del 50 % de los pacientes involucrados en el estudio estaban siendo tratados con fármacos hipocolesterolemiantes como estatinas, antiagregantes y anticoagulantes y eran fumadores (Tabla 1). La aorta ascendente se consideró dilatada si el diámetro era de 45mm o más, que es el límite actual para la recomendación de cirugía aórtica.

Histopatología de la pared vascular de pacientes con AATA.

La morfología de la pared del vaso se estudió mediante las tinciones con tricrómico de Mason, orceína y rojo sirio. La pared aórtica se analizó histológicamente de forma estandarizada utilizando el sistema de clasificación descrito en el documento de consenso aórtico sobre patología quirúrgica de la aorta (32-34). La degeneración de la capa media (DM) fue la característica histopatológica más común encontrada en el AATA causada por la descomposición del tejido de la pared aórtica y/o fragmentación de las fibras elásticas (Figura 1). Así, en cortes de muestras de los aneurismas identificamos la pérdida de núcleos de células musculares lisas (PNCML), colapso laminar medial (CLM), fibrosis medial (FM) y acumulación de matriz extracelular mucoide (MEXM) mediante la tinción con tricrómico de Mason (Figuras 1A-D). La MEXM se puede dividir a su vez en dos tipos: intralaminar (MEXM-I) y translamellar (MEXM-T). En la MEXM-I, el aumento de la MEXM no altera la disposición de las unidades laminares a diferencia de MEXM-T (35). En la figura 1C-D se evidenció la acumulación de MEXM-T grave y en la pared del AATA de algunos pacientes se observó colapso laminar medial (indicado con flechas). A su vez, tanto la tinción con tricrómico de Mason como con rojo sirio mostraron un aumento del colágeno intralaminar, que se observa como una expansión dentro del espacio intralamelar (Figura 1C-D, indicado con flechas) causante de alteraciones cicatriciales en la disposición de las unidades laminares, y un aumento del colágeno translamellar (Figura 1G-H, indicado con flechas). Este colágeno está desorganizado y desestructurado en lugar de formar haces de fibras onduladas, en comparación con la pared de las aortas sanas de donantes, donde la deposición de colágeno es más baja y exhibe una distribución normal (Figura 1E-H). La tinción con orceína reveló fragmentación de fibras elásticas y/o pérdida (FFEP),

adelgazamiento de fibras elásticas (AFE) y desorganización de fibras elásticas (DFE) en la pared aneurismática de los pacientes (Figura 1K-L).

Finalmente, evaluamos el contenido de células inmunes infiltradas en el AATA de pacientes y en la pared aórtica de los controles. La mayoría de las células inmunes presentes en la pared del aneurisma se identificaron como células T (CD3) y macrófagos (CD68) como se muestra en la Figura 1M-T.

Patrón de expresión de genes implicados en el estrés del retículo endoplásmico, en la disfunción mitocondrial y en el remodelado de la MEC.

A partir del análisis transcriptómico se analizó la expresión de genes normalizada por fragmentos por kilobase de transcritos por millón de fragmentos mapeados (FPKM), de genes implicados en el estrés del RE, la disfunción mitocondrial y la mitofagia; y en la síntesis, mantenimiento y destrucción de la MEC. Así, de entre los genes expresados diferencialmente implicados en el remodelado de la MEC se encontraron aumentados significativamente las MMPs 1, 2 y 9; COL1A1, COL3A1, COL5A1, COL24A1 y COL26A1, que codifican para la cadena alfa de distintos tipos de colágenos y la FBN1, proteína estructural esencial que actúa como soporte para la deposición de las fibras de elastina (Figura 2). En contraposición, se encontró significativamente disminuida la expresión de la ELN, la FBLN5, que promueve la interacción entre microfibrillas y fibras de elastina en la pared arterial, y el COL7A1 (Figura 2).

En cuanto a los genes expresados diferencialmente implicados en el estrés del retículo endoplasmático y aquellos relacionados con el complejo enzimático NADPH oxidasa, se encontraron aumentados significativamente los genes EIF2AK3, ERN1, SEL1L, y CYBB (Figura 3) que codifican respectivamente para las proteínas PERK, IRE1 y SEL1L, que forman parte de la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas, y para la cadena beta del citocromo B-245 (NOX2), el componente terminal de la cadena respiratoria que transfiere electrones desde el NADPH citoplasmático a través de la membrana plasmática hasta el oxígeno molecular en el exterior. Por otra parte, la expresión de los genes ATF4, HSPA5 y CYBB que codifican para otros componentes de la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas tales como el factor de transcripción ATF4, la chaperona molecular GRP78/BIP y para la subunidad catalítica del complejo NADPH oxidasa, NOX4, se encontró significativamente disminuida indicando una regulación diferencial de las diferentes vías implicadas en la respuesta a proteínas mal plegadas y de las distintas isoformas de la NADPH oxidasa (Figura 3). Mediante el análisis realizado por regresión lineal para determinar si la edad influía en la expresión diferencial de los genes implicados en el estrés del retículo endoplasmático y el estrés oxidativo se identificó una asociación positiva con los genes ERN1, SEL1L y NOX2 (Tabla suplementaria 1) mientras que, según el análisis de regresión logística, sólo la expresión del gen EIF2AK3 interactúa con la edad y con la presencia de AATA (Tabla suplementaria 2).

Finalmente, respecto a los genes implicados en la disfunción mitocondrial y que, son indicadores de los procesos de biogénesis mitocondrial y de mitofagia, se encontraron significativamente disminuidos: DNML1, que codifica para la proteína DRP1, implicada en mitofagia; IMMT, MT-CO3, MT-CYB y MT-ND2 (que forman parte del complejo I de la cadena de transporte electrónica mitocondrial), como indicadores de biogénesis mitocondrial; MFF que codifica para el factor de fisión mitocondrial; y la translocasa de la membrana interna mitocondrial TIMM17B, relacionada con mitofagia (Figura 4). La expresión de genes relacionados con estos procesos que, por el contrario, se hallaron aumentados, son el gen TOMM5 que codifica una enzima translocasa de la membrana

externa mitocondrial y que está asociada a mitofagia y autofagia y MT-ERF1 que está relacionado con la biogénesis mitocondrial (Figura 4). Tras evaluar la influencia de la edad en la expresión de los genes relacionados con disfunción mitocondrial, únicamente se observó una asociación negativa y estadísticamente significativa para los genes DNMT1 y IMMT, con una β de -0,055 y -0,094, respectivamente (Tabla suplementaria 1).

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de genes implicados en senescencia celular y vascular en el tejido aórtico entre el grupo de pacientes y controles (Figura suplementaria 1).

