



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Dilatación aórtica y miocardiopatía por sobrecarga de presión en el síndrome de Marfan: impacto del entrenamiento y del género

Aleksandra Mas-Stachurska



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# **Dilatación aórtica y miocardiopatía por sobrecarga de presión en el síndrome de Marfan: impacto del entrenamiento y del género**

Aleksandra Mas-Stachurska



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

**DILATACIÓN AÓRTICA Y MIOCARDIOPATÍA POR  
SOBRECARGA DE PRESIÓN EN EL SÍNDROME DE  
MARFAN: IMPACTO DEL ENTRENAMIENTO Y DEL  
GÉNERO**

Memoria de tesis doctoral

presentada por Aleksandra Mas-Stachurska

para optar al grado de doctora por la Universitat de Barcelona

Dirigida por:

**Dra. Marta Sitges Carreño**

Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional

Departament de Medicina

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat de Barcelona

2022



La **Dra. Marta Sitges Carreño**, Profesora Agregada de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona y Directora del Institut Clínic Cardiovascular del Hospital Clínic de Barcelona, como directora de tesis

CERTIFICA

Que **Aleksandra Mas-Stachurska** ha realizado la Tesis Doctoral titulada “**Dilatación aórtica y miocardiopatía por sobrecarga de presión en el síndrome de Marfan: impacto del entrenamiento y del género**”, que está en condiciones de ser defendida para la obtención del Grado de Doctora por la Universitat de Barcelona ante el Tribunal correspondiente. Se han cumplido los códigos éticos y de buenas prácticas y no tengo conocimiento de que se haya producido ningún plagio.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Barcelona, 14 de julio de 2022.



---

Marta Sitges Carreño

## AGRADECIMIENTOS

A mi querido Enric

por hacerlo posible  
por fin te hago la dedicatoria.

A Rianne de Bruin

sin ti, esta tesis no existiría.

Al Prof. Gustavo Egea

por tus conocimientos, recursos  
e inestimable amabilidad.

Al Dr. Berto Bouma

por hacerlo todo tan sencillo  
por tu jovialidad y sonrisa.

Al Dr. Edu Guasch

por compartir tus insondables  
ideas y conocimientos.

A la Prof. Marta Sitges

por tu dedicación  
tus ideas acertadas  
tu rigor científico.

Al Dr. Julio Martí

porque siempre has creído en mí  
también en los momentos difíciles.

Al Dr. Lluís Recasens

porque compartes conmigo los valores  
y principios.

Al Prof. Bart Bijnens

por la brillante idea.

A la Dra. Laura Sanchís, Dra. Silvia Montserrat y Dra. Susanna Prat

por vuestra amabilidad.

A la Dra. Zeliha Koyak, Dra. Loredana Nunno y Laura Barberà

por vuestra amistad.

A la Dra. Montse Batlle

por tus consejos y eterna simpatía.

A mi madre, Barbara

A mis hermanos, Weronika y Karol

porque habéis estado siempre conmigo.

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Epidemiología y diagnóstico.....	1
1.2 Bases moleculares de la fisiopatogenia.....	4
1.3 Sintomatología. Manifestaciones cardiovasculares.....	6
1.3.1 Aorta.....	6
1.3.2 Técnicas de imagen cardiovascular en la detección de patología aórtica en el síndrome de Marfan.....	8
1.3.3 Corazón.....	11
1.3.4 Técnicas de imagen cardiovascular en la detección de las manifestaciones cardíacas.....	14
1.4 Pronóstico y tratamiento.....	17
1.4.1 Tratamiento farmacológico.....	17
1.4.2 Actividad física.....	21
1.5 Impacto diferencial del género en la presentación del síndrome de Marfan...	26
<b>Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 Hipótesis.....	27
2.2 Objetivos.....	28
<b>Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS Y RESULTADOS</b> .....	30
3.1 Esquemas de las poblaciones incluidas en la investigación de la tesis.....	30
3.2 Artículo 1 (doi: 10.1038/s41598-021-95263-5).....	33
3.3 Artículo 2 (doi: 10.1161/JAHA.117.006438).....	44
3.4 Artículo 3 (doi: 10.1016/j.recesp.2022.05.006).....	71
<b>Capítulo 4: DISCUSIÓN</b> .....	74
<b>Capítulo 5: CONCLUSIONES</b> .....	85
<b>REFERENCIAS</b> .....	86



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Manifestaciones sistémicas del SM.....	2
Figura 2	Rupturas de láminas elásticas en la túnica media de la aorta ascendente.....	4
Figura 3	Dilatación de la raíz aórtica.....	7
Figura 4	Medición del diámetro de raíz aórtica en la ecocardiografía.....	8
Figura 5	Ecocardiografía, plano parasternal longitudinal.....	9
Figura 6	Medición de la hipertrofia del septo interventricular basal en diástole (SIVd).....	15
Figura 7	Signo de engrosamiento postsistólico (EPS).....	16

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Criterios de Ghent modificados.....	3
Tabla 2	Ensayos clínicos aleatorizados que evalúan losartan y $\beta$ bloqueantes en el síndrome de Marfan.....	18
Tabla 3	Estudios de entrenamiento físico en personas con aneurisma aórtico abdominal.....	24

## GLOSARIO

<b>AAA</b>	Aneurisma aórtico abdominal
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>ARA2</b>	Antagonistas del receptor de angiotensina 2
<b>AT1-R</b>	Receptor de la angiotensina II tipo I
<b>cbEGF</b>	Factor de crecimiento transportador de calcio
<b>CV</b>	Cardiovasculares
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de la angiotensina
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EPS</b>	Engrosamiento postsistólico
<b>FBN1</b>	Fibrilina 1
<b>hs-CRP</b>	Prueba de proteína C-reactiva de alta sensibilidad
<b>iNOS / NOS-2</b>	Sintasa inducible del óxido nítrico
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>RPE</b>	Índice de esfuerzo percibido
<b>RRC</b>	Ritmo de reserva cardíaca o frecuencia cardíaca de reserva
<b>SIVd</b>	Septo interventricular basal en diástole
<b>SM</b>	Síndrome de Marfan
<b>TA</b>	Tensión arterial
<b>TAD</b>	Tensión arterial diastólica
<b>TAS</b>	Tensión arterial sistólica
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformador beta
<b>Vo<sub>2</sub></b>	Consumo de oxígeno

## PREFACIO

Esta tesis esta realizada en base al compendio de 3 articulos que responden a los objetivos planteados en la misma y que se enumeran a continuación:

### Publicaciones en revistas indexadas

- 1. Mas-Stachurska A**, Egea G, de Bruin-Bon R, Rudenick P, Sanchis L, Bouma BJ, Mulder BJ, Bijmens B, Sitges M. Postsystolic thickening is a potential new clinical sign of injured myocardium in marfan syndrome. *Sci Rep*. 2021 Aug 4;11(1):15790. doi: 10.1038/s41598-021-95263-5.  
Factor de impacto: 4,380. Cuartil: Q1. Área de conocimiento: Multidisciplinary.
- 2. Mas-Stachurska A**, Siegert AM, Batlle M, Gorbenko Del Blanco D, Meirelles T, Rubies C, Bonorino F, Serra-Peinado C, Bijmens B, Baudin J, Sitges M, Mont L, Guasch E, Egea G. Cardiovascular Benefits of Moderate Exercise Training in Marfan Syndrome: Insights From an Animal Model. *J Am Heart Assoc*. 2017 Sep 25;6(9):e006438. doi: 10.1161/JAHA.117.006438.  
Factor de impacto: 5,501. Cuartil: Q1. Área de conocimiento: Cardiac & Cardiovascular Systems.
- 3. Mas-Stachurska A**, Bouma BJ, de Bruin-Bon R, Mulder B, Bijmens B, Sitges M. Remodelado cardiaco asociado con el síndrome de Marfan: impacto del sexo y el tratamiento vasodilatador. *Rev Esp Cardiol*. 2022. doi: 10.1016/j.recesp.2022.05.006.  
Factor de impacto: 6,975. Cuartil: Q2. Área de conocimiento: Cardiology and Cardiovascular Medicine.

Esta tesis doctoral titulada “Dilatación aórtica y miocardiopatía por sobrecarga de presión en el síndrome de Marfan: impacto del entrenamiento y del género” está dedicada a una enfermedad minoritaria, pero con una alta incidencia de diferentes patologías cardiovasculares que aquejan los pacientes a lo largo de la vida.

El enfoque novedoso de esta tesis consiste en una extensión considerable del estudio de la función miocárdica y no tanto aórtica, la cual, hasta ahora, solía preocupar más a los investigadores y médicos tratantes. Demostramos que el miocardio del ventrículo izquierdo presenta signos de afectación de su trabajo efectivo en las edades tempranas de la vida adulta pudiendo predisponer a la disfunción y desarrollo de la sintomatología clínica. El hecho interesante referente a este punto de investigación es que la detección y posterior seguimiento de estos signos de lesión miocárdica se puede realizar mediante una técnica de imagen cardíaca ampliamente extendida en la práctica clínica como es la ecocardiografía avanzada.

Otro enfoque novedoso es el experimento en el modelo murino del síndrome de Marfan con el entrenamiento físico. El hecho de que la actividad física ha sido desaconsejada hasta hace poco a los sujetos afectados de esta patología minoritaria ha podido tener, entre otras dolencias, implicaciones en su calidad de vida y bienestar psicológico. Nuestro resultado en el que no se encontró efecto deletéreo de ejercicio físico en la aorta ni el miocardio, sino más bien al revés, alienta a realizar similares estudios en humanos y establecer bases a la reconsideración de dicha prohibición.

El tercer enfoque novedoso es ver si la función miocárdica del ventrículo izquierdo está más afectada según el sexo e investigar si el sexo –es un modificador del manejo clínico– se asocia a diferentes estrategias terapéuticas por parte de los profesionales de salud involucrados en el seguimiento de estos sujetos. Haber demostrado en nuestra serie que las enfermas femeninas tienen una menor probabilidad a ser tratadas y la existencia de una mayor incidencia de la afectación miocárdica entre ellas puede alentar a realizar mayores esfuerzos en investigar esta problemática en un grupo numeroso de sujetos y dar un siguiente paso hacia una mayor sensibilización actual al problema de salud cardiovascular en la mujer.

Confiamos en que las aportaciones científicas de esta tesis den base a nuevas hipótesis y experimentos, sirvan para la ampliación de conocimientos sobre el tema y, por último, animen a valorar posibles modificaciones del manejo de esta patología, resultando, especialmente, en un enfoque más individualizado en cada sujeto.

## RESUMEN

### **Dilatación aórtica y miocardiopatía por sobrecarga de presión en el síndrome de Marfan: impacto del entrenamiento y del género.**

#### **Introducción**

Estudios recientes sugieren la existencia de una afectación miocárdica propia en el síndrome de Marfan (SM). Se observan alteraciones tales como leve disfunción auricular, hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI), dilatación y disfunción sistólica del VI y alteración en la relajación diastólica. No obstante, la fisiopatología de esta lesión miocárdica y los mecanismos en los que se produce precisan de más aclaración. Cabe mencionar que no hay datos sobre el potencial impacto diferencial del sexo en la manifestación de los signos de la miocardiopatía en SM. La detección precoz de la lesión miocárdica podría ayudar en la toma de decisiones terapéuticas y preventivas permitiendo aplicar terapias más dirigidas y de manera precoz. Una de las estrategias dirigidas podría ser hacia la reducción más intensiva de la postcarga, siendo más agresivos con el tratamiento vasodilatador. Tampoco se dispone de suficiente evidencia para apoyar el hecho de que el deporte con una carga mayor que baja siempre se haya desaconsejado en pacientes con el SM. Los efectos del entrenamiento en pacientes con SM son, en realidad, ampliamente desconocidos.

#### **Hipótesis**

La hipótesis global de esta tesis es que los sujetos con el SM sufren precozmente de miocardiopatía con características compatibles con miocardiopatía por sobrecarga de presión. Como una hipótesis más concreta postulamos que los pacientes con el SM pueden tener un miocardio ventricular más sensible a la postcarga y por consiguiente pueden desarrollar una mayor heterogeneidad segmentaria de estrés de la pared del VI debido al tejido anormal subyacente de la pared arterial y/o miocárdica. En ese sentido, planteamos que el entrenamiento crónico a cargas no elevadas podría ayudar a reducir la presión arterial y la postcarga en estos sujetos, y a mejorar la funcionalidad aórtica, disminuyendo eventualmente la progresión de la dilatación aórtica. Concomitantemente, planteamos la hipótesis de que exista un impacto diferencial del género en la manifestación de los signos de la miocardiopatía en el SM.

## **Objetivos**

Los objetivos de la tesis son determinar si existe una respuesta funcional miocárdica anormal en el SM mediante la detección de la deformación miocárdica alterada y si ésta presenta patrones de deformación regional alterados típicos de los estados de incremento de postcarga. Adicionalmente, la tesis pretende evaluar el impacto del ejercicio físico en la dilatación de aorta ascendente y la miocardiopatía en el SM. Asimismo, el objetivo final de la tesis es examinar diferencias de género en la presentación de dicha deformación alterada y los factores asociados a la misma.

## **Métodos**

En el primer proyecto se han estudiado tres poblaciones: ratones de 4 y 9 meses de edad y pacientes humanos. Se les ha realizado la medición de la presión arterial y la ecocardiografía avanzada con el Modo 2D, M y Doppler Tisular. En la ecocardiografía se ha determinado la prevalencia del signo de engrosamiento postsistólico y se han evaluado mediciones de las dimensiones aórticas, ventriculares y la función sistólica del ventrículo izquierdo.

En el segundo proyecto se han analizado datos de la presión arterial y análisis de la ecocardiografía avanzada en la población de los ratones de 4 meses antes y después de la intervención en forma del programa del entreno físico controlado a moderada carga durante 5 meses.

En el tercer proyecto se han analizado y correlacionado los datos clínico-farmacológicos con los datos ecocardiográficos de los pacientes humanos según el sexo femenino-masculino.

## **Principales resultados**

El principal hallazgo del primer subproyecto fue la alta prevalencia de engrosamiento postsistólico (EPS) en el síndrome de Marfan (SM), detectado, tanto en un modelo experimental murino, como en una cohorte de pacientes con SM. En los ratones de 4 meses de edad, la presencia de EPS se asoció a la dilatación de la raíz aórtica a pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la presión arterial entre el grupo de ratones con EPS y aquellos sin EPS. Curiosamente, los pacientes con EPS muestran una presión arterial sistólica más baja que los controles y se observa una asociación entre el aumento de la prevalencia de EPS y la dilatación aórtica en pacientes muy jóvenes.

El experimento del segundo proyecto evidencia que el ejercicio regular de intensidad moderada no acelera la tasa de dilatación aórtica, sino que más bien normaliza su progresión a valores comparables al observado en los animales sanos. Los ratones con SM del grupo entrenado mostraron un ligero aumento de la presión arterial sistólica, en comparación con los ratones sin SM. Sin embargo, vimos que a pesar de este incremento en la presión arterial, hubo una menor dilatación aórtica y una menor hipertrofia de ventrículo izquierdo.

Nuestro tercer proyecto revela un claro impacto diferencial del género, siendo significativamente más frecuente el EPS en las mujeres. Esta característica se asocia al hecho de que las mujeres reciben con menor frecuencia tratamiento con betabloqueadores y losartan, a pesar de que los diámetros aórticos y ventriculares son muy similares entre ambos géneros. Cabe destacar que la presión arterial es más alta en el caso de mujeres con EPS presente, en comparación con las que no presentan este signo.

## **Conclusiones**

La alta prevalencia del signo de engrosamiento postsistólico (EPS), tanto en ratones como en pacientes con síndrome de Marfan (SM), sugiere la existencia de miocardiopatía por sobrecarga de presión. Este marcador puede proporcionar una herramienta de detección y monitorización del remodelado cardíaco y puede apoyar la decisión de iniciar terapias preventivas en pacientes con SM, incluso con niveles normales de presión arterial. En un modelo murino de SM, el ejercicio dinámico de intensidad moderada se asocia a una menor dilatación aórtica, menor hipertrofia cardíaca y menor frecuencia de EPS. La presencia de EPS se observa con mayor frecuencia en pacientes mujeres con SM que en pacientes de sexo masculino; sin embargo, las mujeres con SM reciben con menor frecuencia tratamiento vasodilatador a pesar de que su presión es significativamente más alta.



## **SUMMARY**

**Aortic dilatation and pressure overload cardiomyopathy in Marfan syndrome: impact of training and gender.**

### **Introduction**

Several studies have observed myocardial abnormalities in Marfan syndrome (MS). Findings such as mild atrial dysfunction, left ventricular (LV) hypertrophy, LV dilation, and impaired LV function with decreased biventricular ejection fraction and abnormal diastolic ventricular relaxation have been reported. However, the pathophysiology and the mechanisms that influence the myocardial injury are not fully understood. Moreover there are no data on the potential differential impact of gender on manifestation of the signs of cardiomyopathy in MS. The early detection of myocardial injury could help in the process of therapeutic and preventive decisions, allowing the application of more targeted and prompt therapies. One of the directed strategies could be a more intensive reduction of afterload with more aggressive pharmacological treatment. There is not enough evidence to support the fact that sport with a load greater than low has always been discouraged in patients with MS. Indeed, the effects of training in MS patients are currently unknown.

### **Hypotheses**

The main hypothesis of this thesis is that subjects with MS suffer early from cardiomyopathy with features of pressure overload cardiac lesion. As a more concrete hypothesis, we postulate that patients with MS may have the ventricular myocardium more susceptible to afterload and therefore may develop greater segmental LV wall stress heterogeneity due to underlying abnormal tissue of the arterial wall and/or myocardium. In this regard, we hypothesize that physical training at intermediate loads could help reduce blood pressure and afterload in these subjects, and furthermore it could improve aortic functionality, eventually reducing the progression of aortic dilatation. Additionally we hypothesize that there is a differential impact of gender on the manifestation of signs of cardiomyopathy in MS.

## **Objectives**

The objectives of the thesis are mainly to determine if there is an abnormal myocardial functional response in MS by detecting altered myocardial deformation and if it shows typical patterns of altered deformation in the increased afterload scenarios. Moreover, the thesis aims to evaluate the impact of physical exercise on ascending aortic dilatation and cardiomyopathy in MS. Likewise, the final objective of the thesis is to examine gender differences in the manifestation and associated factors with the altered deformation.

## **Methods**

In the first project, three populations have been studied: 4- and 9-month-old mice and human patients. Blood pressure measurement and advanced echocardiography with 2D, M and Tissue Doppler mode have been performed. The prevalence of the postsystolic thickening sign and measurements of aortic and ventricular dimensions and left ventricular systolic function have been analyzed.