Análisis bioinformático de los genes regulados diferencialmente

Se realizó un análisis de enriquecimiento de los genes regulados diferencialmente descritos en el apartado anterior mediante ORA (overrepresentation analysis) usando las bases de datos DisGeNET y OMIM. A partir de este análisis ORA se identificaron los 10 principales procesos patológicos de interés, entre los que se encuentran la rotura de aorta, el aneurisma de aorta, enfermedades de la aorta, enfermedad de Marfan y enfermedad hipertensiva entre otras (Figura 5A). La Figura 5B muestra un diagrama de cuerdas de los 12 genes diferencialmente expresados con la mayor contribución a cada proceso patológico enriquecido.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de IPP a partir de los genes regulados diferencialmente. Se observó que dichas proteínas se agruparon con un coeficiente de agrupamiento promedio de 0,663 y un valor de $p < 0,001$ (Figura 5C). Estas proteínas mostraron interacción en tres grupos relacionados con el proceso de remodelado de la MEC y la disfunción mitocondrial (1, en rojo), el estrés del RE, la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas y el estrés oxidativo (2, en verde) y la integridad de la membrana mitocondrial (3, en azul).

DISCUSIÓN

La disección aórtica es la complicación más grave de la enfermedad de la aorta torácica. Aunque la aortopatía torácica es un evento potencialmente mortal, se puede prevenir si las personas en riesgo se identifican a tiempo y son intervenidas mediante cirugía de reparación. La estratificación del riesgo actual se basa únicamente en el diámetro aórtico. Sin embargo, estudios recientes han enfatizado la inexactitud de este parámetro para detectar complicaciones aórticas con antelación a su rotura (36, 37). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de identificar nuevos marcadores de riesgo y de estrategias de tratamiento para los pacientes con AATA. La identificación de mecanismos patológicos y vías efectoras que conducen a la aortopatía torácica e intervienen en el desarrollo del aneurisma, mejoraría significativamente esta estratificación del riesgo de aortopatía individual y, por lo tanto, daría como resultado una mejora importante en el campo de la medicina personalizada.

Este estudio tiene como objetivo desentrañar los mecanismos patogénicos en los aneurismas de la aorta degenerativos no sindrómicos mediante el estudio transcriptómico de la pared aórtica ascendente de pacientes con AATA. En la literatura se han descrito varios mecanismos que contribuyen a la formación de aneurismas aórticos y entre los más destacados se encuentran las alteraciones en la MEC debido a una síntesis reducida, cambios en su composición y maduración y una degradación acelerada debido a un desequilibrio entre las enzimas proteolíticas y sus inhibidores (38-40). Además, se han observado aumentos en las tasas de muerte celular (particularmente de SMC), inflamación vascular, procesos de (trans)diferenciación celular, aterosclerosis y fenómenos de envejecimiento en la pared vascular; aunque muchos de estos datos provienen de estudios en AAA (1,11,41,42).

Algunos de los fenómenos mencionados anteriormente se han relacionado, al menos en parte, con variantes y mutaciones genéticas (12, 41). Es importante destacar que la formación de aneurismas parece ser la consecuencia de varios procesos fisiopatológicos independientes, pero que interactúan entre sí (42). A pesar de la enorme cantidad de datos, generados principalmente mediante análisis histológicos de muestras de aneurisma, la fisiopatología de la AATA aún está lejos de comprenderse. Varios genes son fundamentales en el desarrollo de distintas patologías aneurismáticas, tanto en el caso del AAA como, y esto se ha reconocido en los últimos años, también en los AAT, sobre todo aquellos genes que codifican para enzimas que degradan la MEC, como las MMP y sus inhibidores. Los análisis de expresión génica realizados en nuestro estudio de transcriptómica mostraron que no solo se alteró la expresión de algunas metaloproteinasas sino también la expresión de proteínas que forman parte de la MEC o que están involucradas en la síntesis y mantenimiento de esta. Así, pudimos detectar cambios en la expresión genes que codifican componentes de la MEC implicados en la formación de fibras de elastina y colágeno y en su mantenimiento, que se encontraron expresados diferencialmente en el tejido del AATA. Como era de esperar, la expresión de MMP1, 2 y 9 aumentó y esto se vio acompañado por el incremento de la expresión de diferentes colágenos, seguramente como respuesta compensatoria tal y como ocurre en otras patologías aneurismáticas. Además, se observó una disminución de la expresión de los genes que codifican para la elastina y la FBLN5. Cabe destacar que nuestro grupo ha demostrado previamente la disminución de la expresión de FBLN5 en el AAA humano y su implicación en la dilatación aórtica en un modelo experimental (43). Como contrapartida, la expresión de la FBN1 aumentó en el AATA de los pacientes, tal vez

29 como mecanismo dirigido a paliar la pérdida y rotura de las fibras elásticas que tiene lugar en esta enfermedad. De hecho, los análisis histológicos confirmaron que la capa media de la aorta aneurismática exhibía una celularidad reducida y que la orientación y la integridad de las fibras elásticas disminuyó mientras que la deposición y desorganización del colágeno aumentó en la pared del AATA. En general, se observó degeneración medial, fragmentación y desorganización de la MEC, pérdida de células del músculo liso vascular y la acumulación de matriz extracelular mucoide en la pared del AATA degenerativo procedente de los pacientes. Todas las características histológicas y la expresión génica diferencial encontradas en el tejido del AATA de nuestra cohorte parecen ser independientes de la diferencia de edad entre los pacientes y los sujetos controles al no encontrar diferencias de expresión en diversos genes que codifican para proteínas relacionadas con la senescencia vascular (44-48). La búsqueda de terapias que mejoren el manejo de los pacientes con AATA sigue siendo un desafío. En publicaciones previas, nosotros y otros grupos hemos demostrado que el estrés del RE y la disfunción mitocondrial tienen un papel clave en la etiopatogenia de los aneurismas de aorta y que tanto la reducción específica del estrés mitocondrial como la reducción del estrés del RE, limitan la progresión del aneurisma y presenta efectos cardioprotectores (18-22). A pesar de los destacados avances sobre el papel fisiopatológico de la disfunción mitocondrial y las evidencias de la implicación del ER en el aneurisma de aorta, el conocimiento sobre su implicación en el desarrollo de AATA es limitado (29, 49-52). En este estudio se muestran las alteraciones encontradas en la expresión de diversos genes que codifican para proteínas implicadas en las vías de respuesta a proteínas mal plegadas y proteínas implicadas en biogénesis, disfunción mitocondrial y mitofagia que aportan nuevas evidencias de la importancia de ambos procesos etiopatogénicos en la pared del aneurisma aorta ascendente degenerativo. El análisis mediante los modelos de regresión determinó que la edad no influye en la expresión diferencial de la mayoría de estos genes. Sin embargo, su contribución relativa al desarrollo de aterosclerosis y / o al de aneurisma de aorta ascendente no puede determinarse porque tanto el estrés del RE como la disfunción

mitocondrial están implicados en la fisiopatología de ambas enfermedades (18, 21, 29, 53-56). En resumen, nuestros datos sugieren que el estrés crónico del retículo endoplasmático y la disfunción mitocondrial pueden contribuir de manera crucial a la aterosclerosis en la pared aórtica y, por lo tanto, promover el inicio y la progresión del AATA. Estos resultados preliminares, que deberán ser validados en una cohorte más amplia, nos permiten postular el bloqueo del estrés del RE y el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial mediante la reducción del estrés mitocondrial como intervención terapéutica para frenar el desarrollo del AATA.

Financiación: Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación obtenida a través de la Fundación Española de Arteriosclerosis (Beca FEA 2023-Investigación Básica III). Además, el estudio ha contado con financiación del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; PI20/01004; PI21/01048) y por «FEDER Una manera de hacer Europa». R.A-P está financiado a través de un contrato PFIS (ISCIII).

Autoría: R.A-P, E.P-M y M.G. procesaron y aislaron el material genético de las muestras humanas, realizaron la histología e interpretaron los resultados de la transcriptómica. A.B-M. seleccionó los pacientes y aportó los datos clínicos de los mismos. J. J. contribuyó al análisis e interpretación de los datos y la revisión crítica del contenido. J.M-G. contribuyó a la revisión crítica de los resultados. C.R. participó en la concepción y diseño del estudio y la revisión crítica del contenido, M.G. realizó la concepción y diseño del estudio y la redacción del manuscrito. Todos los autores revisaron el manuscrito y dieron el visto bueno a su versión final.

Conflicto de interés: no hay conflicto de intereses

Agradecimientos: este trabajo ha sido realizado en el marco del Programa de Doctorado en Farmacología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

REFERENCIAS

1. Guo DC, Papke CL, He R, Milewicz DM. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085: 339e52.
2. Filardo G, Powell JT, Martinez MA, Ballard DJ. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2:CD001835.
3. Norman PE, Powell JT. *Circulation.* Site specificity of aneurysmal disease. 2010;121(4):560-8.
4. Mohan V, Ameta D, Gaurav B, Haranahalli P. Aortic aneurysm. *J Transl Int Med.* 2016 Apr 1; 4(1): 35–41.
5. Olsson C, Thelin S, Ståhle E, Ekbom A, Granath F. Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002. *Circulation.* 2006;114(24):2611-8.
6. Gouveia EMR, Silva Duarte G, Lopes A, Alves M, Caldeira D, Fernandes EFR, et al. Incidence and Prevalence of Thoracic Aortic Aneurysms: A Systematic Review and Metaanalysis of Population-Based Studies. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2022;34(1):1-16.
7. Elefteriades JA. Thoracic aortic aneurysm: reading the enemy's playbook. *World J Surg.* 2008;32:366e74.2022;34(1):1-16.

8. D'Abate F, Oladokun D, La Leggia A, Hinchliffe R, Thompson M, Holt P, et al. Transthoracic ultrasound evaluation of arch and descending thoracic aortic pathology. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2018;55:658e65.
9. Aronow WS. Treatment of thoracic aortic aneurysm. *Ann Transl Med.* 2018; 6(3): 66.
10. Saliba E, Ying Sia Y. The ascending aortic aneurysm: When to intervene?. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2015; 6: 91–100.
11. El-Hamamsy I, Yacoub MH. Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:771–86.
12. Isselbacher EM, Lino Cardenas CL, Lindsay ME. Hereditary Influence in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *Circulation.* 2016;133(24):2516-28.
13. Grewal N, Dolmaci O, Jansen E, Klautz R, Driessen A, Lindeman J, Poelmann RE. Are acute type A aortic dissections atherosclerotic?. *Front Cardiovasc Med.* 2023;9:1032755.
14. Elefteriades JA, Farkas EA. Thoracic aortic aneurysm: clinically pertinent controversies and uncertainties. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:841-57.
15. Achneck H, Modi B, Shaw C, Rizzo J, Albornoz G, Fusco D, et al. Ascending thoracic aneurysms are associated with decreased systemic atherosclerosis. *Chest.* 2005;128:1580-6.
16. Elefteriades JA, Olin JW, Halperin JL, Ziganshin BA. Diseases of the aorta. In: Fuster V, Harrington RA, Narula J, Eapen ZJ, eds. *Hurst's the Heart.* 14th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2017.
17. Vapnik JS, Kim JB, Isselbacher EM, Ghoshhajra BB, Cheng Y, Sundt TM 3rd, et al. Characteristics and Outcomes of Ascending Versus Descending Thoracic Aortic Aneurysms. *Am J Card.* (2016) 117:1683 -90.
18. Navas-Madroñal M, Rodriguez C, Kassan M, Fite J, Escudero JR, Canes L, et al. Enhanced endoplasmic reticulum and mitochondrial stress in abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(13):1421-38.
19. Siegert AM, Garcia Diaz-Barriga G, Esteve-Codina A, Navas-Madroñal M, Gorbenko Del Blanco D, Alberch J, et al. A FBN1 3'UTR mutation variant is associated with endoplasmic reticulum stress in aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(1):107-14.
20. Qin Y, Wang Y, Liu O, Jia L, Fang W, Du J, Wei Y. Tauroursodeoxycholic Acid Attenuates Angiotensin II Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-deficient Mice by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2017;53(3):337-345.
21. Navas-Madroñal M, Almendra-Pegueros R, Puertas-Umbert L, Jiménez-Altayó F, Julve J, Pérez B, et al. Targeting mitochondrial stress with Szeto-Schiller 31 prevents experimental abdominal aortic aneurysm: Crosstalk with endoplasmic reticulum stress. *Br J Pharmacol.* 2023;180(17):2230-2249.
22. He H, Zeng B, Wu X, Hou J, Wang Y, Wang Y, Lin Y, Wu P, Zheng C, Yin H, Wang N. Higher matrix stiffness promotes VSMC senescence by affecting mitochondria-ER contact sites and mitochondria/ER dysfunction. *FASEB J.* 2023;37(12):e23318.
23. Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(10):1817-27.
24. Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, Backs J, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest.* 2009;119(10):2925-41.
25. Santos CXC, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FRM. Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of

Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. 2009;11(10).

26. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454(7203):455-62.

27. Zhang C, Syed TW, Liu R, Yu J. Role of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:29.

28. Van der Pluijm I, Burger J, van Heijningen PM, A IJ, van Vliet N, Milanese C, et al. Decreased mitochondrial respiration in aneurysmal aortas of Fibulin-4 mutant mice is linked to PGC1A regulation. *Cardiovasc Res*. 2018;114(13):1776-93.

29. Oller J, Gabandé-Rodríguez E, Ruiz-Rodríguez MJ, Desdín-Micó G, Aranda JF, Rodrigues-Diez R, et al. Extracellular Tuning of Mitochondrial Respiration Leads to Aortic Aneurysm. *Circulation*. 2021;143(21):2091-2109.

30. Puertas-Umbert L, Alonso J, Roselló-Díez E, Santamaría-Orleans A, Martínez-González J, Rodríguez C. Rolipram impacts on redox homeostasis and cellular signaling in an experimental model of abdominal aortic aneurysm. *Clin Investig Arterioscler*. 2024;36(3):108-117.

31. Sánchez-Infantes D, Nus M, Navas-Madroñal M, Fité J, Pérez B, Barros-Membrilla AJ, et al. Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Abdominal Aortic Aneurysm. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(4):602.

32. Grewal N, Velders BJJ, Gittenberger-De Groot AC, Poelmann R, Klautz RJM, Van Brakel TJ, et al. A systematic Histopathologic evaluation of type-a aortic dissections implies a uniform multiple-hit causation. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021; 8:12.

33. Halushka MK, Angelini A, Bartoloni G, Basso C, Batoroeva L, Bruneval P, et al. 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*. 2016; 25:247–57.