In the second project, blood pressure data and advanced echocardiography analysis were analyzed in the population of 4 month-old mice before and after the controlled physical training program at moderate load during 5 months.

In the third project, the clinical and pharmacological data have been analyzed and correlated with the echocardiographic data of human patients according to female-male sex.

## **Main results**

The main finding of the first project was the high prevalence of postsystolic thickening (PST) in Marfan syndrome (MS), detected both in the experimental murine model and in a cohort of patients with MS. In 4-month-old mice, the presence of PST was associated with aortic root dilatation despite the fact that there were no statistically significant differences in blood pressure between the group of mice with PST and those without PST. Interestingly, human patients with PST show lower systolic blood pressure than controls and an association between increased prevalence of PST and aortic dilatation was observed in very young patients.

The experiment of the second project show that regular exercise of moderate intensity does not accelerate the rate of aortic dilatation, but rather normalizes its progression to values comparable to those observed in healthy animals. The MS mice in the trained group showed a

slight increase in systolic blood pressure, compared to the wild type mice. However, we found that despite this increase in blood pressure, there was less aortic dilation and less left ventricular hypertrophy.

Our third project reveals a clear differential impact of gender, the PST being significantly more frequent in women. This finding is associated with the fact that women receive treatment with beta-blockers and losartan less frequently, despite the fact that aortic and ventricular diameters are very similar between both genders. Noticeably the blood pressure is higher in women with PST present, compared to those without this sign.

## **Conclusions**

The high prevalence of the postsystolic thickening (PST), both in mice and in patients with Marfan syndrome (MS), suggests the finding of pressure overload cardiomyopathy. The postsystolic thickening can provide a tool for detection and monitoring of cardiac remodeling and can support the decision to start preventive therapies in patients with MS, even with normal blood pressure levels. In a murine model of MS, moderate-intensity dynamic exercise is associated with less aortic dilation, less cardiac hypertrophy, and lower PST prevalence. The presence of PST is observed more frequently in female patients with MS than in male patients; however, women with MS receive vasodilator treatment less frequently despite the fact that their pressure is significantly higher.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epidemiología y diagnóstico

El síndrome de Marfan (SM, OMIM #154700) es una de las enfermedades de colágeno hereditarias, transmitida de forma autosómica dominante y causada principalmente por una mutación heterocigota en el gen que codifica la fibrilina 1 (FBN1) en el cromosoma 15, con una incidencia aproximada de 1-3 por cada 10.000 personas vivas según las series (1,2,3,4). Afecta por igual a ambos sexos y su distribución es mundial. En 1896, Antoine-Bernard-Jean Marfan describió por primera vez esta entidad en una niña de 5 años con varias anomalías esqueléticas (5). En 1995, McKusick incluyó el SM en la categoría de enfermedades del colágeno hereditarias (6). Desde entonces el conocimiento de la enfermedad se ha ampliado de forma progresiva, con la descripción de afectaciones oculares, esqueléticas, cardiovasculares, pulmonares, cutáneas y en los tegumentos que definen la enfermedad, recopiladas en los criterios de Ghent, que en la actualidad conforman la base del diagnóstico de la enfermedad en adultos (7). El SM se caracteriza por una alta penetrancia, de forma que todos los portadores virtualmente desarrollan la enfermedad, aunque con marcada heterogeneidad fenotípica (8).

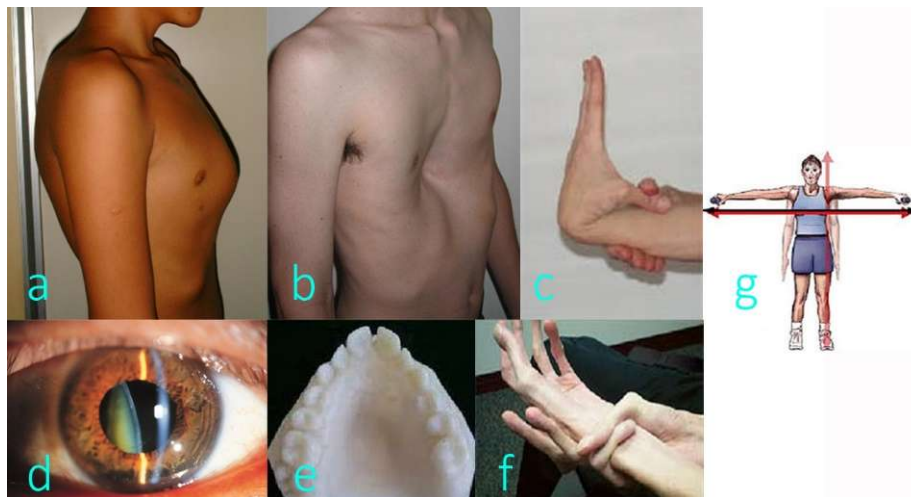
En la mayoría de los casos del síndrome de Marfan (75%) existen antecedentes familiares. No obstante, en alrededor del 25% de los casos se detectan mutaciones *de novo* (9). Se han descrito más de 1.000 mutaciones distintas siendo la mayoría de ellas del tipo de cambio de sentido (*missense-type*), alterando alguno de los 2.871 aminoácidos que constituyen la proteína, usualmente en los dominios homólogos a los del factor de crecimiento epidérmico (EGF), y afectando residuos de cisteína o aminoácidos implicados en el transporte de calcio y, además, exclusivos de cada caso índice o familiar (10,11,12). A nivel molecular, el gen de la FBN1 que está localizado en el cromosoma 15q21.1 codifica una glicoproteína (profibrilina 1) que se convierte en FBN1. Está constituido principalmente por la repetición de dominios homólogos de factor de crecimiento transportador de calcio (cbEGF) y dominios que contienen 8 residuos de cisteína (13). A pesar de que algunas mutaciones parecen predecir un fenotipo más agresivo, en general no existe una clara correlación entre el genotipo detectado y el fenotipo expresado. La variabilidad fenotípica intrafamiliar también es importante en el SM (6,8). Asimismo, las mutaciones en el gen de la FBN1 no son específicas del SM y se han detectado también en otras fibrilopatías (9).

La FBN1 ejerce control sobre la vía de señalización del factor de crecimiento transformador beta (TGF-beta) alterando su activación y puede provocar su señalización y activación excesivas. Cabe destacar que en el síndrome de Loews-Dietz y en algunos pacientes con aneurismas

## 1. Introducción

familiares y disección aórtica, entidades que comparten muchas manifestaciones fenotípicas con el SM, se detectan mutaciones en los genes del receptor del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB $\beta$ 1) y beta 2 (TGFB $\beta$ 2) (14,15). La identificación de mutaciones del gen FBN1, del gen FBN2 en el síndrome de Beals y de los receptores TGFB $\beta$ 1 y TGFB $\beta$ 2 ha aumentado el conocimiento sobre la patogenia del SM y de otras enfermedades relacionadas, y podría ayudar en la caracterización de un mayor espectro de mutaciones asociadas a las enfermedades genéticas de colágeno.

Puesto que el SM se asocia a una muerte prematura por disección aórtica en pacientes sin tratamiento, la realización de un diagnóstico correcto y precoz es de gran importancia. En la actualidad el diagnóstico no se realiza de forma exclusiva con el análisis genético molecular, ya que a veces no está disponible; además, la detección de la mutación no es de alta rentabilidad y no todas las mutaciones del gen de la FBN1 se asocian al SM. En la actualidad el diagnóstico de SM se realiza por criterios clínicos (criterios de Ghent modificados), que en la mayoría de los casos son suficientes para establecer el diagnóstico (Tabla 1) (1). En los pacientes que cumplen los criterios de Ghent modificados se puede establecer un diagnóstico certero, pero los que no lo hagan y presenten manifestaciones sistémicas compatibles, precisarán de evaluación clínica completa, así como seguimiento oftalmológico y ecocardiográfico en la mayoría de los casos. En estas situaciones de diagnóstico clínico dudoso, el análisis genético del FBN1 podría ayudar en la confirmación del diagnóstico (16) (Figura 1).



**Figura 1. Manifestaciones sistémicas del SM.** a: pectus carinatum; b: pectus excavatum; c: hipermotilidad articular; d: luxación de cristalino; e: dientes apiñados; f: dedos largos; g: extremidades largas. Modificado de: Zapata Mendo, P. Abraham Lincoln y el Síndrome de Marfan. Monografías, S.A. 2011.

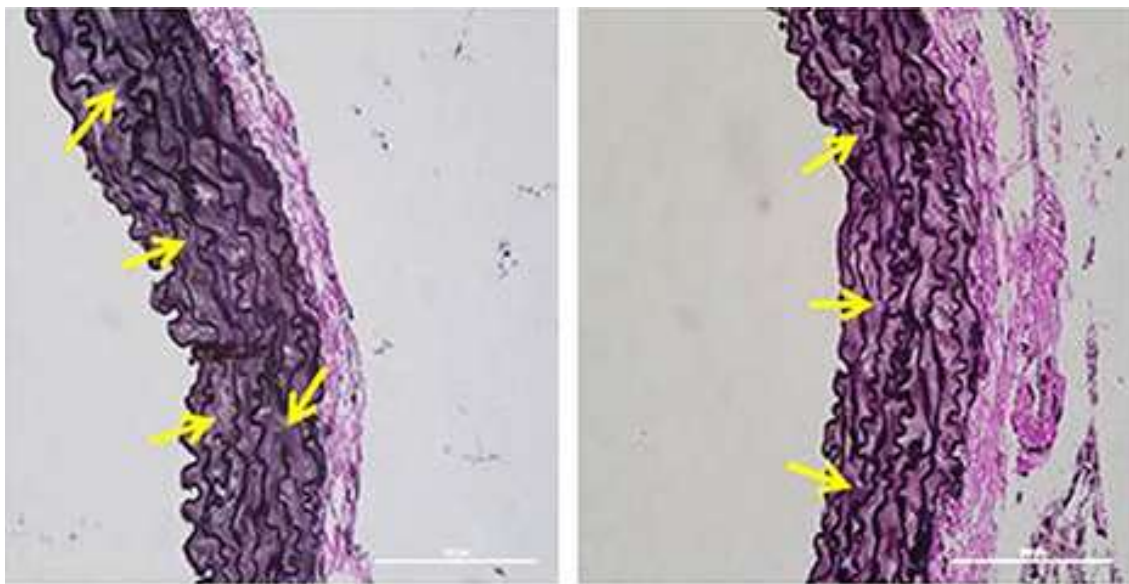
Tabla 1. Criterios de Ghent modificados

CRITERIOS DE GHENT MODIFICADOS			
Ausencia de historia familiar		Presencia de historia familiar	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ao (<math>Z \geq 2</math>) y LC = SM</li> <li>• Ao (<math>Z \geq 2</math>) y bonafide FBN1 = SM</li> <li>• Ao (<math>Z \geq 2</math>) y puntuación sistémica (<math>\geq 7</math>) = SM</li> <li>• LC y FBN1 con conocida asociación a Ao = SM</li> <li>• LC con o sin afectación sistémica y con FBM1 no asociada a afectación aórtica o ausencia FBM1 = luxación del cristalino familiar</li> <li>• Ao (<math>Z \geq 2</math>) y puntuación sistémica (<math>\geq 5</math> con al menos un hallazgo esquelético) sin LC = fenotipo MASS</li> <li>• PVM y Ao (<math>Z &lt; 2</math>) y puntuación sistémica (<math>&lt; 5</math>) sin LC = síndrome de prolapso de la válvula mitral</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• LC e historia familiar SM = SM</li> <li>• Puntuación sistémica (<math>\geq 7</math>) e historia familiar SM = SM</li> <li>• Ao (<math>Z \geq 2</math>) en <math>&gt;20</math> años o Ao (<math>Z \geq 3</math>) en <math>&lt;20</math> años e historia familiar SM</li> </ul>	
Hallazgos sistémicos	Puntuación	Hallazgos sistémicos	Puntuación
• Signo de Wrist y Thumb	3	• Signo de Wrist y Thumb	-1
• Pectum carinatum	2	• Pectum excavatum o asimetría torácica	-1
• Deformidad en el retropié	2	• Pies planos	-1
• Neumotórax	2		
• Ectasia dural	2		
• Protusión acetabular	2		
• Reducción del segmento superior/inferior y aumento de la brazada sin escoliosis severa	1		
• Escoliosis y/o cifosis toracolumbar	1		
• Hallazgos faciales (3/5): Dolicocefalia, enoftalmos, fisura palpebral con inclinación inferior, hipoplasia malar, retrognatia	1		
• Estrías en la piel	1		
• Miopía $> 3$ dioptrías	1		
• Prolapso válvula mitral	1		

SM: diagnóstico en ausencia de datos de SLD, ED tipo IV y SGS, realizando si procede TGF-BR1 y 2, COI3a o estudio del colágeno; Ao: diámetro aórtico desde los senos de Valsalva medido con Z score o disección de la aorta; LC: luxación del cristalino; SM: síndrome de Marfan; PVM; prolapso de la válvula mitral; SLD: síndrome de Loeys-Dietz; SGS: síndrome de Shprintzen-Goldberg; ED: síndrome de Ehlers-Danlos. Máximo total: 20 puntos; score  $\geq 7$  indica afectación sistémica. Modificado de (1).

## 1.2 Bases moleculares de la fisiopatogenia

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología molecular en el SM y en otros síndromes relacionados, el mecanismo molecular que conduce al desarrollo del fenotipo no se conoce de forma clara. El hallazgo de degeneración de la túnica media de la pared aórtica de pacientes con el SM ocurre de forma más precoz que en otros pacientes con aneurismas torácicos. La proteína mutada en el SM, FBN1, es una glicoproteína extracelular de 350 kilodaltons, muy parecida entre las diferentes especies animales. La polimerización extracelular de las fibrilinas en monómeros forma, en asociación con otras proteínas como el TGF-beta, macroagregados llamados microfibrillas. Las microfibrillas proveen un fuerte soporte estructural y, en asociación con la elastina, forman las láminas elásticas, que aportan elasticidad a la estructura, normalmente de forma temporal dependiendo del tejido (9). La lesión histológica más representativa en el SM es el aumento de la ruptura de láminas elásticas en la túnica media de la aorta ascendente. Además, se observa un aumento del contenido de colágeno como mecanismo compensatorio de la rotura de la fibra elástica, lo que origina, a su vez, fibrosis por reemplazo en la túnica media aortica (Figura 2).



**Figura 2. Rupturas de láminas elásticas en la túnica media de la aorta ascendente.** Las flechas amarillas enseñan láminas rotas. Cortesía de: Jiménez-Altayó F, Siebert A-M, Bonorino F, Meirelles T, Barberà L, Dantas AP, Vila E and Egea G. Differences in the Thoracic Aorta by Region and Sex in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Front. Physiol.* 2017;8:933. doi: 10.3389/fphys.2017.00933.

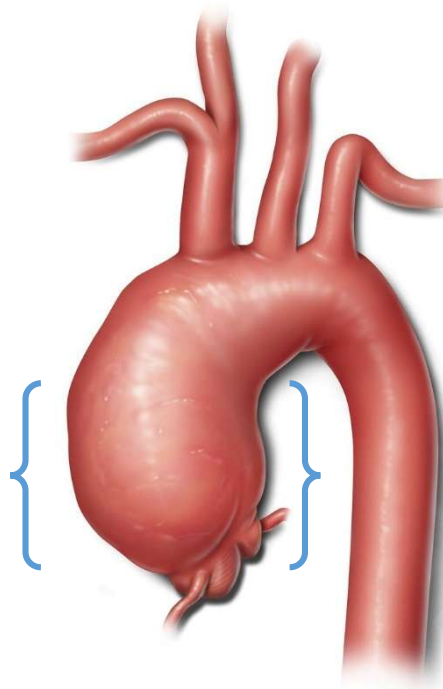
Durante mucho tiempo se pensó que la base exclusiva de la enfermedad era la pérdida de la integridad del tejido conectivo con la reducción y la fragmentación de las fibras elásticas y aumento de la fibrosis en los tejidos afectados. Esto ofrece una explicación parcial de la patología aórtica y no de otras manifestaciones de la enfermedad como el sobrecrecimiento del hueso largo, el engrosamiento valvular y la hipoplasia muscular (13). El modelo fisiopatológico actual ha cambiado gracias a estudios experimentales con ratones con deficiencia de FBN1. El siguiente mecanismo fisiopatológico más barajado actualmente constituye el incremento de la vía de señalización TGF-beta. En los modelos murinos experimentales, la deficiencia estructural de FBN1 conduce a una activación de la citocina TGF-beta, la cual tiene un papel fundamental en el desarrollo y el mantenimiento de varios tejidos. La activación de la TGF-beta parece contribuir al desarrollo de enfisema pulmonar, dilatación aórtica e hipoplasia muscular que se observa en el SM (17,18). Habashi et al (2006) compararon el efecto del fármaco losartan (bloqueador del TGF-beta) y los fármacos betabloqueadores en unos ratones heterocigotos para la mutación del gen de la FBN1 (18). Al final del experimento, se observó que la pared aórtica presentaba una arquitectura mejor conservada exclusivamente en el grupo tratado con losartan, por lo que, al menos en el modelo murino, los cambios en la aorta podrían ser inhibidos de forma efectiva por la administración de este fármaco antagonista del TGF-beta. Otro mecanismo patogénico estudiado apunta a la activación de las metaloproteinasas (MMP), las cuales constituyen una gran familia de enzimas que procesan y degradan un gran número de sustratos, como el colágeno y la elastina. La remodelación progresiva de los vasos arteriales en el SM se correlaciona con el aumento de la actividad de la MMP-2 y MMP-9 favoreciendo la proteólisis de la matriz extracelular. Este concepto de SM como un trastorno estructural del tejido conectivo que se manifiesta como anomalías en el desarrollo que alteran la señal de las citocinas, abriría nuevas e inesperadas dianas terapéuticas (19,20,21).