34. Leone O, Corsini A, Pacini D, Corti B, Lorenzini M, Laus V, et al. The complex interplay among atherosclerosis, inflammation, and degeneration in ascending thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2020;160(6):1434-43 e6.

35. Halushka MK, Angelini A, Bartoloni G, Basso C, Batoroeva L, Bruneval P, et al. 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*. 2016; 25(3):247-57.

36. Neri E, Barabesi L, Buklas D, Vricella LA, Benvenuti A, Tucci E, et al. Limited role of aortic size in the genesis of acute type a aortic dissection. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005; 28:857–63.

37. Pape LA, Tsai TT, Isselbacher EM, Oh JK, Ogara PT, Evangelista A, et al. Aortic diameter ≥ 5.5 cm is not a good predictor of type a aortic dissection: observations from the international registry of acute aortic dissection (IRAD). *Circulation*. 2007; 116:1120–7.

38. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002;110:625–32.

39. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation*. 2001;104:304–9.

40. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, Stroud RE, Clark LL, Kaplan BS, et al. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms

of patients with bicuspid or tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133:1028–36.

41. He R, Guo DC, Sun W, Papke CL, Duraisamy S, Estrera AL, et al. Characterization of the inflammatory cells in ascending thoracic aortic aneurysms in patients with Marfan syndrome, familial thoracic aortic aneurysms, and sporadic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;136:922–9.

42. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:987–94.

43. Orriols M, Varona S, Martí-Pàmies I, Galán M, Guadall A, Escudero JR, et al. Down-regulation of Fibulin-5 is associated with aortic dilation: role of inflammation and epigenetics. *Cardiovasc Res.* 2016;110(3):431–42.

44. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell.* 2015;14(4):644–58.

45. Bai B, Vanhoutte PM, Wang Y. Loss-of-SIRT1 function during vascular ageing: hyperphosphorylation mediated by cyclin-dependent kinase 5. *Trends Cardiovasc Med.* 2014;24(2):81–4.

46. Wan H, Liu D, Liu B, Sha M, Xia W, Liu C. Bioinformatics analysis of aging-related genes in thoracic aortic aneurysm and dissection. *Front Cardiovasc Med.*

47. Somani YB, Pawelczyk JA, De Souza MJ, Kris-Etherton PM, Proctor DN. Aging women and their endothelium: probing the relative role of estrogen on vasodilator function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;317(2):H395–H404.

48. Valentini A, Cianfarani MA, Tarantino U, Di Daniele N, Bertoli A. Osteoprotegerin as a biomarker of geriatric frailty syndrome. *Aging (Albany NY).* 2019;11(14):4900–4909.

49. Li Y, Ren P, Dawson A, Vasquez HG, Ageedi W, Zhang C, et al. Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Cell Populations and Differential Gene Expression Patterns in Control and Aneurysmal Human Aortic Tissue. *Circulation.* 2020;142(14):1374–1388.

50. Wang L, Yang Z, Wang S, Que Y, Shu X, Wu F, et al. Substitution of SERCA2 Cys(674) accelerates aortic aneurysm by inducing endoplasmic reticulum stress and promoting cell apoptosis. *Br J Pharmacol.* 2022;179(17):4423–4439.

51. Tavis BS, Peters AS, Böckler D, Dihlmann S. Mitochondrial Dysfunction and Increased DNA Damage in Vascular Smooth Muscle Cells of Abdominal Aortic Aneurysm (AAA-SMC). *Oxid Med Cell Longev.* 2023; 2023:6237960.

52. Vats S, Sundquist K, Li Y, Wang X, Hong MG, Sundquist J, et al. Characterization of the Mitochondrial Genetic Landscape in Abdominal Aortic Aneurysm. *J Am Heart Assoc.* 2023;12(8):e029248.

53. Thorp E, Li G, Seimon TA, Kuriakose G, Ron D, Tabas I. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP. *Cell Metab.* 2009 May;9(5):474–81.

54. Civelek M, Manduchi E, Riley RJ, Stoeckert CJ Jr, Davies PF. Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circ Res.* 2009 Aug 28;105(5):453–61.

55. Abe JI, Ko KA, Kotla S, Wang Y, Paez-Mayorga J, Shin IJ, et al. MAGI1 as a link between endothelial activation and ER stress drives atherosclerosis. *JCI Insight.* 2019;4(7):e125570.

56. Cooper HA, Cicalese S, Preston KJ, Kawai T, Okuno K, Choi ET, et al. Targeting mitochondrial fission as a potential therapeutic for abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res.* 2021;117(3):971–982.

TABLAS

Tabla 1. Datos de los pacientes incluidos en el análisis de secuenciación de ARN

Variable	Total (n=19)	Controles (n=6)	AATA (n=13)	Valor p
Sexo, n (%)				1.000
Hombre	13 (68,4%)	4 (66.7%)	9 (69.2%)	
Mujer	6 (31.6%)	2 (33.3%)	4 (30.8%)	
Edad, Media (ES)	61.9 (2.82)	54.6 (1.73)	65.8 (3.85)	0.032
Fumador/a, n(%)				1.000
Yes	9 (47.4%)	3 (50.0%)	6 (46.2%)	
Hipertensión, n(%)				0.386
No	5 (26.3%)	3 (50.0%)	2 (15.4%)	
Sí, controlada	7 (36.8%)	2 (33.3%)	5 (38.5%)	
Sí, no-controlada	7 (36.8%)	1 (16.7%)	6 (46.2%)	
Diabetes Mellitus Tipo 2, n(%)				1.000
No	18 (94.7%)	6 (100.0%)	12 (92.3%)	
Sí, no-controlada	1 (5.0%)	-	1 (7.7%)	
Dislipemia, n(%)				0.288
No	13 (68.4%)	4 (66.7%)	9 (69.2%)	
Sí, controlada	3 (15.8%)	-	3 (23.1%)	
Sí, no-controlada	1 (5.3%)	2 (33.3%)	1 (7.7%)	
Fármacos, n(%)				
Estatinas	2 (10.5%)	-	2 (15.4%)	1.000
Antiagregantes	3 (15.8%)	-	3 (23.1%)	<0.001
Anticoagulantes	1 (5.3%)	-	1 (7.7%)	<0.001
Miocardopatías, n(%)				0.101
No	9 (47.4%)	1 (16.7%)	8 (61.5%)	
Dilatada	5 (26.3%)	3 (50.0%)	2 (15.4%)	
Hipertrófica	3 (15.8%)	2 (33.3%)	1 (7.7%)	
Valvular	2 (10.5%)	-	2 (15.4%)	
Diámetro raíz aórtica (mm), Media (ES)	-	-	40.4 (1.30)	-
Diámetro aorta ascendente (mm), Media (ES)	-	-	52.7 (2.70)	-
Diámetro unión sinotubular (mm), Media (ES)	-	-	41.0 (1.66)	-

Las variables categóricas se compararon mediante la prueba Fisher-Exact. Las variables continuas se compararon mediante el T test. ES, error estándar.

FIGURAS.

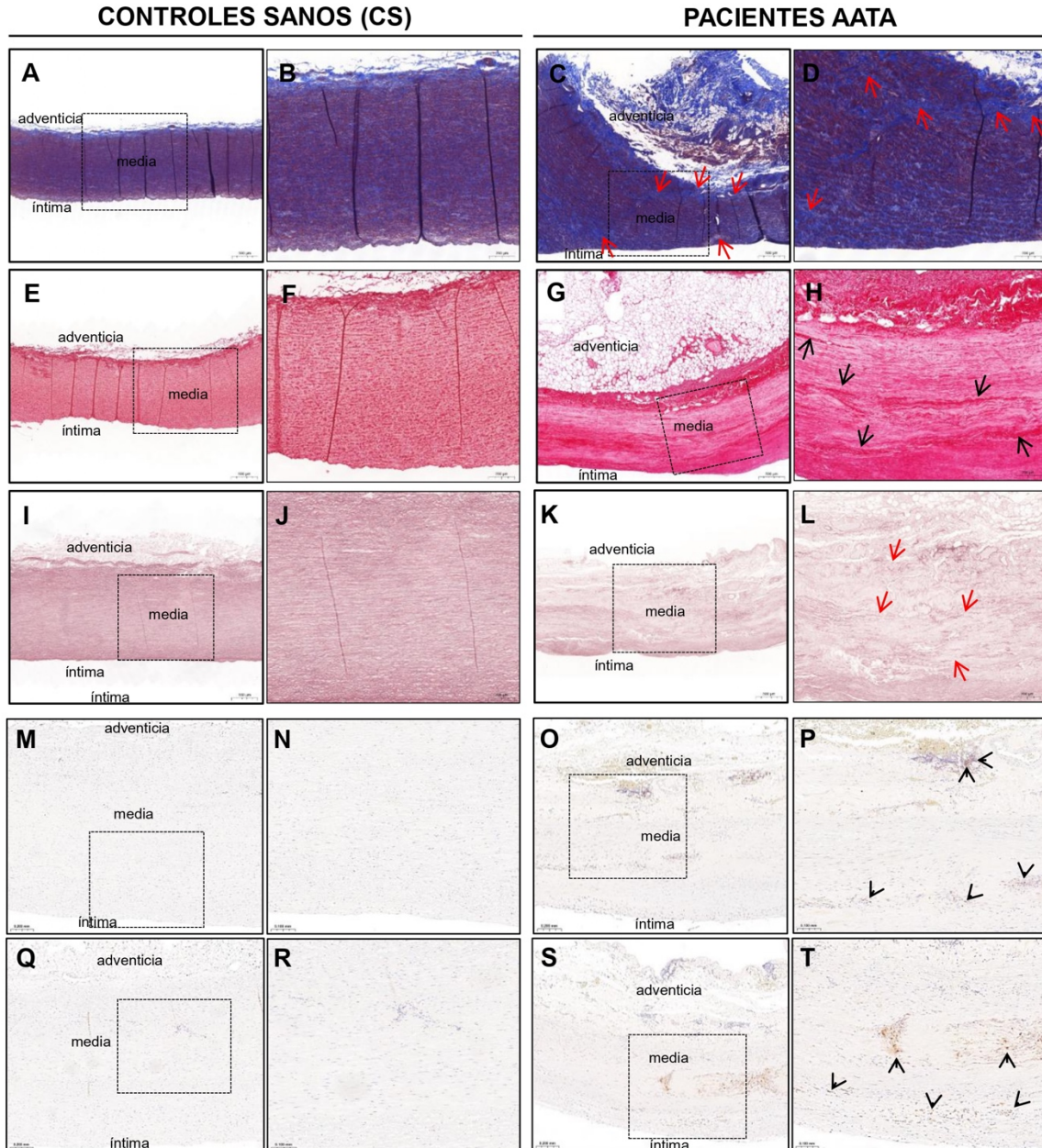


Figura 1. Secciones histológicas transversales de la pared de la aorta ascendente procedentes de sujetos controles y de la pared de aortas ascendentes dilatadas de pacientes con AATA. A-D) Se muestran capturas de áreas representativas de secciones teñidas con tricrómico de Masson donde las células del músculo liso y la fibrina se observan en rojo mientras el colágeno se tiñe de azul. Las áreas con pérdida de núcleos de células del músculo liso se indican con flechas rojas. En B y D se observa que la capa íntima es significativamente más gruesa en la pared de la aorta ascendente de sujetos controles. E-H) Se muestran capturas de áreas representativas de secciones teñidas con rojo sirio en las que se observa el aumento en la deposición de colágeno en la capa media y adventicia de las aortas de los pacientes. I-L) Secciones teñidas con orceína. Se destaca la fragmentación observada en pacientes con AATA (flechas rojas). M-T) Capturas representativas de la inmunohistoquímica frente al marcador CD3 de linfocitos T y al marcador CD68 de macrófagos. Las áreas donde se encuentran células positivas al marcaje se indican con flechas. (AATA, n=6; y controles sanos, n=4). Barra= 500 micras (A, E, I, C, G, K); 200 micras (B, F, J, D, H, L, M, O, Q, S); 100 micras (N, P, R, T).