## **1.3 Sintomatología. Manifestaciones cardiovasculares**

### **1.3.1 Aorta**

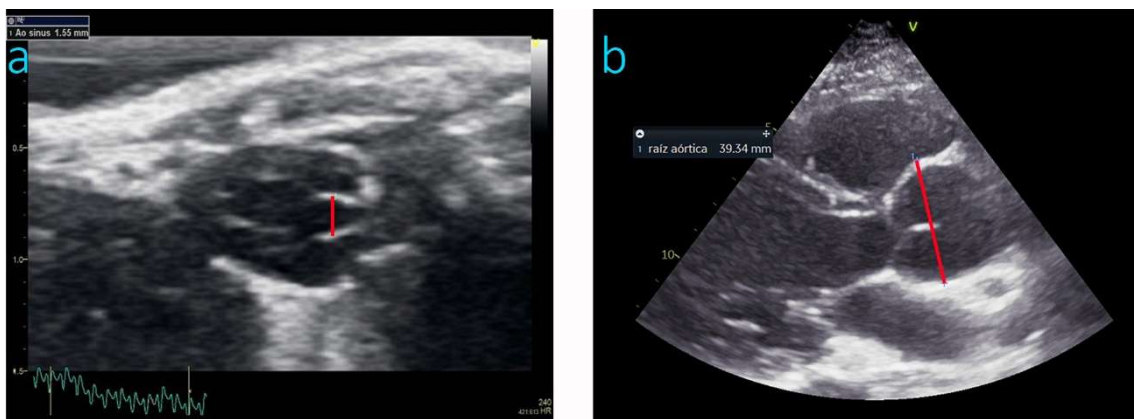
Las principales manifestaciones cardiovasculares en el SM incluyen la dilatación de la aorta, especialmente localizada a nivel de los senos de Valsalva, insuficiencia valvular aórtica y el prolapso de la válvula mitral, siendo la más temida la dilatación de aorta por su predisposición a la disección y rotura y, en muchas ocasiones, a la muerte súbita consecuente. La mayoría de las series experimentales y clínicas no encuentran diferencias de género en la presentación de las manifestaciones cardiovasculares (22,23). La dilatación de la raíz aórtica se manifiesta ya a edad temprana con una prevalencia del 70-80%. Comprensiblemente, los principales esfuerzos se han centrado en descubrir los mecanismos de dilatación aórtica que conducen a la disección y ruptura, una sello distintivo del SM que determina críticamente la supervivencia. Se han estudiado las características y la velocidad de la progresión de la dilatación y se ha identificado que el riesgo de la rotura aumenta significativamente a partir de un cierto diámetro de aorta (en la mayoría de los casos a partir de 50 mm, o de 45 mm en casos de otros factores de riesgos adicionales), estableciéndose ese valor como indicación para cirugía de reemplazo o reparación aórtica. Estos avances en la investigación básica se han traducido recientemente a ensayos clínicos cuyo objetivo era intervenir en la progresión de la dilatación aórtica, predominantemente probando fármacos de los grupos de bloqueadores beta y antagonistas de los receptores de angiotensina II como losartan (24). Desafortunadamente, la mayoría de los ensayos no han podido demostrar una significativa mejora en la profilaxis de la muerte súbita por disección aórtica y la intervención quirúrgica sigue siendo la única medida que mejora el pronóstico vital (25) (Figura 3).



**Figura 3. Dilatación de la raíz aórtica.** Las llaves enseñan el segmento proximal afectado. Cortesía de: LeMaire SA, Weldon SA, Coselli JS. Total aortic arch replacement: current approach using the trifurcated graft technique. *Ann Cardiothorac Surg.* 2013;2(3):347-52. doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.05.02.

### 1.3.2 Técnicas de imagen cardiovascular en la detección de patología aórtica en el SM

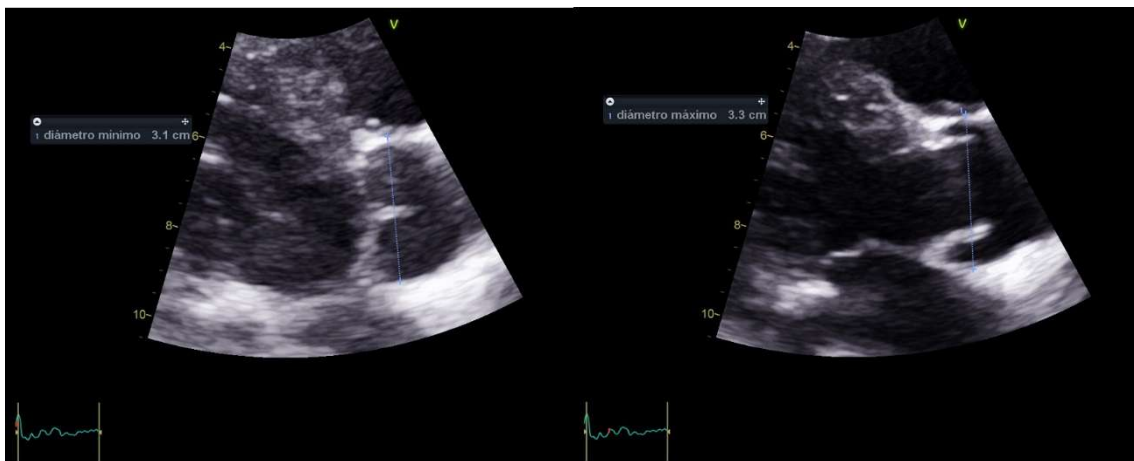
La ecocardiografía transtorácica es la prueba fundamental para la evaluación y el seguimiento de la afectación cardiovascular en el SM. Para la evaluación de la dilatación aórtica, la proyección de elección es el eje largo de la ventana paraesternal; todas las medidas deben ser estrictamente perpendiculares al eje de la aorta y comparadas con normogramas dependiendo de la edad y de la superficie corporal del paciente (26) (Figura 4).



**Figura 4. Medición del diámetro de raíz aórtica en la ecocardiografía, a: en un ratón afecto de SM; b: en un paciente con SM.**

La dilatación aórtica se define como un diámetro normalizado mayor a la media en más dos desviaciones estándar ( $Z$  score  $> 2$ ). No obstante, a veces, los nomogramas no son válidos en pacientes con tallas superiores al percentil 95, pudiéndose sobreestimar en estos pacientes el diámetro de la aorta. En estos casos, algunos autores proponen la medición del ratio entre el diámetro de los senos de Valsalva y del anillo aórtico (8,27,28). Por lo general, este ratio permanece constante en personas sanas y es independiente de la edad y de la superficie corporal, pudiendo ser de ayuda en la evaluación en niños (un ratio  $> 1,45$  predeciría la existencia de dilatación aórtica con una sensibilidad del 82% y una especificidad del 100%) (22). No obstante, este ratio, aun siendo de ayuda, no está suficientemente validado y tiene falsos positivos, como p. ej. en los pacientes con anillo aórtico pequeño. En pacientes con mala ventana ecocardiográfica, tanto la tomografía computarizada (TC) como la resonancia magnética (RM) son de ayuda para el diagnóstico y seguimiento de pacientes, así como para evaluar el resto de la aorta (que puede estar afectada hasta en el 10% de los pacientes).

Los esfuerzos científicos en encontrar los predictores de la progresión de la dilatación de aorta han resultado en la identificación de unos patrones característicos de comportamiento de aorta, tales como baja distensibilidad y alta rigidez de la pared aórtica como marcadores estigmas de la aorta en el SM (29). Estas propiedades mecánicas de la aorta se evalúan mediante la combinación de datos *in vivo* obtenidos de las mediciones de la tensión arterial (TA) y de los diámetros ecocardiográficos máximos y mínimos de la aorta. Se observan importantes diferencias en la pulsatilidad de la raíz aórtica entre sujetos sanos y con el SM, lo cual es indicativo de una pérdida de elasticidad. El cálculo del llamado Índice beta predice el aumento de la rigidez de la raíz aórtica en sujetos con el SM. La pulsatilidad de la aorta se utiliza como marcador de distensibilidad y se calcula al disponer de datos medidos en la ecocardiografía mediante la siguiente fórmula: Pulsatilidad (%):  $[(Ao \text{ max} - Ao \text{ min})/Ao \text{ min}] * 100$  donde Ao max significa diámetro máximo de aorta en la ecocardiografía y Ao min significa diámetro mínimo de aorta en la ecocardiografía. La rigidez aórtica (estimada mediante el Índice beta) se calcula utilizando la tensión arterial (TA) y el diámetro de la aorta medida en la ecocardiografía según la siguiente fórmula: Índice BETA =  $\log (TAS/ TAD)/[(Ao \text{ max}-Ao \text{ min})/Ao \text{ min}]$  donde TAS significa tensión arterial sistólica y TAD significa tensión arterial diastólica (Figura 5).



**Figura 5. Ecocardiografía, plano parasternal longitudinal.** A la izquierda: medición del diámetro mínimo de la raíz aórtica (en diástole); a la derecha: medición del diámetro máximo de la raíz aórtica (en sístole).

## 1. Introducción

La rigidez arterial se ha asociado con la progresión de la dilatación aórtica en el SM en estudios por ecocardiografía transesofágica y resonancia magnética en humanos, así como a través de la medición de la velocidad de la onda de pulso en modelos animales (30-33). Se postula que la rigidez aórtica reflejada mediante estas mediciones es efecto sumatorio del estado funcional de todas las capas de la pared vascular aórtica. La aorta expuesta a la sobrecarga mecánica continua sufre procesos de mala adaptación tisular, entre los que se identifica el aumento de fibras de colágeno que da origen a la rigidez parietal como uno de los predominantes (32).

Otras alteraciones del sistema cardiovascular que conforman los criterios menores de Ghent incluyen: prolapso de válvula mitral (prevalencia del 55-69% en el SM frente al 2% de la población general), dilatación proximal de la arteria pulmonar principal en ausencia de estenosis de ramas pulmonares periféricas u otra causa que lo explique, calcificación del anillo mitral (pacientes < 40 años) y dilatación de la aorta abdominal o torácica descendente (pacientes < 50 años), que afecta al 10% de los pacientes con el SM y es, en la actualidad, la causa más importante de mortalidad en ellos, tras los avances en el tratamiento médico y la cirugía profiláctica de la aorta ascendente (4,8,34).

### 1.3.3 Corazón

La manifestación cardíaca más frecuente y conocida del SM es el prolapso de la válvula mitral (12). Si el prolapso mitral y la regurgitación son severos, pueden evolucionar a la dilatación progresiva del ventrículo izquierdo (VI) y su disfunción con la consecuente clínica de insuficiencia cardíaca. Sin embargo, datos recientes apoyan la existencia de una afectación primaria del miocardio en pacientes con el SM, incluso en presencia de válvulas normofuncionantes (35-38). A partir de principios del siglo XXI, varias investigaciones describen que la dilatación de la raíz aórtica y de la aorta ascendente se acompaña de remodelado miocárdico patológico. Los experimentos relacionados con la función cardíaca en el SM se realizaron de manera prácticamente paralela tanto en el mundo animal como en los humanos. En los sujetos con SM y sin insuficiencia valvular significativa se observaban alteraciones tales como hipertrofia del VI, dilatación del VI y el deterioro de la función VI (37,39). De Witte P et al y Alpendurada F et al demostraron, mediante resonancia magnética cardíaca, una disminución de la fracción de eyección biventricular en pacientes con SM independientemente de la elasticidad aórtica y la toma de fármacos  $\beta$ -adrenalíticos (De Witte P et al: fracción de eyección del VI  $53\% \pm 7\%$  vs  $57\% \pm 4\%$ ,  $p < 0,005$  en el SM vs controles sanos) (40,41).

La disfunción sistólica que acompaña las anomalías estructurales encontradas en la miocardiopatía del SM presenta grados variables y, ocasionalmente, permanece subclínica, detectándose únicamente a través del análisis de los parámetros de la deformación miocárdica (*strain* miocárdico) en las técnicas de imagen cardiovascular. El empeoramiento de la deformación miocárdica origina consecuentemente una reducción de la función sistólica longitudinal y una leve disfunción diastólica biventricular y auricular (42). No obstante, actualmente, falta evidencia certera que relacione esta miocardiopatía con un peor pronóstico clínico.

Tae y col. demostraron que, ya a edades tempranas, el remodelado ventricular expresado como hipertrofia miocárdica en ratones con el SM de 2 y 4 meses de edad no se asociaba a una sobrecarga hemodinámica de volumen (como en la insuficiencia valvular), sino que podría estar desencadenada por un probable mecanismo intrínseco relacionado con el estrés mecánico persistente originado en la matriz extracelular miocárdica alterada. Este remodelado en forma de hipertrofia fue expresado a nivel histopatológico por un aumento del colágeno, hallazgo que en su estudio no alcanzó significación estadística probablemente debido al tamaño limitado de la muestra y su gran variabilidad intrínseca (38). En un experimento con constricción aórtica transversal leve, Rouf et al demostraron que los ratones *Fbn1C1039G/+* eran más

## 1. Introducción

predisponentes a desarrollar insuficiencia cardíaca inducida por la sobrecarga que sus compañeros de camada genéticamente no modificados (43). Además, su investigación apoya la hipótesis previamente reportada que defiende que la señalización canónica de TGF- $\beta$  contribuye a la descompensación cardíaca inducida por la sobrecarga (37). Un interesante y novedoso modelo de ratón *in vivo* de Cavanaugh et al mostraba que la administración de la angiotensina II por vía subcutánea a los ratones con el SM, provoca el desarrollo acelerado de dilatación aórtica y miocardiopatía dilatada incluso sin insuficiencia aórtica, lo que sugiere una posible etiología intrínseca de la lesión miocárdica (44).

El aumento de colágeno es un sustrato morfológico de la fibrosis cardíaca. Se desconoce la importancia clínica y fisiológica de dicha fibrosis, pero podría contribuir a algunas características de la miocardiopatía del SM. Es posible que tanto la fibrosis miocárdica como la hipertrofia subyazcan a la disfunción diastólica observada en pacientes con el SM (45). Además, la fibrosis es una característica de la arritmogénesis cardíaca y probablemente contribuya al aumento de prevalencia de arritmias ventriculares en estos pacientes (46). En el estudio de Yetman et al, el 11% de los pacientes con SM tenía disfunción sistólica del VI (47). Incluso en ausencia de insuficiencia valvular aórtica, la dilatación del ventrículo izquierdo ocurre comúnmente en pacientes con el SM y se asocia con una repolarización ventricular alterada que puede conducir a una arritmia ventricular. Desde finales del siglo pasado y gracias a unos experimentos de Reiter et al y Franz et al, se conocía que el estiramiento del miocardio produce varios cambios electrofisiológicos proarrítmicos que conducen a arritmias ventriculares y muerte súbita cardíaca, incluida la conducción intraventricular más lenta y la aparición de contracciones ventriculares prematuras (48,49).

Los factores considerados hasta ahora como claves en la función diastólica y sistólica del VI en el SM solo se conocen parcialmente. Una de las explicaciones plausibles es que en el SM un porcentaje reducido de microfibrillas ricas en fibrilina 1 puede resultar en la pérdida de la integridad estructural de la matriz extracelular, lo que a su vez deterioraría la coordinación de las fuerzas contráctiles y elásticas (13,50). No obstante, la relajación ventricular diastólica anormal y la contractilidad sistólica alterada observadas en pacientes con el SM podrían explicarse también por el remodelado de la matriz extracelular y una excesiva activación de la vía de señalización biológica TGF- $\beta$  debido a un ambiente deficiente en fibrilina 1 (46). Lo que adquiere interés de punto de vista clínico es que los cambios estructurales en la matriz miocárdica en ciertos pacientes con el SM que conducen a deterioro diastólico y sistólico del VI consecuentemente conducen a un aumento del nivel sérico de NT-proBNP (45,50-51). Hoffmann et al establecieron la relación entre el NT-proBNP y el riesgo arritmogénico de muerte

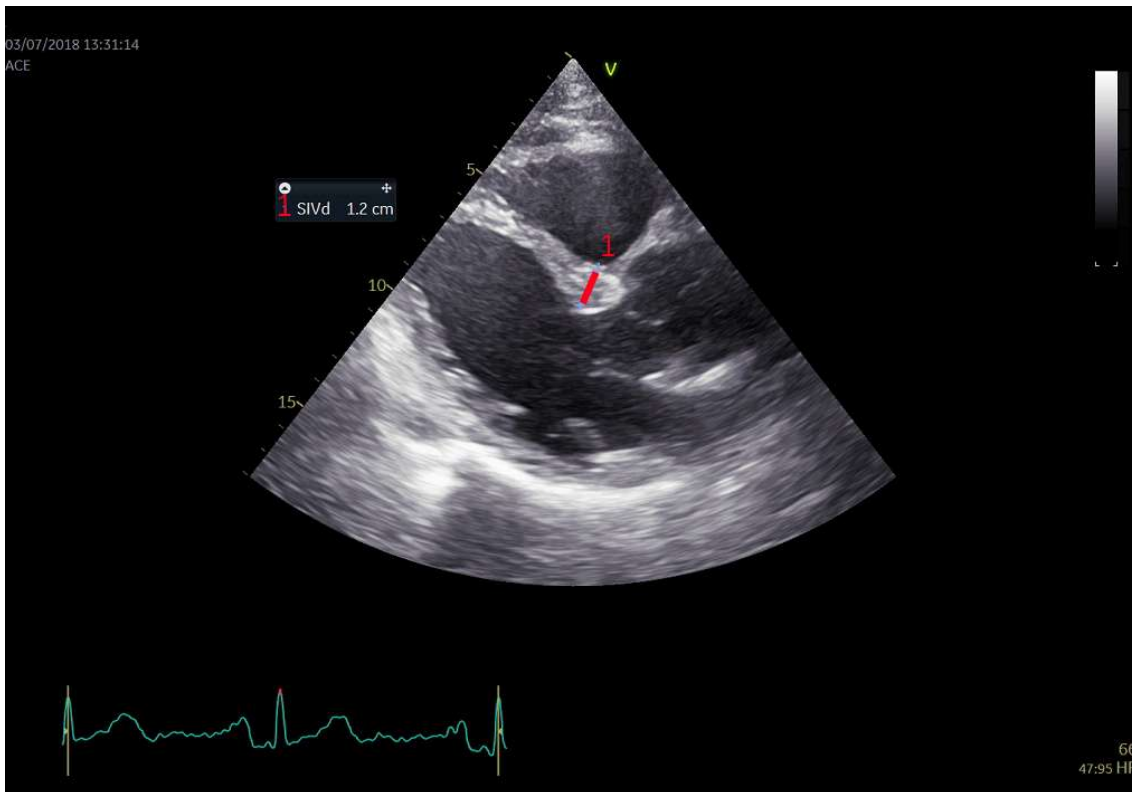
súbita cardíaca en los pacientes con el SM, demostrando igualmente que el grupo con los factores arritmogénicos presentaba una función sistólica del VI inferior al grupo sin eventos arrítmicos (52).

Varios autores han relacionado sus experiencias en los últimos años planteando la hipótesis de la existencia de patología estructural primaria del miocardio en el SM (36,42,45,52,53,54). Así, los pacientes con el SM potencialmente tanto pueden desarrollar una lesión miocárdica consistente en fibrosis y alteración en la arquitectura miocárdica causada por depósito anormalmente aumentado y desorganizado de colágeno, como también podrían ser más susceptibles a cambios en la tensión arterial, dando como resultado mayor estrés de la pared aórtica anormal y, en consecuencia, aumento de postcarga del ventrículo izquierdo. El efecto de la sobrecarga de presión sobre la estructura y la función del miocardio en el SM sigue siendo una pregunta que precisa de más aclaración.