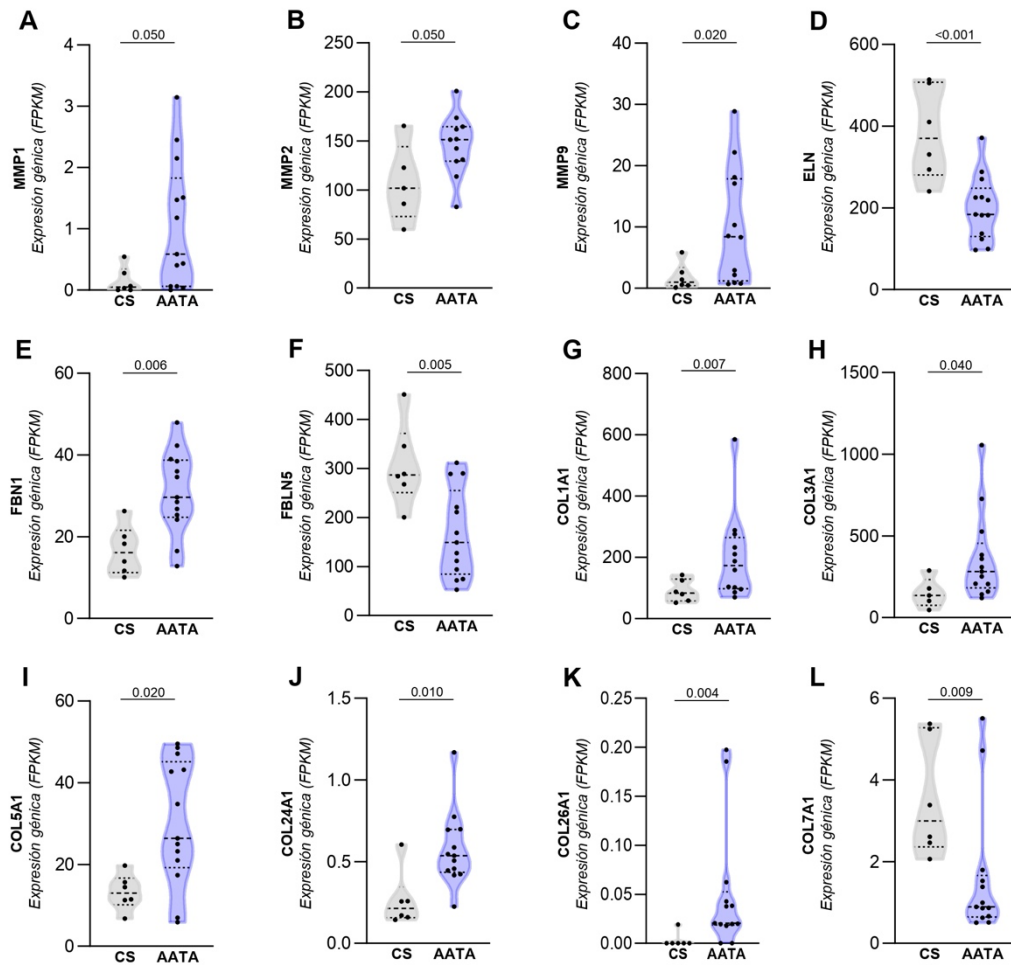


Figura 2. Expresión génica de marcadores relacionados con el proceso de remodelado de la MEX en el aneurisma de aorta torácica ascendente (ATAA) de pacientes. A-F). Expresión de los genes que codifican para diferentes metaloproteinasas y proteínas esenciales que forman y mantienen la integridad de las fibras de elastina. G-L). Expresión de genes que codifican para distintos subtipos de proteínas que forman las fibras de colágeno. Los estudios se realizaron en muestras de aorta ascendente de pacientes con AATA (n=13) y controles sanos (CS; n=6). Los datos se expresan como mediana y rangos de cuartiles; se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar las diferencias entre grupos. Valor de $p < 0,05$ considerado estadísticamente significativo.

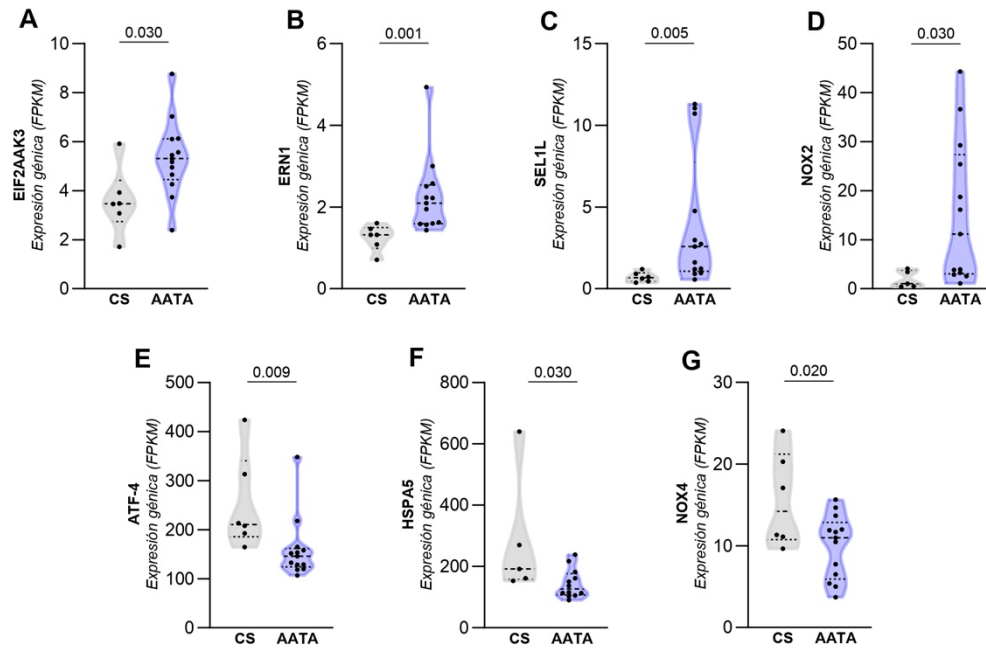


Figura 3. Expresión génica diferencial de marcadores del estrés del retículo endoplasmático (ERS) y de la subunidad catalítica del complejo NADPH oxidasa en el aneurisma de aorta torácica ascendente (ATAA) de pacientes. A-D) Los genes EIF2AK3, ERN1, SEL1L y NOX2 se encontraron significativamente aumentados en el grupo de pacientes mientras que la expresión de los genes ATF-4, HSPA5 y NOX4 (E-G) se encontró disminuida. Los estudios se realizaron en muestras de aorta ascendente de pacientes con AATA (n=13) y controles sanos (CS; n=6). Se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar las diferencias entre grupos. El valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

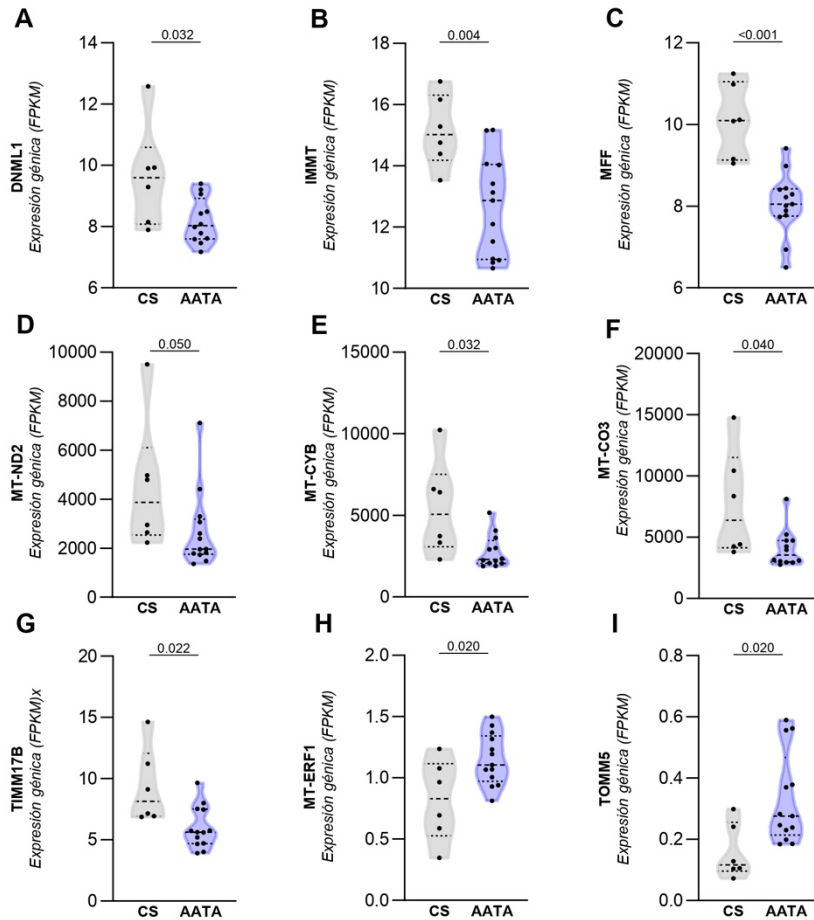


Figura 4. Expresión génica diferencial de marcadores relacionados con la disfunción mitocondrial en el aneurisma de aorta torácica ascendente (AATA) de pacientes. A-G). La expresión de los genes DNML1, IMMT, MFF, MT-CO3, MT-CYB, MT-ND2 y TIMM17B se encontró disminuida significativamente en el grupo de pacientes mientras que la expresión de los genes MT-ERF1 y TOMM5 (H-I) se encontró aumentada. Los estudios se realizaron en muestras de aorta ascendente de pacientes con AATA (n=13) y controles sanos (CS; n=6). Se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar las diferencias entre grupos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