### 1.3.4 Técnicas de imagen cardiovascular en la detección de las manifestaciones cardíacas

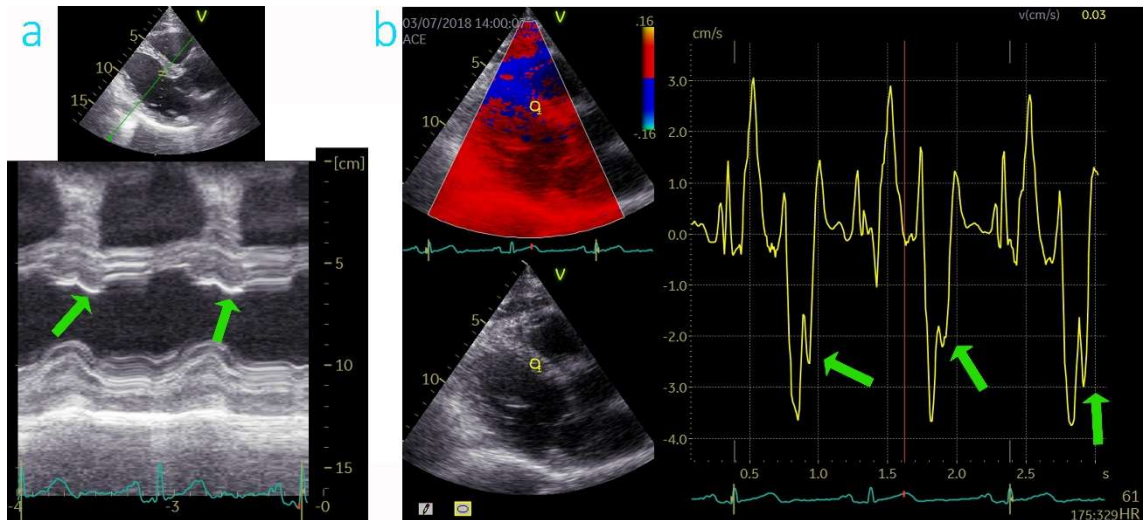
La misma técnica de imagen cardíaca en la que se evalúa el diámetro de aorta en los pacientes con el SM, la ecocardiografía, puede aportar la evaluación de la mecánica del corazón. Un fenómeno de la mecánica de corazón alterada llamado engrosamiento postsistólico (EPS) se determina en el mismo plano de la ecocardiografía 2D que la dimensión de la aorta ascendente. El EPS consiste en una deformación anormal en forma de engrosamiento miocárdico longitudinal producido después de la sístole, es decir, después del cierre de la válvula aórtica. El EPS es ampliamente reconocido como un marcador de heterogeneidad regional de presión y/o heterogeneidad en la contractilidad segmentaria, principalmente en estados de sobrecarga de presión o isquemia miocárdica, e indica un remodelado miocárdico funcional adverso (65-58). El EPS se puede observar en la ecocardiografía, tanto en el registro en modo M como en otras modalidades más avanzadas, como Doppler Tisular o Speckle Tracking 2D, en el contexto de condiciones de postcarga alterada como, por ejemplo, en la hipertensión arterial (55). Varios estudios clínicos en pacientes hipertensos e isquémicos han demostrado la presencia de EPS en el septo interventricular basal como marcador de sobrecarga de presión (55,59). Concretamente, se ha demostrado una asociación de EPS con estadios más avanzados de disfunción auricular y ventricular izquierda en pacientes con hipertensión arterial sistémica bien controlada (60). Según la geometría del VI, es de esperar que la mayor sobrecarga de presión recaiga en el segmento basal del SIV, ya que a ese nivel se localiza una curvatura anatómica con mayor radio en comparación con la pared libre y el ápex del VI. Un aumento regional en el estrés parietal ocurre en esa localización, lo que resulta en la interacción entre los segmentos y, por lo consiguiente, en el EPS. En caso de sobrecarga de presión, el septum interventricular basal, debido a su geometría más plana, es el primer segmento que evidenciará la reducción de la deformación sistólica (61,62). El desarrollo de deformación postsistólica, junto con una hipertrofia localizada, se puede observar incluso antes de la estimación visual de la disminución del engrosamiento parietal (Figura 6).



**Figura 6. Medición de la hipertrofia del septo interventricular basal en diástole (SIVd).** Ecocardiografía. Plano parasternal longitudinal.

El EPS es un parámetro fácil de obtener y evaluar, clínica y experimentalmente. En condiciones óptimas de estudios experimentales, suele existir una buena correlación entre las dos modalidades ecocardiográficas mencionadas, el Modo M y la deformación miocárdica (ya sea por Doppler tisular o por speckle tracking) (59). No obstante, el modo M posee la ventaja de una resolución temporal mayor, por lo que proporciona una alta sensibilidad para detectar ESP, incluso cuando la calidad de la imagen sea limitada o en etapas muy iniciales de disfunción miocárdica (Figura 7).

## 1. Introducción



**Figura 7. Signo de engrosamiento postsistólico (EPS).** A la izquierda: ecocardiografía, modo M, plano parasternal longitudinal; a la derecha: ecocardiografía, modo Doppler Tisular, plano parasternal longitudinal. En ambos, las flechas verdes enseñan el signo de engrosamiento postsistólico.

## 1.4 Pronóstico y tratamiento

La expectativa de vida en el SM, condicionada fundamentalmente por el pronóstico cardiovascular, ha pasado de los 45 años en 1972, a los 72 años en 1995 (62,63) y a los 80 años en el 2020 (64). La disección de la aorta fue la causa principal de mortalidad en los pacientes con SM hasta la introducción del tratamiento con betabloqueadores de forma precoz a partir de 1971 y la implantación de la cirugía profiláctica de la aorta principalmente con la técnica Bentall-Bono, así como los resultados de ensayos con losartan (65-69). La aparición de un tratamiento médico, y sobre todo del quirúrgico agresivo, ha cambiado de forma radical el pronóstico de la enfermedad (64).

### 1.4.1 Tratamiento farmacológico

Los ensayos clínicos, con el objetivo de interferir farmacológicamente en la progresión de la dilatación aórtica, se centraron predominantemente en los bloqueadores beta y antagonistas de los receptores de angiotensina II (24). Desde 1971, año en que se publicó el primer ensayo con betabloqueadores en pacientes con SM, se han realizado varios estudios en adultos sobre la eficacia de los betabloqueadores, basándose en las características de estos fármacos, los cuales disminuyen la presión del pulso y la contractilidad miocárdica y mejoran las propiedades elásticas de la aorta, sobre todo con diámetros menores de 40 mm (30,63,66,68,70,71). En la actualidad, a pesar de las escasas evidencias y el leve impacto en la supervivencia, el tratamiento profiláctico con betabloqueadores está indicado de forma precoz tanto antes como después de la cirugía aórtica en adultos y en niños (67). Desde hace 10-15 años existen evidencias de que el tratamiento con antagonistas de los receptores de la angiotensina II (sobre todo losartan) es una alternativa a los betabloqueadores, teniendo un papel adicional protector sobre la pared aórtica. A continuación, se muestra una tabla con el resumen de los estudios más relevantes acerca del tratamiento farmacológico en la prevención de la progresión de la dilatación de aorta en el SM (Tabla 2):

Tabla 2. Ensayos clínicos aleatorizados que evalúan losartan y  $\beta$ -bloqueantes en el síndrome de Marfan.

Estudio	Diseño	Tratamiento	Seguimiento (meses)	Media de edad (años)	Número de pacientes*	Técnica de Imagen	Dilatación de la raíz aórtica (mm por año)	Muerte y disección aórtica (n)
Chiu H. H. et al. (72)	Diseño abierto (variable principal de valoración ciega)	Losartan y $\beta$ -bloqueantes vs $\beta$ -bloqueantes	35	13 $\pm$ 6,3	29 (28)	Ecografía	0,10 vs 0,89 (P=0,02)	1 vs 0
Groenink, M. et al. (73)	Diseño abierto (variable principal de valoración ciega)	Losartan vs no losartan <sup>†</sup>	37	38 (rango 18-71)	233 (145)	RMN/ Ecografía	0,26 vs 0,45 (P=0,014)	0 vs 2
Lacro, R. V. et al. (71)	Doble ciego	Losartan vs atenolol	36	11 (rango 0,5-25)	608 (535)	Ecografía	0,75 vs 0,69 (P=0,20)	3 vs 0
Milleron, O. et al. (74)	Doble ciego	Losartan vs placebo	42	30 (todos >10)	297 (292)	Ecografía	0,44 vs 0,51 (P=0,36)	1 vs 5
Bélgica <sup>§</sup>	Doble ciego	Losartan vs placebo	36	>10	No disponible	RMN/ Ecografía	No disponible	No disponible
Reino Unido <sup>#</sup>	Doble ciego	Irbesartan vs placebo	48	6-40	490	Ecografía	No disponible	No disponible
Italia <sup>#</sup>	Diseño abierto (variable principal de valoración ciega)	Losartan vs neбиволол vs ambos	48	1-55	291	Ecografía	No disponible	No disponible
España <sup>#</sup>	Doble ciego	Losartan vs atenolol	36	5-60	150	RMN/ Ecografía	No disponible	No disponible

El tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes fue con atenolol o propranolol. \*Número total (número en el análisis de la tasa de dilatación de la raíz aórtica). †Tratamiento además de la medicación prescrita, en su mayoría  $\beta$ -bloqueantes. ‡Estudio terminado prematuramente debido a dificultades de inclusión; los participantes se agregaron al *Pediatric Heart Network Study*. §Estudios en curso o no informados. Modificado de: Franken R, Mulder BJ. Aortic disease: Losartan versus atenolol in the Marfan aorta-how to treat? *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(8):447-8.

## 1. Introducción

Habashi et al encontraron, en ratones con mutación en el gen de la FBN1, que el losartan podía prevenir la dilatación de la aorta (18). A continuación, varios ensayos clínicos confirmaron también su eficacia (69,70). La posible razón fundamental del uso del losartan se basa en su efecto antagonista a los estados de sobrecarga de presión. Durante los estados de sobrecarga de presión, se produce un aumento de la actividad del receptor de la angiotensina II tipo I (ATR-1), así como de muchos otros componentes del sistema renina-angiotensina que se expresan en los cardiomiocitos, como el angiotensinógeno, la renina, la angiotensina II (Ang II) y la enzima convertidora de la angiotensina. De aquí emerge, entre otros mecanismos, la gran eficacia de los antagonistas del receptor de angiotensina 2 (ARA2), entre ellos losartan, que reducen los efectos producidos por la sobrecarga de presión. La sobrecarga de presión ocurre durante la sístole (postcarga) y a nivel cardíaco induce hipertrofia cardíaca concéntrica, mientras que la sobrecarga de volumen impacta principalmente durante la diástole (precarga) y produce hipertrofia cardíaca excéntrica. Los hallazgos de estudios experimentales y clínicos indican que los ARA2 mejoran el remodelado cardíaco provocado por ambos tipos de sobrecarga. No obstante, los ARA2 inhiben el efecto deletéreo de Angiotensina II por inhibir eficazmente la activación inducida de AT1-R y, de esa manera, reducen las resistencias vasculares periféricas, la hiperplasia cardiovascular y la hipertrofia ventricular. Además, el bloqueo directo del AT1-R causa vasodilatación y reduce la secreción de vasopresina y aldosterona, lo que conduce a una reducción de la presión arterial. Los ARA2 que suprimen la actividad basal del AT1-R se definen como agonistas inversos y son capaces de estabilizar la configuración inactiva del AT1-R (77). Los efectos descritos no son propios de toda la clase de fármacos ARA 2, sino los que funcionan como agonistas inversos (75). Los ARA 2 agonistas inversos, como candesartan, olmesartan y losartan, son capaces de inhibir eficazmente la hipertrofia cardíaca inducida por la sobrecarga de presión, incluso en ausencia de Angiotensina II endógena, mientras que los agonistas no inversos, como el telmisartan y valsartan, no ejercen tales efectos inhibidores (76). Por tanto, los ARA2 con efecto agonístico inverso tienen, potencialmente, grandes beneficios terapéuticos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, especialmente las causadas por la actividad del AT1-R. Asimismo, se describen efectos en prevención de la insuficiencia cardíaca a nivel molecular con el uso de otros ARA 2. Concretamente, el olmesartan activa eficazmente la vía de señalización ECA2-Ang1-7-Mas, lo que resulta en la disminución de la vasoconstricción, inflamación, estrés oxidativo, apoptosis y otras vías de señalización asociadas a la insuficiencia cardíaca (76). No obstante, en el escenario del SM, el losartan incita un interés especial entre todos los ARA 2 (74). Losartan es un ARA2 frecuentemente administrado en el tratamiento de la hipertensión y, además, presenta la propiedad de antagonizar la actividad del factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ), proteína que se encuentra en niveles elevados en

pacientes con SM y está asociada con la severidad de la afectación cardiovascular (78,79). La expresión excesiva del TGF- $\beta$  es la consecuencia directa de la desestructuración de la red microfibrilar, lo que promueve, a su vez, una degradación del tejido vascular aórtico (79). El tratamiento con losartan en ratones con SM ha mostrado un retraso en la disección y rotura aórtica y una mejora en la supervivencia media (18,33). En estudios clínicos también se mostró la eficacia de losartan (50 mg en niños, 100 mg en adultos) combinado con bloqueadores beta (2 mg / kg en niños, máximo de 150 mg en adultos) en la reducción significativa de la dilatación de aorta (80). El ensayo neerlandés COMPARE demostró el efecto beneficioso de losartan añadido a la terapia convencional (principalmente betabloqueantes [74%], 50-100 mg) en comparación con betabloqueantes solos (81). Por último, el ensayo Pediatric Network Study, que comparó losartan versus atenolol, en modo doble ciego, en un grupo de 608 niños (edad media 11 años, rango 0,5-25,0 años) con seguimiento por ecocardiografía durante 36 meses, demostró que losartan (1,3 mg / kg, máximo de 100 mg) y betabloqueantes (2,7 mg / kg, máximo de 250 mg) fueron igual de eficaces en la reducción o en la progresión del score Z aórtico (79).

A pesar de estos resultados esperanzadores de los ensayos con fármacos sobre la progresión y complicaciones de la dilatación aórtica, la naturaleza multisistémica de la enfermedad precisa de un manejo multidisciplinar, sobre todo en la prevención del deterioro de la función cardíaca y otras manifestaciones no aórticas en el SM.

#### **1.4.2 Actividad física**

Entre las manifestaciones sistémicas conocidas del SM se encuentra el sobrecrecimiento óseo, el enfisema pulmonar y la miopatía debidas a la incapacidad de reparar las lesiones musculares y aumentar la masa muscular (82). La actividad física regular es una terapia eficaz enfocada a reducir las enfermedades cardiovasculares en la población general y sobre todo en los cardiópatas. Los beneficios del ejercicio físico regular se han demostrado en estudios epidemiológicos, con una reducción de eventos cardiovasculares en torno al 50%. La carga de ejercicio necesaria para lograr estos beneficios es en general modesta (aprox. 2 horas de ejercicio por semana a una intensidad de 6-10 MET). Entre otros beneficios, mejora la función ventricular izquierda, la perfusión tisular, así como reduce la tensión arterial y la inflamación crónica (83). Además de los beneficios cardiovasculares, el ejercicio físico presenta un efecto pleiotrópico con beneficios desde el punto de vista cognitivo, endocrino, osteomuscular y oncológico. No obstante, el aumento de la precarga y de la postcarga asociado al entrenamiento crónico intensivo ocasionan cambios morfológicos y estructurales (dilatación de las cámaras



## 1. Introducción

cardíacas, aumento del grosor parietal ventricular, aumento del llenado diastólico y del volumen sistólico), además de inducir cambios electrocardiográficos y de la musculatura periférica que aumenta el número de fibras y capilares, número de mitocondrias, capacidad oxidativa y el pico de consumo de oxígeno (84).

Para satisfacer las demandas metabólicas incrementadas que conlleva el ejercicio, el sistema cardiovascular desarrolla cambios funcionales y estructurales hacia un remodelado cardíaco denominado corazón de atleta, cuyas características están marcadamente influenciadas por el tipo de deporte que se practica. La clasificación de Mitchell divide los deportes según el porcentaje de su componente estático y dinámico. Los deportes predominantemente dinámicos se caracterizan por la contracción isotónica de las fibras musculares (es típico de los deportes de fondo, como fútbol, *running*...), están asociados a mayor demanda de oxígeno y, consecuentemente, a una sobrecarga de volumen y una mayor dilatación de las cavidades. Por el contrario, los deportes predominantemente estáticos se asocian a un aumento de la post carga y de la fuerza de contracción y como consecuencia, un aumento del grosor parietal y consumo de oxígeno anaerobio (judo, halterofilia) (85). Aunque la mayoría de los deportes incluyen una mezcla de ambos componentes, el ejercicio estático induce en general, un aumento de la presión arterial y desarrollo de hipertrofia concéntrica del VI, mientras que la sobrecarga de volumen y la hipertrofia excéntrica son típicos en el ejercicio dinámico (86). El remodelado inducido por el ejercicio también afecta la aorta ascendente. En este sentido, en la población general la actividad física regular predispone a dilatación leve aunque significativa, de la raíz aórtica, que es mayor en deportes más dinámicos, en comparación con estáticos (87). Dado que el entrenamiento físico dinámico promueve el remodelado de la matriz extracelular, los mencionados cambios en los parámetros cardiovasculares inducidos por el ejercicio podrían tener un impacto especial en pacientes con enfermedades hereditarias del colágeno como el SM, y podría conducir a un remodelado anormal de la matriz extracelular. En consecuencia, hasta ahora se asumía que el remodelado de la matriz extracelular inducido por el ejercicio sería adverso en los pacientes con el SM y empeoraría la progresión de la dilatación aórtica y la miocardiopatía. Además, la situación de incremento más o menos rápido de la postcarga que ocurre durante el ejercicio (especialmente si es estático) podría resultar en un incremento de la tensión arterial, la cual, añadida al incremento de la postcarga hemodinámica, aceleraría el deterioro de la matriz extracelular.

Para intentar entender mejor las respuestas fisiológicas de los pacientes con dilatación o disección aórtica a una sesión aguda de ejercicio, es importante revisar primero las adaptaciones al ejercicio de una aorta normal y de una aorta envejecida. Durante una sesión de ejercicio dinámico, la aorta ascendente y el arco aórtico acomodan un aumento de  $\geq 3$  a 6 veces en el flujo sanguíneo y un aumento del 40-55% en la presión del pulso central (presiones sistólica - diastólica). Además, entre las personas sin enfermedad de aorta, la velocidad de la onda del pulso central aumenta durante el ejercicio, lo que es consistente con un aumento de la rigidez arterial (pérdida de la distensibilidad), tan característica *per se* en pacientes con el SM.

Hay datos limitados en la literatura sobre la aplicación del entrenamiento físico en pacientes con dilatación de aorta torácica. Este hecho, probablemente, se deba a la preocupación de que un aumento de la TA con el ejercicio podría estar asociado con el riesgo de ruptura aórtica. A menudo, las restricciones de actividad física en los pacientes con enfermedades de aorta se deben a la falta de conocimiento sobre los cambios exactos en la TA durante el ejercicio. No obstante, un estudio retrospectivo (88) describió las respuestas de la TA de ejercicio y la capacidad de ejercicio en 10 pacientes que se sometieron a corrección quirúrgica por disección aórtica tipo A. Durante el ejercicio, la TA sistólica media aumentó de 143 mm Hg en reposo a 200 mm Hg en el ejercicio máximo, en consonancia con el aumento de  $\sim 8$ -10 mm Hg/MET esperado en personas sanas durante el ejercicio dinámico (87). Por lo tanto, no fue mayor que en sujetos sanos. Sin embargo, se desconoce el efecto de este aumento fisiológico de la TA en la aorta de pacientes con el SM, sobre todo a largo término.

A continuación, se muestra una tabla con el resumen de los estudios realizados para investigar el efecto de ejercicio en la dilatación de aorta abdominal, ya que, en la aorta torácica, la evidencia es muy escasa (Tabla 3) (88):

**Tabla 3. Estudios de entrenamiento físico en personas con aneurisma aórtico abdominal**

Población de estudio	Frecuencia (días/semana)	Duración (min/sesión)	Intensidad	Semanas (n)	Comentarios
Myers et al (2014); AAA leve (2,5-5,0 cm); n = 140	3	45	60-80% RRC RPE 12-14	Hasta 156	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba controlada aleatorizada; entrenamiento aeróbico y de resistencia híbrido en el hogar y en un centro; ejercicio diario recomendado durante 1 año</li> <li>• Meta de gasto de 1000-2000 kcal/semana</li> <li>• También entrenamiento de resistencia: 10 min/sesión</li> <li>• Sin eventos adversos</li> <li>• 10% ↑ en Vo<sub>2</sub> en el umbral ventilatorio</li> </ul>
Tew et al (2012); AAA (30-50 mm); n = 28	3	35-45	RPE 12-14	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba controlada aleatorizada; entrenamiento de resistencia moderado de 12 semanas; pruebas previas y posteriores solo hasta el umbral ventilatorio</li> <li>• Sin eventos adversos</li> <li>• 94% de adherencia a la sesión de ejercicio</li> <li>• Vo<sub>2</sub> en el umbral ventilatorio ↑ 2,5 ml·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>; reducciones en hs-CRP y TA sistólica</li> </ul>
Barakat et al (2014); preoperatorio de AAA infrarenal; n = 20	3	60	No proporcionado	6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entrenamiento aeróbico y de resistencia durante 6 semanas.</li> <li>• Sin eventos adversos</li> <li>• 70% de adherencia a la sesión de ejercicio</li> <li>• ↑ en el pico Vo<sub>2</sub> (9%); Vo<sub>2</sub> hasta el umbral ventilatorio (18%); y tiempo de ejercicio (59%)</li> </ul>
Nakayama et al (2018); AAA leve (30-55 mm); n = 212	1-3	30	En el umbral anaeróbico, nivel de factor de Karvonen de 0,2, que es ≤ 50 % de la FCmáx;	21	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entrenamiento aeróbico moderado, sesiones de 30 min, 1-3 días/semana durante 3 meses; sesión de ejercicio no iniciada cuando la TA en reposo &gt;130/90 mm Hg</li> <li>• Sin entrenamiento de fuerza</li> <li>• Sin mención de posibles eventos adversos</li> </ul>

		TA <150/100 mm Hg		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tasa de crecimiento de aneurisma aórtico abdominal más lenta en el grupo de ejercicio vs seguimiento usual</li> </ul>
Kothmann et al (2009); AAA < 5,5 cm; n = 30	2	30	RPE 12-14 o 6 intensidad moderada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba aleatoria; entrenamiento moderado durante 7 semanas; pruebas previas y posteriores solo hasta el umbral ventilatorio</li> <li>• 3 abandonos, uno fue paro cardíaco durante el ejercicio; ningún otro evento adverso</li> <li>• 10% ↑ en Vo<sub>2</sub> en el umbral ventilatorio</li> </ul>

AAA: aneurisma aórtico abdominal. TA: tensión arterial. RRC: Ritmo de reserva cardíaca o frecuencia cardíaca de reserva. hs-CRP: prueba de proteína C-reactiva de alta sensibilidad. RPE: Índice de esfuerzo percibido. Vo<sub>2</sub>: consumo de oxígeno.

## 1. Introducción

Basándose en el razonamiento mencionado arriba y ajustando las precauciones más bien al alza, el deporte con carga estática mayor que baja-moderada y carga dinámica más que baja siempre se ha desaconsejado en pacientes con el SM, pudiendo estos pacientes sólo realizar deportes como: billar, críquet, curling, bolos, golf, tiro al blanco y tiro con arco (89). Sin embargo, no disponemos de suficiente evidencia para apoyar esta precaución y los efectos del entrenamiento en pacientes con SM son, en realidad, ampliamente desconocidos (90).

### **1.5 Impacto diferencial del género en la presentación del SM.**

A pesar de una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) en mujeres que en hombres, se observa peor tasa de mortalidad y peor pronóstico en ellas (91). Las mujeres han sido convencionalmente consideradas más protegidas y, por lo tanto, su riesgo real de ECV ha sido en gran medida subestimado. Como resultado, es más probable que se utilicen estrategias menos agresivas en mujeres que en hombres, como lo demuestra la menor tasa de procedimientos diagnósticos e intervencionistas realizados en mujeres (89). Además, las mujeres son generalmente infrarrepresentadas en la mayoría de los ensayos clínicos. Han sido ampliamente demostradas diferencias relacionadas con el género en la fisiología del corazón, lo cual provoca que la ECV presente diferencias según el género, hecho que debería influir significativamente en estrategias de tratamiento (92).

La escasa literatura existente sobre el impacto del género en la dilatación y eventos aórticos en el SM presenta resultados aún controvertidos. Mientras algunos autores defienden bajar en 5 mm el punto de corte de dilatación aórtica para la indicación quirúrgica para las mujeres al observar un mayor riesgo de disección (93), otros autores postulan que los hombres tienen más riesgo de disección aórtica; en cambio, otros también afirman que, aunque los hombres sean tratados con más frecuencia con cirugía, no presentan más incidencia de la disección aórtica y muerte cardiovascular (94,95,96). No hay datos sobre el potencial impacto diferencial del sexo en la manifestación de los signos de la miocardiopatía en SM.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis:

La hipótesis global de esta tesis es que los sujetos con el SM sufren de miocardiopatía que, de manera precoz, presenta características compatibles con miocardiopatía por sobrecarga de presión.

Postulamos que los pacientes con el SM pueden tener un miocardio ventricular más sensible a la postcarga, a pesar de que sus presiones arteriales se encuentren en el rango normal. En consecuencia a esta posible susceptibilidad a la presión arterial pueden desarrollar una mayor heterogeneidad segmentaria de estrés de la pared del VI debido al tejido anormal subyacente de la pared arterial y/o miocárdica.

Por el otro lado, el deporte más que de baja-moderada carga estática y de baja carga dinámica se desaconsejó en pacientes con el SM. No obstante, en realidad, no disponemos de suficiente evidencia para apoyar esta precaución. Formulamos la hipótesis de que el entrenamiento físico dinámico de intensidad moderada aportará beneficios a largo plazo en las manifestaciones cardiovasculares del SM.

Son bien conocidas las diferencias relacionadas con el género en la fisiología del corazón, lo cual provoca que la ECV puede manifestarse de diferente manera según el género. Nuestra última hipótesis es que existen diferencias de género en la incidencia de los signos de la lesión miocárdica en el SM.

Los indicios de la miocardiopatía en el SM parecen ser tempranos y su detección precoz podría ayudar en la toma de decisiones terapéuticas y preventivas permitiendo aplicar terapias más dirigidas –como, por ejemplo, por el género del enfermo– y de manera precoz. Una de las estrategias dirigidas podría ser hacia la reducción más intensiva de la postcarga, siendo más agresivos con el tratamiento vasodilatador, independientemente de los valores de presión arterial (siempre y cuando no contraindicara el tratamiento). En ese sentido, el entrenamiento crónico a cargas no elevadas también podría ayudar a reducir la presión arterial y la postcarga en estos sujetos, y a mejorar la funcionalidad aórtica, disminuyendo eventualmente la progresión de la dilatación aórtica. Esta estrategia implicaría, de hecho, cambiar el paradigma en dirección a la prescripción individualizada del ejercicio físico dinámico en el manejo temprano de los individuos con el SM, inmediatamente después de establecer el diagnóstico.

## 2. Hipótesis y objetivos

Esta tesis pretende romper mitos en el SM tanto acerca del enfoque clásico en la dilatación de la aorta basado en la monitorización de la presión arterial, como en el consejo de poca actividad física dinámica en la vida diaria de los pacientes.

Para responder a esta hipótesis se han planteado los objetivos concretos descritos en el apartado 2.2 y se han diseñado diversos proyectos de investigación, tanto en pacientes con SM como en el modelo murino de SM.

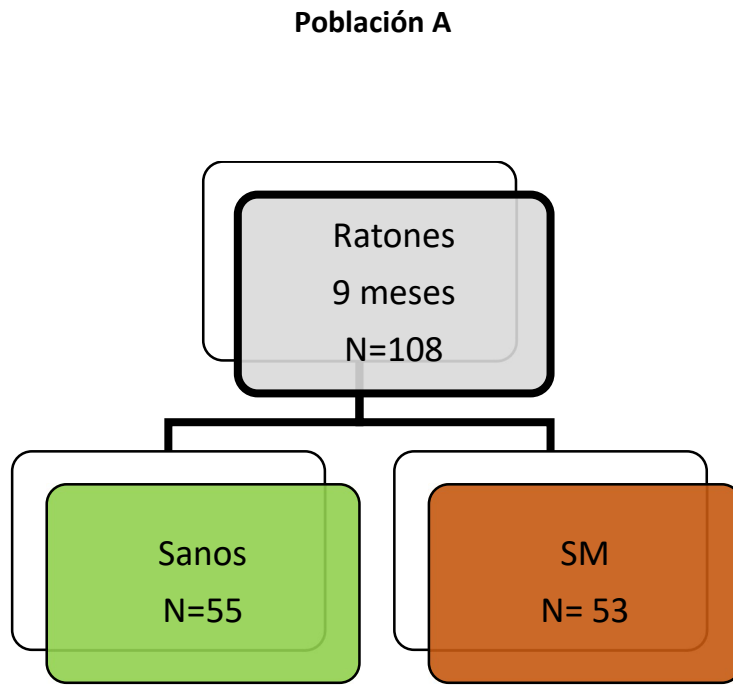
## 2.2 Objetivos:

1. Determinar si existe o no una respuesta funcional miocárdica anormal en el síndrome de Marfan (SM) mediante la detección del engrosamiento postsistólico en la ecocardiografía.
2. Estudiar si el engrosamiento postsistólico está relacionado o no con los patrones de deformación regional alterados típicos de los estados de incremento de postcarga.
3. Evaluar el impacto del ejercicio físico dinámico de intensidad moderada en la dilatación de aorta ascendente y la miocardiopatía en el SM.
4. Detectar diferencias de género en la presentación de engrosamiento postsistólico y los factores asociados al mismo como la tensión arterial y el tratamiento farmacológico.

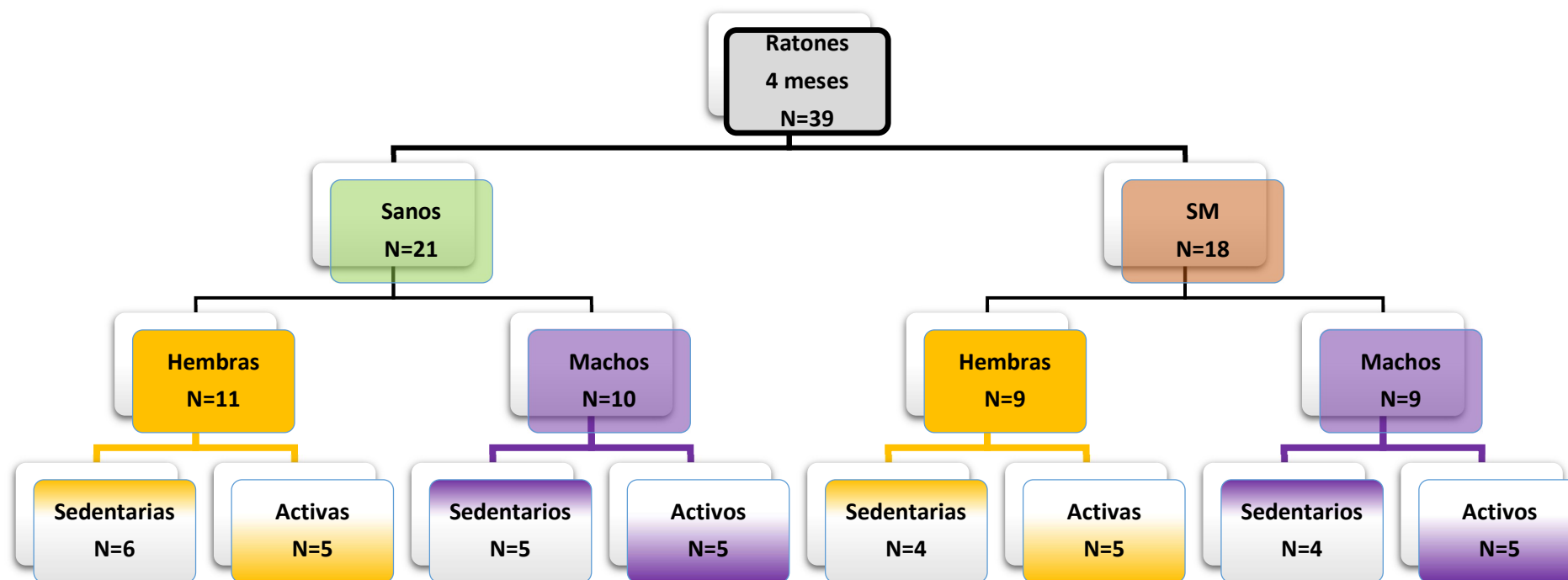


### 3. MATERIAL Y MÉTODOS Y RESULTADOS

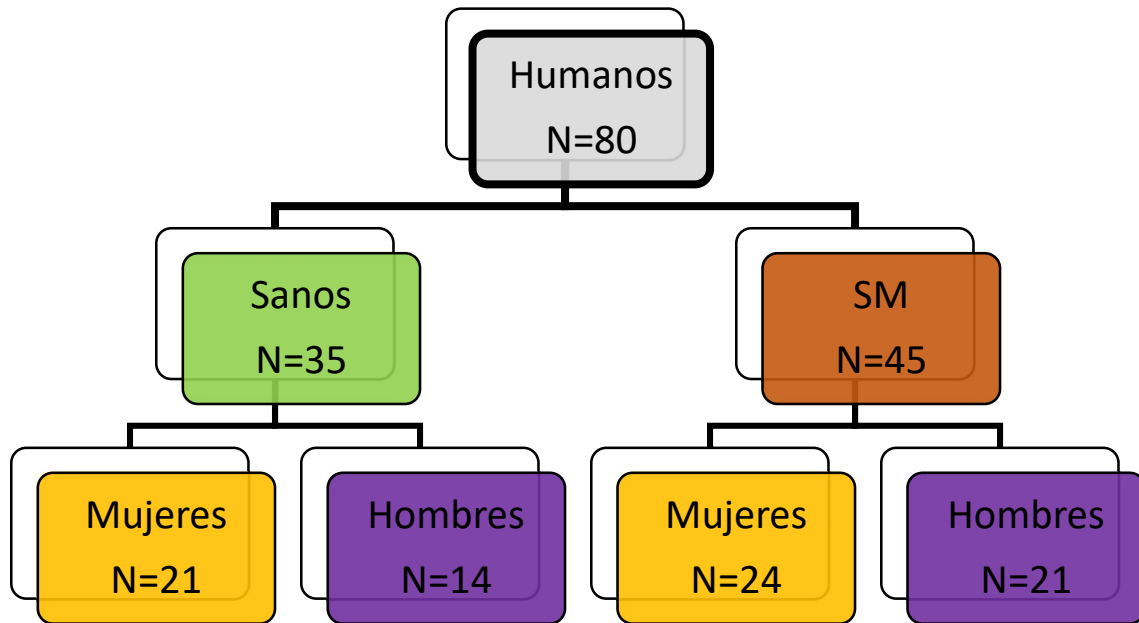
#### 3.1 Esquemas de las poblaciones incluidas en la investigación de la tesis:



Población B



Población C



## Artículo 1 (poblaciones A, B, C)

### Objetivos:

1. Determinar si existe o no una respuesta funcional miocárdica anormal en el síndrome de Marfan (SM) mediante la detección del engrosamiento postsistólico en la ecocardiografía.
2. Determinar si el engrosamiento postsistólico está relacionado o no con los patrones de deformación regionales alterados típicos de los estados de incremento de postcarga.

**Mas-Stachurska A**, Egea G, de Bruin-Bon R, Rudenick P, Sanchis L, Bouma BJ, Mulder BJ, Bijmens B, Sitges M. Postsystolic thickening is a potential new clinical sign of injured myocardium in marfan syndrome. *Sci Rep.* 2021 Aug 4;11(1):15790. doi: 10.1038/s41598-021-95263-5.

Factor de impacto: 4,380. Cuartil: Q1. Área de conocimiento: Multidisciplinary.