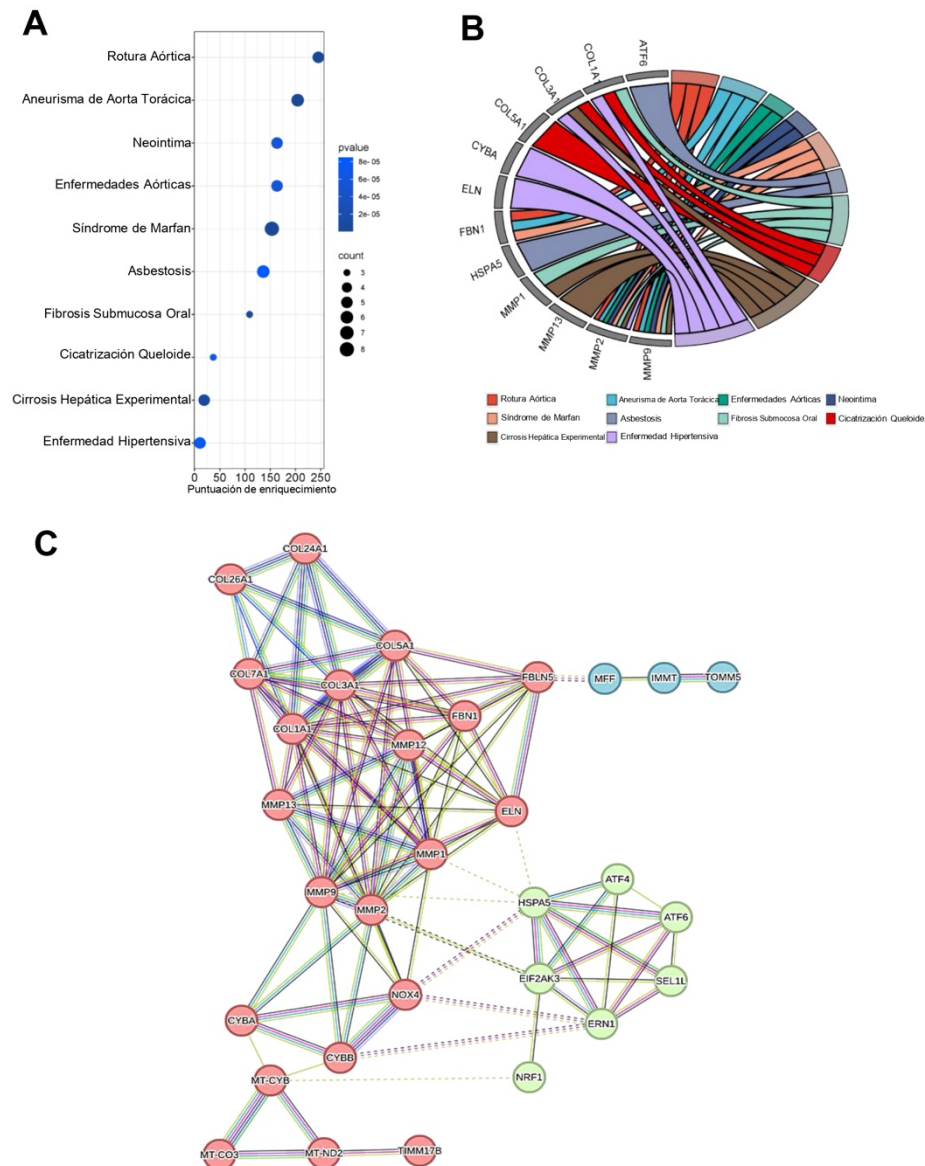


Figura 5. Análisis de enriquecimiento. Se realizó un análisis de enriquecimiento mediante ORA (overrepresentation analysis) con los genes regulados diferencialmente mostrados en las Figuras 2-4 usando las bases de datos DisGeNET y OMIM. A) Gráfico de círculos con las 10 principales enfermedades identificadas mediante esta estrategia, representadas mediante el análisis ORA con reducción de redundancia k-Medoid. B) Gráfico de cuerdas en el que se muestran los 12 genes con la mayor contribución a cada patología. C) El análisis de interacción proteína-proteína (PPI), con un coeficiente de agrupamiento promedio de 0,663 y un valor de $p < 0,001$, mostró interacciones entre las proteínas relacionadas con el remodelado de la MEX, el estrés del RE, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. Se distinguieron tres grupos; el grupo número 1 (en rojo) está relacionado con el proceso de remodelado de la MEX, la integridad de la MEX y la disfunción mitocondrial (coeficiente de agrupamiento promedio: 0,756 y valor $p < 0,001$). El grupo número 2 (en verde) está relacionado con el estrés del RE y la respuesta a las proteínas mal plegadas (coeficiente de agrupamiento promedio: 0,900 y valor de $p < 0,001$). El grupo número 3 (en azul) está relacionado con la integridad de la membrana mitocondrial con un coeficiente de agrupamiento promedio: 0,667 y un valor de $p < 0,001$. Las líneas de puntos delimitan cada uno de los grupos.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Identificación de nuevas dianas terapéuticas relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico y con la disfunción mitocondrial para reducir el riesgo de ruptura en el aneurisma de aorta ascendente degenerativo

Identification of new therapeutic targets related to endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction to reduce the risk of rupture in degenerative ascending aortic aneurysm.

Título abreviado: Nuevas dianas terapéuticas para tratar el aneurisma de aorta degenerativo.

Rafael Almendra-Pegueros¹, Antonio J. Barros-Membrilla², Elvira Pérez-Marlasca³, Josep Julve^{1,4}, José Martínez-González^{5,6}, Cristina Rodríguez^{1,5}, María Galán^{3,5,*}

¹Institut de Recerca Sant Pau (IR SANT PAU), Barcelona, España.

²Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

³Facultad de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón, Madrid, España.

⁴CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, CIBERDEM. Instituto Carlos III (ISCIII). Madrid, España.

⁵CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CIBERCV. Instituto Carlos III (ISCIII). Madrid, España.

⁶Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIBB-CSIC), España.