# scientific reports



OPEN

## Postsystolic thickening is a potential new clinical sign of injured myocardium in marfan syndrome

Aleksandra Mas-Stachurska<sup>1,2</sup>, Gustavo Egea<sup>3</sup>, Rianne de Bruin-Bon<sup>4</sup>, Paula Rudenick<sup>5</sup>, Laura Sanchis<sup>1</sup>, Berto J. Bouma<sup>4</sup>, Barbara J. Mulder<sup>4</sup>, Bart Bijmens<sup>1,5,7</sup> & Marta Sitges<sup>6,7</sup>

The mechanisms leading to cardiac remodeling in Marfan syndrome (MFS) are a matter of debate since it could be either due to structural dysfunction of the myocardial extracellular matrix or to increased afterload caused by the dilated aorta. We aim to characterize the presence of abnormal myocardial function in MFS and to investigate its potential association with increased afterload. Aorta, left ventricle (LV) and the postsystolic thickening (PST) were analyzed in echocardiography in *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice and in patients with MFS in comparison with wild type (WT) mice and healthy humans. PST was more frequent in MFS than in WT mice ( $p < 0.05$ ). MFS mice with PST showed larger aorta than those without PST. Patients with MFS showed larger aorta, poorer LV function and a higher prevalence of PST (56%) than did the healthy controls (23%);  $p = 0.003$ . Blood pressure was similar. The higher prevalence of PST in an experimental murine model and in MFS patients, regardless of systemic arterial pressure, suggests an increased afterload on the LV myocardium. This finding supports the use of PST as an indicator of myocardial damage and encourage searching for novel early preventive therapy.

Marfan syndrome (MFS) is an autosomal dominant inherited disorder that affects skeletal, ocular and cardiovascular tissues. The main cardiovascular manifestations in MFS are ascending aorta dilation, especially localized at the level of the aortic root sinuses, aortic regurgitation and mitral valve prolapse with or without regurgitation<sup>1</sup>. Previous clinical<sup>2–5</sup> and animal experimental<sup>6</sup> studies in MFS have also reported intrinsic cardiac remodeling and mildly impaired ventricular function in the absence of significant valvular insufficiencies, raising the potential hypothesis of the existence of structural dysfunction of the extracellular matrix of the myocardium. Nonetheless, MFS patients with abnormal aortic wall could also be more susceptible to changes in pressure, showing more aortic wall stress and, consequently, increased myocardial afterload. The effect of pressure overload on the myocardial structure and function in MFS remains an open question.

Postsystolic thickening (PST) is an abnormal longitudinal myocardial thickening/shortening occurring after the closure of the aortic valve. It has been well described as a marker of segmental heterogeneity of loading or contractility, mainly in the setting of pressure overload and myocardial ischaemia<sup>7–10</sup>, and involves adverse functional myocardial remodeling. PST can be observed in the setting of altered loading conditions as hypertension in M-mode<sup>7</sup>, Tissue Doppler and 2D Speckle Tracking modalities of echocardiography. There is usually good correlation between those modalities in optimal conditions of experimental studies<sup>11</sup>. M-mode has the advantage of a higher temporal resolution which provides additional sensitivity to detect PST when image quality is limited or at situations of very initial stages of myocardial dysfunction.

<sup>1</sup>Cardiovascular Institute, Hospital Clinic, University of Barcelona and Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS); CERCA Programme/Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Barcelona School of Medicine and Health Sciences and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Cardiology Department, Amsterdam University Medical Centers, Location Academic Medic Centrum, Amsterdam, The Netherlands. <sup>5</sup>ICREA, Barcelona, Spain. <sup>6</sup>Cardiovascular Institute, Hospital Clinic, University of Barcelona School of Medicine and Health Sciences and Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), CIBERCV, Instituto de Salud Carlos III (CB16/11/00354); CERCA Programme/Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain. <sup>7</sup>These authors contributed equally: Bart Bijmens and Marta Sitges. ✉email: astachur@gmail.com

We hypothesize that MFS patients may be more sensitive to blood pressure, despite their basal arterial pressures being in the normal range, and consequently they develop more segmental wall stress heterogeneity due to underlying abnormal arterial and/or myocardial wall tissue. Our purpose is to determine whether or not there is abnormal myocardial deformation in MFS and whether or not this deformation is related to typical altered regional deformation patterns that occur in response to increased afterload. As a first approach to this aim, we have chosen an experimental murine model of MFS mice (*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>), a well-established animal model of MFS<sup>12</sup>. In addition, an analysis has been conducted on a group of young humans affected from Marfan syndrome and healthy controls. We have examined the presence of PST in both experimental and clinical groups and its potential relationship with blood pressure and the development of aortic aneurysm.

## Methods

**Animal model.** *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice and wild type (WT) mice were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME 04,609, USA) and used as a validated MFS animal model. Both Wild Type (WT) and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice (hereafter, Marfan [MFS] mice) were bred on a C57BL/6 background. Comparisons were made between contemporary littermates. All mice were housed in a controlled environment (12/12-h light/dark cycle) and provided with ad libitum access to food and water. Animal care and experimentation conformed to the European Union (Directive 2010/63/EU) ARRIVE and Spanish guidelines (RD 53/2013) for the use of experimental animals. For the animal experiments, ethical approval was obtained from the local animal ethics committee (Ethics Committee on Animal Experimentation [CEEAA], University of Barcelona).

The animal population consisted of two groups: group 1, consisting of 108 9 months (mo) age mice (53 MFS and 55 WT mice) in order to analyze the prevalence of PST as a marker of increased afterload in a large number of animals, and group 2, consisting of 39 4 mo-age mice (18 MFS and 21 WT mice) in a controlled study, with systematic determinations of arterial pressure in order to explore the association of PST with blood pressure levels.

Systemic blood pressure (BP) was noninvasively measured in the group of 4 mo-age mice by a tail cuff system (Panlab NIBP system, consisting of control unit LE5007 and the automatic heater and scanner for 6 mice, LE56506). Briefly, mice were placed in a warming/restraining box (34 °C), with the tail carefully inserted into an inflatable cuff. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were automatically measured. Before the final BP measurements, all mice were placed in the setup as many times as needed until they became adapted, thereby minimizing stress associated with the procedure.

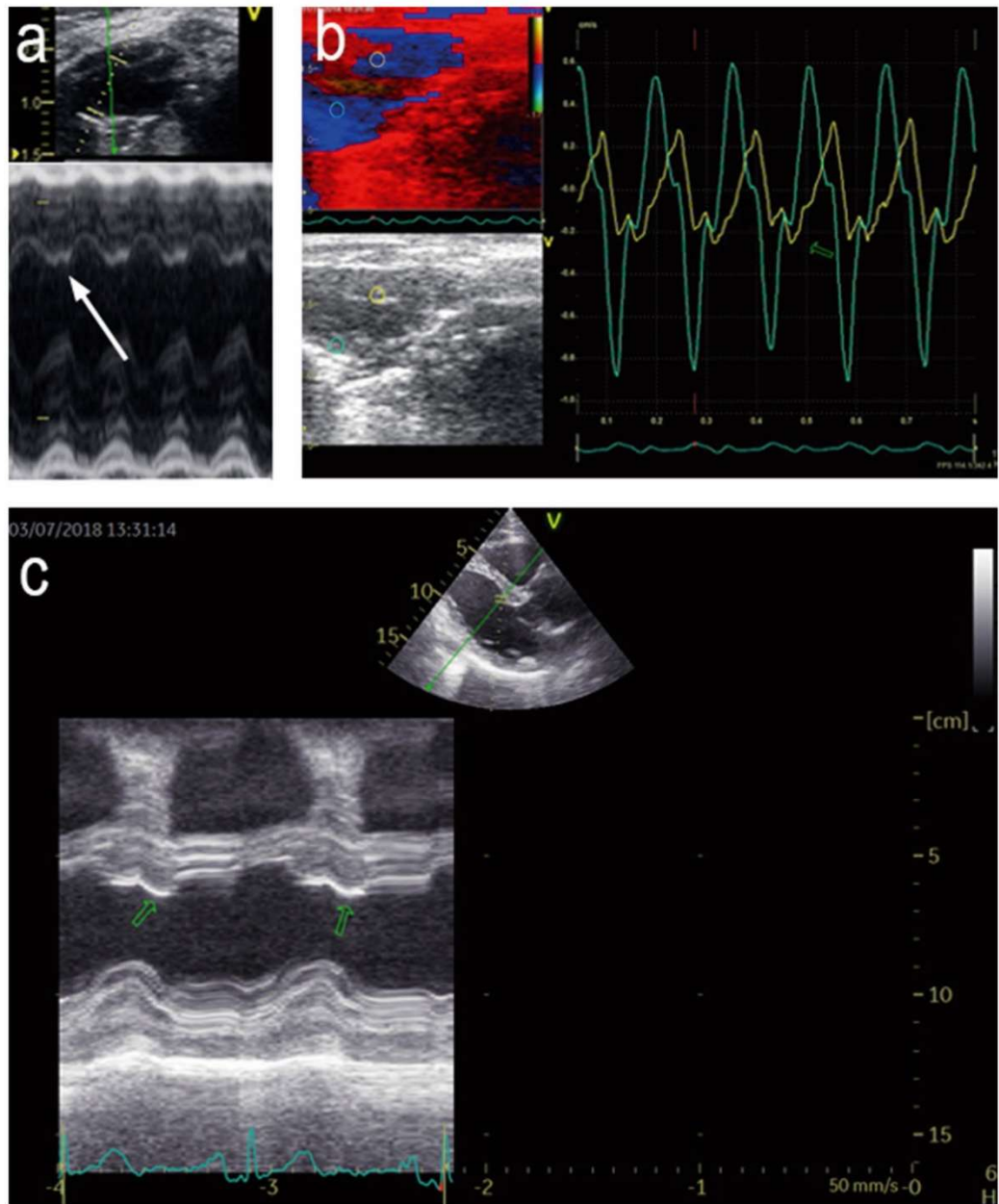
**Clinical study patients.** The group of Marfan patients consisted of 45 patients with established diagnoses of MFS by specialized cardiologists and according to the revised Ghent criteria. The healthy controls included 35 subjects examined by cardiac ultrasound as part of a familial screening for MFS disease and bicuspid aortic valve. Human subjects with more than mild valvular insufficiency or other significant forms of cardiomyopathy were excluded from the study. Clinical data was obtained from clinical records. The protocol was approved by the ethics committee of our institution (Medical Ethics Review Committee of the Academic Medical Center, reference number: W17\_103 # 17.122app) in accordance with relevant guidelines and regulations. All participants gave informed consent. The data which supports the findings of this study is available upon reasonable request.

**Echocardiography and assessment of PST.** A two-dimensional transthoracic echocardiogram was performed on all animals, mildly anesthetized, with 1.5% inhaled isoflurane<sup>13</sup>, and on conscious humans. Images were obtained from mice using a 10 to 13-MHz phased-array linear transducer (IL12i GE Healthcare, Milwaukee, US) with a Vivid Q system (GE Healthcare, Milwaukee, US) and from humans using a Vivid E9 (GE Healthcare, Oslo, Norway) with a transthoracic probe. All images were recorded and analyzed offline using commercially available software (EchoPac v. 108.1.6, GE Healthcare, Madrid, Spain). The aortic root and ascending thoracic aorta were measured in the parasternal long axis view. End-diastolic diameters were measured from inner to inner edge in mice and from leading edge to leading edge in humans at the aortic sinus level (for the aortic root) and at 1 mm and 1 cm above the sinotubular junction (for the ascending aorta) in mice and humans, respectively.

In the case of mice, an M-mode echocardiographic trace was acquired at the papillary muscle level in a parasternal short axis view, where LV dimensions at both end-diastole (LVDD) and end-systole (LVSD) were measured. The same M-mode trace was performed on humans in the basal parasternal long axis view. The interventricular septum and posterior wall thickness at end-diastole were measured at the same level as the LV chamber dimensions. LV ejection fraction (LVEF) was subsequently calculated as follows:  $LVEF = ((LVEDV - LVESV) / LVEDV) \times 100$  where  $LVEDV = 7 \times LVEDD^3 / 2.4 + LVEDD$  and  $LVESV = 7 \times LVESD^3 / 2.4 + LVESD$  were computed by the Teichholz formula and used as surrogates for LV systolic function. LV mass was calculated from the Devereux formula for LV mass (g) =  $0.8 \{ 1.04 [ (LVEDD + IVSd + PwD)^3 - LVEDD^3 ] \} + 0.6$ .

The blood pressure value in human subjects was registered the day of the echocardiography examination. Body surface area (BSA) was calculated using the DuBois method:  $BSA = (W^{0.425} \times H^{0.725}) \times 0.007184$  where the weight (W) is in kilograms and the height (H) is in centimeters.

The presence of PST was assessed in the offline M-mode analysis of the basal septum from the parasternal long axis view. It was defined by the presence of a “double peak sign”, consisting of a normal shaped deformation pattern (first peak) during the ejection period, followed by an ongoing deformation (second peak) after aortic valve closure and within the isovolumic relaxation time period in the entire recording with at least 10 beats (AVC) (Fig. 1a). AVC was indicated manually from the M-mode of the aortic valve movement in the parasternal long axis view. In the murine model, the reproducibility of PST presence at the basal septum was confirmed and assessed using color-coded tissue Doppler images (TDI) from the parasternal long axis view in randomly



**Figure 1.** Echocardiographic assessment of PST. (a,b) Examples of PST in murine model. (a) M-mode of parasternal long axis view. White arrow: PST in the interventricular septum. (b) Tissue Doppler Imaging (TDI) of the parasternal long axis view. Green hollow arrows: PST in the interventricular septum (IVS). (c) example of PST in patient with MFS. M-mode of the parasternal long axis view. Green hollow arrows: PST in the IVS.

chosen MFS ( $n=21$ ) and WT ( $n=14$ ) mice (Fig. 1b). The agreement between M-mode and TDI measurements was assessed by the Kappa statistics.

In humans, the presence of PST was similarly assessed in M-mode recordings obtained with the cursor positioned in the LV basal septum in a parasternal long axis view. A subject was considered to have PST if a “double peak sign” was consistently identified in the entire recording with at least 3 beats. In the human group, PST was assessed in a similar way, considered present if the PST curve was 5% bigger than systolic thickening curve starting the metric measurement [mm] from the baseline of interventricular septum in the end-diastole phase<sup>14</sup> (Fig. 1c). In humans PST was not assessed using color-coded tissue Doppler images (TDI) because of low signal-to-noise ratio.

	WT N = 21	MFS N = 18	P
Male gender[%]	48	50	0.88
Weight [g]	24.3 ± 2.8	25.7 ± 3.5	0.16
AoR [mm]	1.48 ± 0.11	1.84 ± 0.12	< <b>0.001</b>
LVEDD [mm]	3.75 ± 0.38	3.96 ± 0.31	0.11
LVESD [mm]	2.54 ± 0.38	2.73 ± 0.27	0.06
LV EF [%]	61 ± 7	59 ± 6	0.36
IVS [mm]	0.59 ± 0.07	0.64 ± 0.05	<b>0.01</b>
PW [mm]	0.57 ± 0.07	0.63 ± 0.07	<b>0.02</b>
LV mass [mg]	56.9 ± 17	68.7 ± 16	<b>0.02</b>
SBP [mmHg]	130 ± 11	134 ± 11	0.6
DBP [mmHg]	79 ± 9	78.7 ± 7	0.99
HR [bpm]	364 ± 41	360 ± 43	0.74

**Table 1.** Left ventricular and aortic remodeling in 4 mo-age mice. *AoR* aortic root diameter, *LVEDD* left ventricular end-diastolic diameter, *LVESD* left ventricular end-systolic diameter, *LVEF* left ventricular ejection fraction, *IVS* interventricular septum thickness, *PW* posterior wall thickness, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure, *HR* heart rate. Continuous variables data is presented as mean ± SD. Independent two-sample *t*-test for normally distributed continuous variables and the Mann–Whitney U test for non-parametric distribution. Categorical variable (male gender) is presented as percentage (%) and compared using  $\chi^2$  test.  $P < 0.05$ , in bold, denote statistical significance.

**Statistical analysis.** Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD). Assessment of normal distribution was performed using the Kolmogorov–Smirnov test or Shapiro–Wilk test, depending on the size of the group assessed. Categorical variables were expressed as percentages and absolute values. To assess the presence of any difference between MFS and WT groups, the two-sample *t*-test (adjusting for unequal variances) was used to compare continuous variables if normally distributed and the Mann–Whitney U test was used otherwise. Categorical variables were compared using the  $\chi^2$  test. The inter-observer and intra-observer reproducibility of PST values was assessed using Cohen’s Kappa statistics on ten randomly selected cases, considering Kappa values < 0.2 as poor, 0.2–0.4 as fair, 0.4–0.6 as moderate, 0.6–0.8 as good, and 0.8–1.0 as very good concordance. Statistical significance was set at 5% for all the tests. The statistical analysis was conducted using SPSS version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

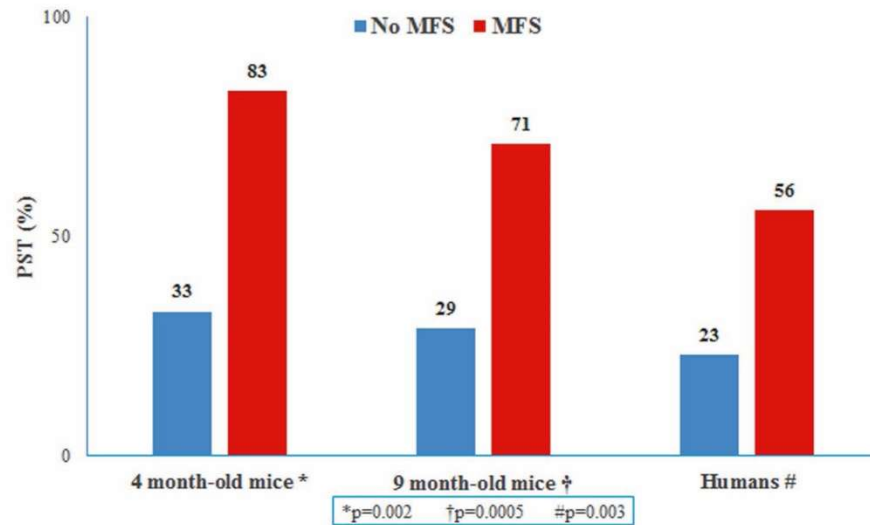
**PST presence in a mouse model of MFS.** Table 1 shows the characteristics of the 4 mo-age mice, while those from the 9 mo-age mice are shown in the Supplementary Table 1 (Table 1S). No differences were found in weight, gender or heart rate between MFS and WT animal groups (Table 1 and 1S).

Among the 9 mo-age mice, the aortic and LV dimensions were significantly larger in MFS mice than they were in WT mice, while LV performance, assessed through the LV ejection fraction, was lower in the MFS mice. In the 4 mo-age mice, the aortic dimensions were larger, and LV walls thicker, in MFS mice as compared to those observed in the WT mice. This was in agreement with the observations from the 9 mo-age mice, although no differences in LV chamber dimensions or function were present in the 4 mo-age mice (both MFS and WT mice showed similar LV ejection fraction). No significant differences in blood pressure were observed between MFS and WT animals at the 4 mo-age (Table 1).

PST was present in both MFS and WT mice, but it was significantly more frequent in MFS than it was in WT mice (Fig. 2). A high concordance was found between M-mode and TDI methods to detect the presence of PST (kappa value = 0.77) in the murine population (kappa 0.85;  $p < 0.01$ ). Inter-observer reliability was high for the measurement of PST (M-mode assessment: kappa = 0.78,  $P = 0.011$ ; TDI assessment: kappa = 0.8  $P = 0.01$ ) in the murine model.

**PST presence in human patients with MFS.** Table 2 depicts the characteristics of the clinical group regarding left ventricular and aortic remodeling. Subjects with MFS showed higher body surface area and height than did controls (2.05 vs 1.88  $P < 0.001$  and 187 vs 175  $P < 0.001$  respectively). As expected, the aorta was larger in patients with MFS than in controls. Although falling within the normal range, the left ventricular ejection fraction was lower in patients with MFS as compared to healthy controls. Conversely, systolic blood pressure was higher in healthy control subjects than in subjects with MFS (126 vs 119 mmHg,  $P = 0.009$ ). Thirty patients (67%) with MFS were receiving blood pressure lowering treatment. Half of the patients ( $N = 23$ , 51%) received beta blockers and 29% losartan ( $N = 13$ ), 6 were on both drugs and 33% ( $N = 15$ ) received no treatment. Despite having even lower blood pressure, the presence of PST was also significantly more frequent in MFS patients as compared to healthy controls: prevalence of PST was 56% vs 23%, respectively ( $p = 0.003$ ) (Fig. 2).





**Figure 2.** PST+ prevalence in 4 month-old mice, 9 month-old mice and humans comparing MFS and No MFS groups. Data presented as percentage (%). Compared using the  $\chi^2$  test. Significance  $P < 0.005$ .

	Controls N=35	MFS N=45	P
Age [yo]	32 ± 7.8	29 ± 7,6	0.09
Male gender [%]	41	46	0.63
Height [cm]	175 ± 11	187 ± 11	<b>&lt;0,001</b>
Weight [kg]	72 ± 12	80 ± 15	<b>0.02</b>
BSA [m <sup>2</sup> ]	1.88 ± 0.19	2.05 ± 0.2	<b>&lt;0,001</b>
AoR ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	16.4 ± 2	20.7 ± 2.9	<b>&lt;0,001</b>
Asc Ao ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	14.4 ± 1.64	16.2 ± 2.34	<b>0.001</b>
LVEDD ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	26.6 ± 2.4	25.7 ± 3.6	0.22
LVESD ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	17.4 ± 1.5	16.2 ± 3.1	0.05
IVS ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	4.6 ± 0.7	4.9 ± 0.8	0.12
PW ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	4.1 ± 0.6	3.9 ± 0.4	0.13
LV EF [%]	64 ± 5	61 ± 5	<b>0.01</b>
SBP [mm/Hg]	126 ± 10	119 ± 12	<b>0.00</b>
DBP [mm/Hg]	76 ± 10	72 ± 9	0.15

**Table 2.** Left ventricular and aortic remodeling in humans. *BSA* body surface area, *AoR* aortic root diameter, *Asc Ao* ascending aorta diameter, *LVEDD* left ventricular end-diastolic diameter, *LVESD* left ventricular end-systolic diameter, *LVEF* left ventricular ejection fraction, *IVS* interventricular septum thickness, *PW* left ventricular posterior wall thickness, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure, *ind.* indexed by BSA. Continuous variables data is presented as mean ± SD. Independent two-sample t-test for normally distributed continuous variables and the Mann–Whitney U test for non-parametric distribution. Categorical variable (male gender) is presented as percentage (%) and compared using  $\chi^2$  test.  $P < 0.05$ , in bold, denote statistical significance.

**Association of PST with aorta dilation.** Table 3 shows the differences in 4 mo-age mice with and without PST. Aortic root diameter was larger in MFS mice with PST than it was in those without, despite showing similar blood pressures. Similar results were also observed in 9 mo-age mice, with larger aortas in those with PST despite blood pressure not being assessed (Table 2S).

Table 4 depicts human subjects’ characteristics according to the presence of PST. In the study’s human group, the presence of PST was only related to the subjects’ older age. There was no difference determined by the PST presence in the aorta dimensions or blood pressure.

As PST has been described in older healthy individuals<sup>14</sup>, we focused on the youngest group of MFS subjects, from the first age tertile of the MFS population (under 24 years old,  $N = 16$ ). In this MFS patient subgroup, PST was indeed associated with larger aortic dimensions:  $19.4 \pm 3$  vs  $15.5 \pm 3$  in PST (+) vs PST (-) youngest MFS,

	WT N = 21		P	MFS N = 18		P
	PST (-) N = 14	PST (+) N = 7		PST (-) N = 3	PST (+) N = 15	
Weight [g]	<b>23.05 ± 2.36</b>	<b>26.94 ± 1.5</b>	<b>0.001</b>	22.9 ± 3	26.2 ± 3.4	0.13
AoR [mm]	1.485 ± 0.12	1.48 ± 0.09	0.92	<b>1.69 ± 0.06</b>	<b>1.88 ± 0.1</b>	<b>0.01</b>
LVEDD [mm]	3.65 ± 0.35	3.96 ± 0.38	0.17	4 ± 0.3	3.95 ± 0.3	0.82
LVESD [mm]	2.45 ± 0.34	2.75 ± 0.42	0.12	2.85 ± 0.1	2.7 ± 0.3	0.43
LVEF [%]	62 ± 8	60 ± 7	0.48	56 ± 6	60 ± 6	0.57
IVS [mm]	0.58 ± 0.08	0.6 ± 0.06	0.54	0.64 ± 0.06	0.64 ± 0.05	0.82
PW [mm]	0.56 ± 0.07	0.61 ± 0.07	0.13	0.64 ± 0.05	0.62 ± 0.07	0.74
LV mass [mg]	53 ± 15	65 ± 19	0.2	71 ± 16	68 ± 17	0.8
HR [bpm]	362 ± 45	368 ± 37	0.75	342 ± 17	363 ± 45	0.19
SBP [mm/Hg]	131 ± 11	129 ± 11	0.66	133 ± 11	134 ± 11	1
DBP [mm/Hg]	78 ± 10	81 ± 8	0.43	77.5 ± 9	79 ± 6	0.9

**Table 3.** Left ventricular and aortic remodeling in the 4 mo-age mice according to the presence of PST. *AoR* aortic root diameter, *LVEDD* left ventricular end-diastolic diameter, *LVESD* left ventricular end-systolic diameter, *LVEF* left ventricular ejection fraction, *IVS* interventricular septum thickness, *PW* posterior wall thickness, *HR* heart rate, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure. Data is presented as mean ± SD. Independent two-sample t-test for normally distributed variables and the Mann–Whitney U test for non-parametric distribution. SP < 0.05, in bold, denote statistical significance.

	Controls N = 35		P	MFS N = 45		P
	PST (-) N = 27	PST (+) N = 8		PST (-) N = 20	PST (+) N = 25	
Age [yo]	31 ± 7	35 ± 9	0.21	<b>25 ± 7</b>	<b>31 ± 7</b>	<b>0.01</b>
Male gender [%]	44	50	0.78	55	48	0.64
BSA [m <sup>2</sup> ]	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.2	0.9	2.07 ± 0.2	2.03 ± 0.2	0.46
AoR ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	16.6 ± 2	15.9 ± 2.2	0.44	20.6 ± 3	20.8 ± 2.9	0.93
Asc Ao ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	14.3 ± 1.6	14.8 ± 1.9	0.5	16.6 ± 2.8	15.9 ± 1.9	0.66
LVEDD ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	26.6 ± 2.3	26.6 ± 2.9	0.98	25.9 ± 3.6	25.5 ± 3.8	0.68
LVESD ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	17.2 ± 1.5	17.7 ± 1.6	0.41	16.4 ± 2.8	16.1 ± 3.3	0.56
IVS ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	4.6 ± 0.7	4.6 ± 0.5	0.8	4.9 ± 0.9	4.8 ± 0.8	0.7
PW ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	4.1 ± 0.6	4 ± 0.6	0.88	3.9 ± 0.5	3.9 ± 0.4	0.82
LV mass ind. [g/m <sup>2</sup> ]	73 ± 17	73 ± 19	0.97	85.9 ± 18	79.8 ± 18	0.22
LVEF [%]	65 ± 4	62 ± 5	0.09	61 ± 6	61 ± 5	0.73
SBP [mm/Hg]	125 ± 10	127 ± 10	0.55	119 ± 10	119 ± 13	0.95
DBP [mm/Hg]	74 ± 11	80 ± 9	0.15	72 ± 8	73 ± 10	0.57

**Table 4.** Left ventricular and aortic remodeling in humans according to the presence of PST. *BSA* body surface area, *AoR* aortic root diameter, *Asc Ao* ascending aorta diameter, *LVEDD* left ventricular end-diastolic diameter, *LVESD* left ventricular end-systolic diameter, *LVEF* ejection fraction, *IVS* interventricular septum thickness, *PW* posterior wall thickness, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure, *ind.* indexed by BSA. Continuous variables data is presented as mean ± SD. Independent two-sample t-test for normally distributed continuous variables and the Mann–Whitney U test for non-parametric distribution. Categorical variable (male gender) is presented as percentage (%) and compared using  $\chi^2$  test. P < 0.05, in bold, denote statistical significance.

respectively ([mm/m<sup>2</sup>], P = 0.04). Blood pressure was similar in the two groups of youngest MFS patients, both without PST (n = 11) and with PST (n = 5): 115 ± 9 vs 106 ± 10 ([mmHg], p = 0.07) for SBP and 69 ± 7 vs 63 ± 9 ([mmHg], p = 0.17) for DBP.

**Impact of blood pressure lowering therapy.** None of the healthy controls received blood pressure lowering treatment. Conversely, 67% of patients with MFS were on medical therapy with losartan or beta-blockers. Age, blood pressure and LV cavity dimensions were similar in those with and without medication, but the aortic root was larger in those receiving medical treatment. Finally, those two groups of patients with MFS had a similar prevalence of PST (Table 5). Because of the transversal nature of the study we have no data on the duration of the medical treatment in each patient.

	MFS without drugs N = 15	MFS with drugs N = 30	P
Age [yo]	27 ± 8	30 ± 8	0.33
Weight [kg]	76 ± 14	81 ± 15	0.26
High [cm]	183 ± 9	189 ± 12	0.08
BSA [m <sup>2</sup> ]	1.97 ± 0.2	2.08 ± 0.2	0.12
Aortic root ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	19.5 ± 3	21.3 ± 3	<b>0.04</b>
Asc Ao ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	16 ± 3	16 ± 2	0.95
LVEDD ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	27 ± 5	25 ± 3	0.13
LVESD ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	17 ± 4	16 ± 2	0.18
IVS ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	4.6 ± 1	5 ± 0.7	0.09
PW ind. [mm/m <sup>2</sup> ]	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.4	0.56
LV mass ind. [g/m <sup>2</sup> ]	81 ± 20	83 ± 18	0.63
LVEF[%]	62 ± 5	61 ± 6	0.66
SBP [mmHg]	120 ± 12	118 ± 11	0.49
DBP [mmHg]	74 ± 9	72 ± 9	0.52
PST +	8 (53%)	17 (57%)	0.832

**Table 5.** Left ventricular and aortic remodeling in humans according to medical treatment. *BSA* body surface area, *AoR* aortic root diameter, *Asc Ao* ascending aorta diameter, *LVEDD* left ventricular end-diastolic diameter, *LVESD* left ventricular end-systolic diameter, *LVEF* left ventricular ejection fraction, *IVS* interventricular septum thickness, *PW* posterior wall thickness, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure, *PST*: postsystolic thickening, ind.: indexed by BSA. Data is presented as mean ± SD for continuous variables. Independent two-sample t-test for normally distributed continuous variables and the Mann–Whitney U test for non-parametric distribution were used. Categorical variable (*PST*) is presented as percentage (%) and compared using  $\chi^2$  test.  $P < 0.05$ , in bold, denote statistical significance.

## Discussion

The study's main finding was the increased prevalence of *PST* in *MFS*. These findings were detected both in a murine experimental model and in a cohort of patients with *MFS*. In humans we have set the presence of *PST* at the level of 5% bigger than the systolic curve in order to detect myocardial dysfunction in early stage of the disease despite the majority of experiments differentiate the physiologic *PST* from pathologic *PST* if it is approximately 10–20% bigger than the systolic curve<sup>8,15</sup>. In the controlled murine group of 4 mo-age the *PST* presence was associated with the aortic root dilation despite no difference in blood pressure. Interestingly, the *MFS* human subjects show lower systolic blood pressure than the controls and association of *PST* with the age. Due to the natural increasing stiffness of the aorta with aging, the presence of *PST* has been described to increase in the elder population<sup>15,25</sup>. Accordingly, and in order to avoid, at least to some extent, the potential influence of aging on *PST* prevalence, the youngest tertile (18–24 years-old) of our group of *MFS* patients was selected. Notably, humans under 24 years of age would seem to be the most comparable, in terms of age, with the 4 mo-age mice group, considering the usual life-span of mice (18–20 mo-age.). Therefore, we sought to analyze the presence of *PST* and its relationship with blood pressure and aortic dilation in that young adult individuals. Notably, despite the small number of subjects ( $N = 16$ , with 5 subjects having *PST* +), a significant association between the presence of *PST* (*PST* +) and aortic dilation was observed in the youngest patients with *MFS*. Both groups of young subjects (young *MFS* mice and young patients) showed the same association between *PST* and aortic root dilation. With aging, other confounding factors might influence aortic wall stress potentially explaining that this association was not observed in older subjects with *MFS*. Further longitudinal and controlled clinical studies will shed more light on this potential association.

Several investigators have demonstrated that dilation of the aortic root and ascending aorta is accompanied by LV dilation and impaired left ventricular function in *MFS* mice<sup>16</sup> as well as in humans<sup>17</sup>. The myocardial involvement in *MFS* includes impaired biventricular deformation with a subsequent reduction in long axis systolic function, as well as biventricular and atrial mild diastolic dysfunction. Altogether this has raised the hypothesis of the existence of a primary cardiomyopathy in *MFS*<sup>18</sup>. Patients with *MFS* can potentially develop myocardial injury such as fibrosis and myocardial architecture disorder caused by abnormal collagen deposition and organization. Tae et al. reported that the early remodeling expressed as myocardial hypertrophy in 2- and 4 mo-age *MFS* mice was not associated with hemodynamic overload (as valvular insufficiency), but likely triggered by an intrinsic mechanism related to the altered myocardial matrix causing persistent mechanical stress<sup>19</sup>. In an experiment with mild transverse aortic constriction, Rouf et al. demonstrated that *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice are more predisposed to load-induced heart failure than their WT littermates<sup>20</sup>. Likewise, they support the hypothesis previously reported that the canonical TGF- $\beta$  signaling contributes to this load-induced cardiac decompensation<sup>16</sup>. An interesting novel in vivo mouse model of Cavanaugh et al. consisting of subcutaneously delivered angiotensin II in *MFS* mice causes accelerated aortic aneurysm formation and dilated cardiomyopathy even without aortic insufficiency, suggesting a potential intrinsic aetiology for the diseased myocardium<sup>21</sup>.

*PST* is an easy parameter to be clinically and experimentally obtained and evaluated. The data included in this study can demonstrably be reproduced using two different methodologies: DTI and M-mode echocardiography.

PST in the basal septum is a marker of pressure overload that can be easily detected by conventional echocardiography as several clinical study show in hypertensive and ischemic patients<sup>7,11</sup>. According to the geometry of the LV, the greatest pressure overload can be expected to occur in the basal segment of the IVS as it has a greater local radius of anatomic curvature in comparison with the free wall or the apex of the LV. A regional increase in parietal stress occurs at that location, resulting both in segment interaction and PST. In the event of pressure overload, the basal IVS segment is the first parameter to evidence the associated systolic deformation reduction due to its flatter geometry<sup>15,22</sup>. The development of postsystolic deformation, along with localized hypertrophy, can even be observed before visual assessment of wall thickening. Previous studies have shown an association of PST with more advanced left ventricular and atrial dysfunction among patients with well-controlled systemic hypertension<sup>23</sup>.

From the observations gathered on LV remodeling, PST, and its association with aortic dilation in very young subjects, we would conclude that individuals with MFS show the same sign that is observed in hypertensive cardiac remodeling despite having normal blood pressures. There are two possible explanations. First, the potentially abnormal arterial wall composition in MFS, and its associated stiffening, would alter flow propagation and pressure wave reflections, thus impacting the LV performance, even though peripheral blood pressure values remain within normal ranges. The mechanism of this effect remains still not elucidated. Second, extracellular matrix assembly alterations caused by mutated fibrillin-1, altered TGF $\beta$  signaling, and associated cardiac fibrosis<sup>24</sup> altogether contribute to the local wall stress mainly on cardiomyocytes, finally leading to pressure overload signs such as high LV mass and PST. Our findings suggest that the LV myocardial tissue of patients with MFS is at risk despite these patients having 'normal blood pressures', and would encourage searching for novel preventive therapies especially at very young age.

### Clinical implications

Preventing aortic dilation and rupture in patients with hypertension and aortic dilation is of vital importance and the benefits of vasodilator drugs in this scenario are well established. However, the role of vasodilation in preventing aortic remodeling in MFS without classical hypertension remains unclear<sup>26</sup>. While agents such as losartan have a vasodilator effect, its cardiovascular impact likely also occurs via non-hemodynamic modulation of TGF $\beta$  and fibrotic pathways, which has been evidenced in multiple animal studies but in clinics is much less known. Unfortunately, our study does not provide new data in this respect. Nevertheless, the ultrasound analysis of LV regional deformation patterns (as shown by PST) can easily be integrated into the clinical setting (by using M-mode or DTI) and detect signs of myocardial injury even in early stages of the disease (as in very young adults). Elucidating the mechanisms of cardiac dysfunction in MFS has important implications for the timing of surgical valve repair and for the development of novel medical therapies to prevent heart failure. The demonstration of mechanistic evidence of myocardial susceptibility in MFS heart would support the rationale for more intensive preventive therapy in still-early, asymptomatic stages of the disease, even when patients show normal peripheral blood pressure.