***Autora de correspondencia:** María Galán. Facultad de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón, Madrid, España. TEL: +34 914884871; Email: maria.galana@urjc.es

Metodología suplementaria

Para evaluar si la edad era un posible factor de confusión se realizó un análisis de la interacción entre la edad y la expresión de los genes de interés utilizando modelos de regresión lineal y de regresión logística utilizando el paquete de software estadístico R- versión 4.3.3 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria (<http://www.r-project.org/>)). Los resultados se expresaron respectivamente con el coeficiente Beta y como una razón de probabilidades (OR) en intervalos de confianza (IC) del 95 %. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados suplementarios

Tabla S1. Análisis de asociación entre la edad y la expresión de genes relacionados con el estrés del retículo endoplasmático, estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

Expresión génica	Edad			
	β	Error estándar	IC 95%	Valor p
EIF2AK3	0,039	0,030	-0,024 a 0,103	0,213
ERN1	0,037	0,014	0,006 a 0,068	0,021
SEL1L	0,154	0,060	0,027 a 0,282	0,019
NOX2	0,553	0,227	0,071 a 1,034	0,026
ATF4	-2,437	1,513	-5,628 a 0,754	0,125
HSPA5	-0,907	2,472	-6,177 a 4,362	0,718
NOX4	-0,090	0,095	-0,292 a 0,112	0,361
DNM1L	-0,055	0,021	-0,100 a -0,009	0,019
IMMT	-0,094	0,027	-0,152 a -0,037	0,003
MFF	-0,034	0,022	-0,081 a 0,012	0,142
MT-ND2	-32,140	39,300	-115,1 a 50,78	0,424
MT-CYB	-47,270	45,090	-142,4 a 47,86	0,309
MT-CO3	-52,590	68,220	-196,5 a 91,34	0,451
TIMM17B	-0,063	0,048	-0,165 a 0,0381	0,204
MTERF1	0,003	0,005	-0,008 a 0,014	0,544
TOMM5	0,005	0,002	<0,001 a 0,010	0,052

β (coeficiente Beta). IC (intervalo de confianza). Valor de $p < 0,05$ considerado estadísticamente significativo.

Tabla S2. Análisis de la interacción entre la expresión génica:edad para la predicción de AATA.

Gen	Interacción expresión génica : edad		
	OR	IC 95%	Valor p
EIF2AK3	1,015	1,003 a 1,034	0,040
ERN1	1,063	1,017 a 1,162	0,050
SEL1L	1,059	1,008 a 1,174	0,150
NOX2	1,010	1,001 a 1,029	0,210
ATF4	0,999	0,999 a 1,000	0,150
HSPA5	0,999	0,999 a 1,000	0,210
NOX4	0,997	0,994 a 1,001	0,220
DNM1L	1,003	0,992 a 1,014	0,620
IMMT	0,999	0,991 a 1,007	0,920
MFF	0,997	0,986 a 1,007	0,610
MT-ND2	1,000	1,000 a 1,000	0,220
MT-CYB	1,000	1,000 a 1,000	0,200
MT-CO3	1,000	1,000 a 1,000	0,270
TIMM17B	0,993	0,983 a 1,001	0,140
MTERF1	1,119	1,030 a 1,313	0,060
TOMM5	1,311	1,070 a 1,907	0,050

OR (*odds ratio*) o razón de probabilidades. Valor de $p < 0,05$ considerado estadísticamente significativo.

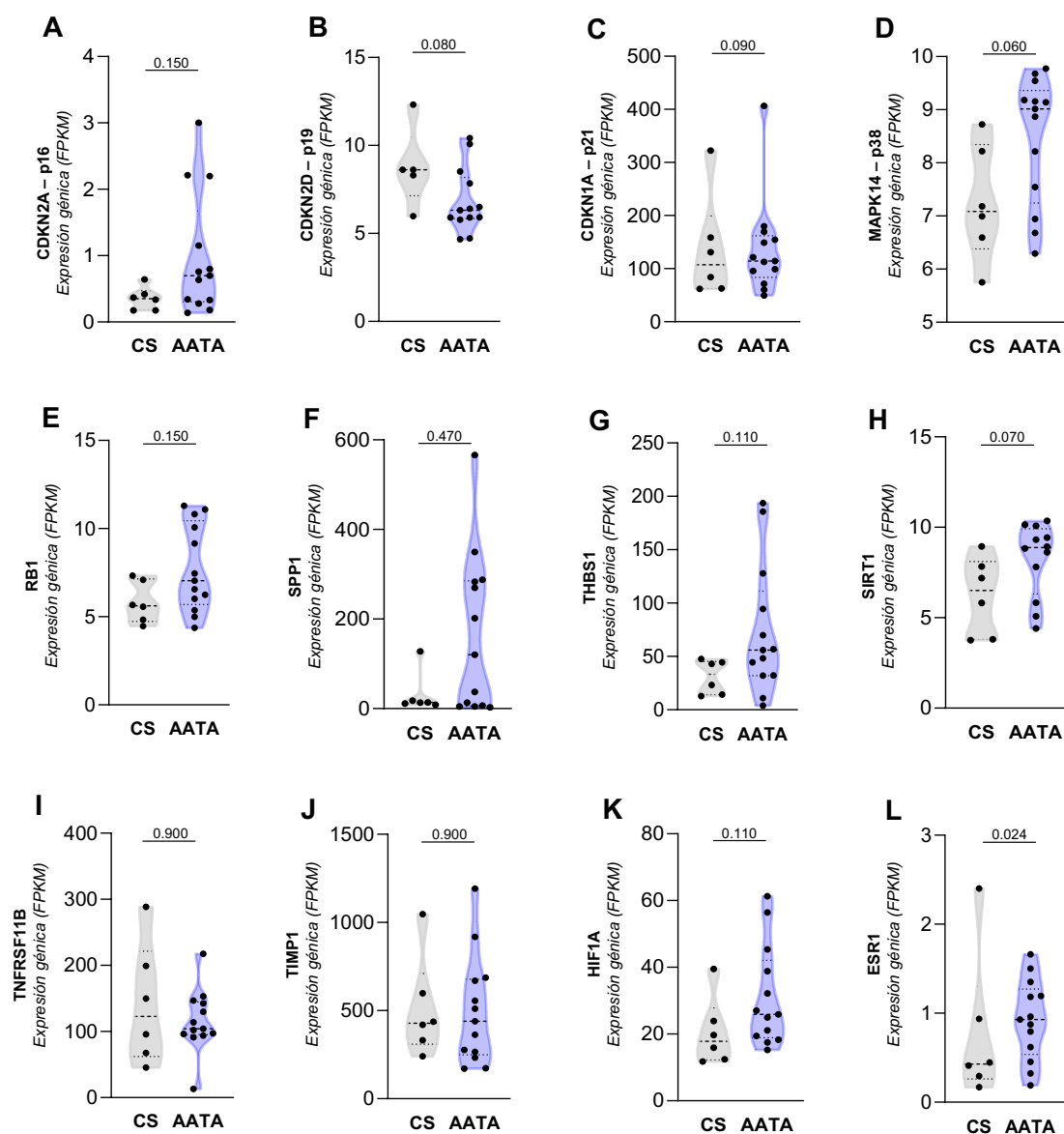


Figura S1. Expresión génica de marcadores de senescencia vascular en el aneurisma de aorta torácica ascendente (ATAA) de pacientes. A-E). Expresión de los genes que codifican para diferentes ciclinas y proteínas reguladoras del ciclo celular. F-L) Expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la senescencia vascular. Los estudios se realizaron en muestras de aorta ascendente de pacientes con AATA (n=13) y controles sanos (CS; n=6). Los datos se expresan como mediana y rangos de cuartiles; se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para evaluar las diferencias entre grupos. Valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.