### Limitations of the study

The study has several strengths and limitations. Murine heart evaluation is challenging because of the smallness and high heart rate of the mice. Despite these limitations, evaluation of cardiac function has demonstrated to be feasible and reproducible in most mice following a strict methodology with high frame rate acquisitions. Despite a higher mean arterial pressure has been reported in mice using the tail cuff method as compared to the more robust methods of either intra-arterial catheter or telemetry, we chose the tail cuff measurements because of their non-invasiveness to avoid complications. The absolute number of systolic or especially diastolic blood pressure cannot be taken into account as referential for the small animals. However, we believe that it can be used to compare the values in a group of animals that are being exposed to the same conditions of assessment.

The inherent higher noise level in tissue Doppler assessment encouraged us establishing the M-mode modality as a referential of PST presence. Although we are conscious that the very sensitive level of PST detection (5% of difference) could provide some percentage of physiological examples we believe that it would not change the overall message of the study in such high difference between PST presence in MFS subjects and healthy subjects. We also acknowledge the limited sample size of the very young human population limiting the confidence of some conclusions. The transversal nature of this observational study and the absence of follow-up data make it impossible to demonstrate the impact of blood pressure lowering drugs on LV performance or whether or not these drugs can modulate the association of PST with an aortic aneurysm. The role of vasodilator therapy as a modifier of myocardial remodeling in murine MFS models is an objective of our upcoming studies. Regarding the mechanism leading to the presence of PST, data from cardiac MRI to depict myocardial fibrosis and gain a better estimation of aortic stiffness with 4D flow sequences, as well as histological studies on aorta and myocardial wall structure, will shed more light on this important topic. Further studies are needed to confirm our findings and to support our mechanistic hypothesis of an increased prevalence of PST in MFS patients. Follow-up studies are needed to evaluate the impact of vasodilator drugs on LV performance and whether or not these drugs can modulate the association of PST with an aortic aneurysm.

### Conclusions

The prevalence of PST is significantly increased both in MFS mice and patients, suggesting early LV damage. It provides a potential diagnostic tool to monitor and potentially to interfere with cardiac programming. This observation suggests the suitability of initiating early preventive therapy in patients with MFS even having normal blood pressure levels. In any case, further prospective and controlled studies are needed to examine the impact of vasodilator therapy and particularly its titration, on PST and myocardial function and aortic stiffness in patients

with MFS. Mice models represent also a perfect controlled experimental setting to prove this, once that we have shown in the current study that PST measurement is feasible and reproducible in them.

Received: 26 December 2020; Accepted: 22 July 2021

Published online: 04 August 2021

## References

1. Ammash, N. M., Sundt, T. M. & Connolly, H. M. Marfan syndrome—diagnosis and management. *Curr. Probl. Cardiol.* **33**(1), 7–39. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2007.10.001> (2008).
2. Meijboom, L. J. *et al.* Evaluation of left ventricular dimensions and function in Marfan's syndrome without significant valvular regurgitation. *Am. J. Cardiol.* **95**(6), 795–797. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.11.042> (2005).
3. De Backer, J. F. *et al.* Primary impairment of left ventricular function in Marfan syndrome. *Int. J. Cardiol.* **112**(3), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.10.010> (2006).
4. Rybczynski, M. *et al.* Tissue Doppler imaging identifies myocardial dysfunction in adults with Marfan syndrome. *Clin. Cardiol.* **30**(1), 19–24. <https://doi.org/10.1002/clc.3> (2007).
5. Kiotsekoglou, A. *et al.* Impaired biventricular deformation in Marfan syndrome: A strain and strain rate study in adult unoperated patients. *Echocardiography* **28**(4), 416–430. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2010.01359.x> (2011).
6. Campens, L. *et al.* Intrinsic cardiomyopathy in Marfan syndrome: Results from in-vivo and ex-vivo studies of the Fbn1C1039G/+ model and longitudinal findings in humans. *Pediatr. Res.* **78**(3), 256–263. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.110> (2015).
7. Carlhäll, C., Wranne, B. & Jurkevicius, R. Is left ventricular postsystolic long-axis shortening a marker for severity of hypertensive heart disease? *Am. J. Cardiol.* **91**(12), 1490–1493. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(03\)00407-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(03)00407-7) (2003).
8. Crispí, F. *et al.* Postsystolic shortening by myocardial deformation imaging as a sign of cardiac adaptation to pressure overload in fetal growth restriction. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* **7**(5), 781–787. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.113.001490> (2014).
9. Weidemann, F. *et al.* How to distinguish between ischemic and nonischemic postsystolic thickening: A strain rate imaging study. *Ultrasound Med. Biol.* **32**(1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2005.09.003> (2006).
10. Melchiorre, K., Sutherland, G. R., Baltabaeva, A., Liberati, M. & Thilaganathan, B. Maternal cardiac dysfunction and remodeling in women with preeclampsia at term. *Hypertension* **57**(1), 85–93. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162321> (2011).
11. Bijmens, B., Claus, P., Weidemann, F., Strotmann, J. & Sutherland, G. R. Investigating cardiac function using motion and deformation analysis in the setting of coronary artery disease. *Circulation* **116**(21), 2453–2464. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684357> (2007).
12. Pereira, L. *et al.* Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(7), 3819–3823. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3819> (1999).
13. Pachon, R. E., Scharf, B. A., Vatner, D. E. & Vatner, S. F. Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **308**(12), H1525–H1529. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00890.2014> (2015).
14. Brainin, P. *et al.* Post-systolic shortening: Normal values and association with validated echocardiographic and invasive measures of cardiac function. *Int. J. Cardiovasc. Imaging.* **35**(2), 327–337. <https://doi.org/10.1007/s10554-018-1474-2> (2019).
15. Voigt, J. U. *et al.* Incidence and characteristics of segmental postsystolic longitudinal shortening in normal, acutely ischemic, and scarred myocardium. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **16**(5), 415–423. [https://doi.org/10.1016/s0894-7317\(03\)00111-1](https://doi.org/10.1016/s0894-7317(03)00111-1) (2003).
16. Cook, J. R. *et al.* Dimorphic effects of transforming growth factor- $\beta$  signaling during aortic aneurysm progression in mice suggest a combinatorial therapy for Marfan syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**(4), 911–917. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.305150> (2015).
17. Creemers, E. E. & Pinto, Y. M. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc. Res.* **89**(2), 265–272. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq308> (2011).
18. Kiotsekoglou, A., Moggridge, J. C., Child, A. H. & Rask, P. The role of advanced echocardiography and cardiovascular magnetic resonance in the assessment of myocardial function in Marfan syndrome—An update. *Echocardiography* **34**(5), 760–767. <https://doi.org/10.1111/echo.13517> (2017).
19. Tae, H. J., Petrashevskaya, N., Marshall, S., Krawczyk, M. & Talan, M. Cardiac remodeling in the mouse model of Marfan syndrome develops into two distinctive phenotypes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **310**(2), H290–H299. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00354.2015> (2016).
20. Rouf, R. *et al.* Nonmyocyte ERK1/2 signaling contributes to load-induced cardiomyopathy in Marfan mice. *JCI Insight.* **2**(15), e91588. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91588> (2017).
21. Cavanaugh, N. B. *et al.* A novel murine model of marfan syndrome accelerates aortopathy and cardiomyopathy. *Ann. Thorac. Surg.* **104**(2), 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsurg.2016.10.077> (2017).
22. Claus, P. *et al.* Mechanisms of postsystolic thickening in ischemic myocardium: Mathematical modelling and comparison with experimental ischemic substrates. *Ultrasound Med. Biol.* **33**(12), 1963–1970. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2007.06.003> (2007).
23. Loncaric, F. *et al.* Basal ventricular septal hypertrophy in systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* **125**(9), 1339–1346. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.01.045> (2020).
24. Holm, T. M. *et al.* Noncanonical TGF $\beta$  signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* **332**(6027), 358–361. <https://doi.org/10.1126/science.1192149> (2011).
25. Brainin, P. *et al.* Postsystolic shortening by speckle tracking echocardiography is an independent predictor of cardiovascular events and mortality in the general population. *J. Am. Heart Assoc.* **7**(6), e008367. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008367> (2018).
26. Mancia, G. *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **34**(28), 2159–2219. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu151> (2013).

## Acknowledgements

The authors wish to thank Montserrat Batlle for help in organizing the manuscript and Vanessa Hernandez for expert mice laboratory work.

## Author contributions

A.M.S., G.E., Ba.B. and M.S. were responsible for conception, design of the study and obtaining funding. A.M.S., R.B.B., B.M. contributed to subject recruitment and data acquisition. A.M.S., Be.B. and L.S. analysed the echocardiography studies. A.M.S. and P.R. contributed to statistical analysis. All authors made substantial contributions

to analysis and interpretation of data. A.M.S., P.R. and G.E. drafted the manuscript. All authors critically revised and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. A.M.S., Ba.B. and M.S. agreed to be responsible for the overall content as guarantors.

### Funding

This work has been partially supported by MINECO from the Spanish Government Grant (SAF2017-83039-R) to G.E.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95263-5>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.M.-S.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

## Artículo 2 (población B)

### Objetivo:

3. Evaluar el impacto del ejercicio físico dinámico de intensidad moderada en la dilatación de aorta ascendente y la miocardiopatía en el SM.

**Mas-Stachurska A**, Siegert AM, Batlle M, Gorbenko Del Blanco D, Meirelles T, Rubies C, Bonorino F, Serra-Peinado C, Bijnens B, Baudin J, Sitges M, Mont L, Guasch E, Egea G. Cardiovascular Benefits of Moderate Exercise Training in Marfan Syndrome: Insights From an Animal Model. *J Am Heart Assoc.* 2017 Sep 25;6(9):e006438. doi: 10.1161/JAHA.117.006438.

Factor de impacto: 5,501. Cuartil: Q1. Área de conocimiento: Cardiac & Cardiovascular Systems.

## Cardiovascular Benefits of Moderate Exercise Training in Marfan Syndrome: Insights From an Animal Model

Aleksandra Mas-Stachurska, MD, MSc;\* Anna-Maria Siegert, MSc;\* Monserrat Batlle, PhD; Darya Gorbenko del Blanco, PhD; Thayna Meirelles, PhD; Cira Rubies, PhD; Fabio Bonorino, MSc; Carla Serra-Peinado, PhD; Bart Bijmens, PhD; Julio Baudin, BSc; Marta Sitges, MD, PhD; Lluís Mont, MD, PhD; Eduard Guasch, MD, PhD<sup>†</sup> Gustavo Egea, PhD<sup>†</sup>

**Background**—Marfan syndrome (MF) leads to aortic root dilatation and a predisposition to aortic dissection, mitral valve prolapse, and primary and secondary cardiomyopathy. Overall, regular physical exercise is recommended for a healthy lifestyle, but dynamic sports are strongly discouraged in MF patients. Nonetheless, evidence supporting this recommendation is lacking. Therefore, we studied the role of long-term dynamic exercise of moderate intensity on the MF cardiovascular phenotype.

**Methods and Results**—In a transgenic mouse model of MF (*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup>), 4-month-old wild-type and MF mice were subjected to training on a treadmill for 5 months; sedentary littermates served as controls for each group. Aortic and cardiac remodeling was assessed by echocardiography and histology. The 4-month-old MF mice showed aortic root dilatation, elastic lamina rupture, and tunica media fibrosis, as well as cardiac hypertrophy, left ventricular fibrosis, and intramyocardial vessel remodeling. Over the 5-month experimental period, aortic root dilation rate was significantly greater in the sedentary MF group, compared with the wild-type group ( $\Delta\text{mm}$ ,  $0.27 \pm 0.07$  versus  $0.13 \pm 0.02$ , respectively). Exercise significantly blunted the aortic root dilation rate in MF mice compared with sedentary MF littermates ( $\Delta\text{mm}$ ,  $0.10 \pm 0.04$  versus  $0.27 \pm 0.07$ , respectively). However, these 2 groups were indistinguishable by aortic root stiffness, tunica media fibrosis, and elastic lamina ruptures. In MF mice, exercise also produced cardiac hypertrophy regression without changes in left ventricular fibrosis.

**Conclusions**—Our results in a transgenic mouse model of MF indicate that moderate dynamic exercise mitigates the progression of the MF cardiovascular phenotype. (*J Am Heart Assoc.* 2017;6:e006438. DOI: 10.1161/JAHA.117.006438.)

**Key Words:** aortic disease • endurance exercise • fibrosis • Marfan syndrome • myocardial pathology

Marfan syndrome (MF) is a connective tissue disorder caused by mutations in the gene encoding fibrillin-1 (*FBN1*), a connective tissue protein.<sup>1</sup> *FBN1* provides structural and elastic support to a variety of tissues by modulating the biogenesis and homeostasis of elastic fibers as well as the availability and activity of transforming growth factor- $\beta$  family members.<sup>2</sup> Important insights on the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of MF have been reported.<sup>3</sup> Major efforts have focused on uncovering the mechanisms of

aortic root dilation leading to dissection and rupture, a hallmark of MF that critically determines survival. Advances in basic research have recently been translated into clinical trials with the aim of pharmacological interference with the progression of aneurysm, predominantly testing  $\beta$ -blockers and angiotensin II receptor antagonists.<sup>4</sup> Unfortunately, most trials have failed to demonstrate improvement in the progression of aortic dilation, and prophylactic and timely surgical intervention remains the only lifesaving measure.<sup>5</sup>

From the Institut Cardiovascular, Hospital Clínic de Barcelona (A.M.-S., M.S., L.M., E.G.), Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina (A.-M.S., D.G.d.B., T.M., F.B., C.S.-P., G.E.), and Institut de Nanociències i Nanotecnologia (IN2UB) (G.E.), Universitat de Barcelona, Spain; Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain (M.B., C.R., J.B., M.S., L.M., E.G., G.E.); CIBERCV (M.B., M.S., L.M., E.G.) ICREA, Barcelona, Spain (B.B.); Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain (B.B.).

Accompanying Figures S1 through S9 are available at <http://jaha.ahajournals.org/content/6/9/e006438/DC1/embed/inline-supplementary-material-1.pdf>

\*Dr Mas-Stachurska and Dr Siegert contributed equally to this work and are joint first authors.

<sup>†</sup>Dr Guasch and Dr Egea contributed equally to this work and are joint last authors.

**Correspondence to:** Eduard Guasch, MD, PhD, Cardiovascular Institute, Hospital Clínic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: [eguasch@clinic.cat](mailto:eguasch@clinic.cat) and Gustavo Egea, PhD, Department of Biomedical Sciences, University of Barcelona School of Medicine, C/Casanova 136, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: [gegea@ub.edu](mailto:gegea@ub.edu)

Received April 24, 2017; accepted August 10, 2017.

© 2017 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.



### Clinical Perspective

#### What Is New?

- Dynamic sports are strongly discouraged in Marfan patients on the basis of potential deleterious cardiovascular effects, but evidence supporting this recommendation is lacking.
- Our study in a murine model of Marfan syndrome suggests that moderate, endurance exercise for 5 months blunts aortic dilation and Marfan-associated cardiomyopathy.

#### What Are the Clinical Implications?

- If confirmed in well-designed studies in humans, the inclusion of cardiac rehabilitation programs in the therapeutic approach for patients with Marfan syndrome.
- The effects of more intense exercise or other types of sport other than endurance training still need to be studied.

Mitral valve prolapse often accompanies MF and could evolve into a secondary cardiomyopathy. However, recent reports suggest that cardiomyopathy could also be a primary manifestation of MF.<sup>6,7</sup> Other well-known systemic manifestations of MF include bone overgrowth, pulmonary emphysema, and evident myopathy, the latter being a consequence of the inability to repair muscle tissue injury and to increase skeletal muscle mass despite physical exercise.<sup>8</sup>

Regular physical activity is an efficient therapeutic approach to reduce the burden of cardiovascular diseases in the general population. Among other benefits, it improves left ventricular (LV) function and tissue perfusion, lowers blood pressure (BP), and reduces chronic low-grade inflammation.<sup>9</sup> To meet the higher metabolic demands that exercise entails, the cardiovascular system develops remarkable structural and functional changes in a remodeling process termed athlete's heart, whose features are markedly influenced by which sport is practiced. Exercise can be categorized as static (eg, weightlifting) and dynamic (eg, distance running), with very different physiological responses to each type of exercise. Although most sports include a mixture of both components, static exercise is characterized by increased BP and concentric LV hypertrophy, while volume overload and eccentric LV hypertrophy is typical in dynamic exercise.<sup>10</sup> Importantly, the exercise-induced remodeling process also affects the ascending aorta. In this respect, regular physical activity prompts a mild but significant aortic root dilatation, which is greater for practitioners of more dynamic sports, compared with static sports.<sup>11</sup>

Since dynamic physical training promotes cardiovascular extracellular matrix remodeling, changes in the aforementioned exercise-induced cardiovascular parameters will have a special impact on patients with inherited diseases, such as MF, that lead to abnormal extracellular matrix remodeling.

Consequently, it is assumed that exercise-induced extracellular matrix remodeling is adverse in these patients and worsens the progression of the aortic dilatation and cardiomyopathy. On the basis of this reasoning, dynamic physical activity has been strongly discouraged in MF patients.<sup>12</sup> However, no evidence is available to support this recommendation.<sup>13</sup>

Our aim was to evaluate the impact of dynamic exercise on the ascending aortic dilation and the cardiomyopathy in MF. We implemented a modest-to-moderate endurance exercise model, as this is the level of exercise most widely practiced by the general population. The experimental working model we selected was a heterozygous mouse line carrying a targeted mutation (C1039G) in exon 25 of the *Fbn1* gene,<sup>14</sup> representative of the most common class of mutations causing human MF. This murine model captures many of the clinical manifestations of MF, including aortic dilatation, cardiomyopathy, lung abnormalities, and skeletal deformations and myopathy.

## Methods

### Animals and Experimental Design

*Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME 04609, EE UU) and used as a validated MFS animal model. Both Wild Type (WT) and *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mice (hereinafter, Marfan [MF] mice) were bred on a C57BL/6 background. Comparisons were made between contemporary littermates. All mice were housed in a controlled environment (12/12-hour light/dark cycle) and provided with ad libitum access to food and water. All animals were weighed once a week throughout the duration of the experiment. Animal care and experimentation conformed to the European Union (Directive 2010/63/UE) and Spanish guidelines (RD 53/2013) for the use of experimental animals. Ethical approval was obtained from the local animal ethical committee (Comitè Ètic d'Experimentació Animal CEEA).

### Training Protocol

A group of WT and MF mice were randomly conditioned to run in a treadmill (Ex groups). After a 2-week adaptation period in which treadmill speed and slope and training duration were progressively increased, stable regimens were reached. Eventually, Ex mice ran at 20 cm/s, with a 12° positive slope for 60 minutes/d, 5 days/wk (Monday–Friday) for 5 months (from the age of 4 to 9 months). Training was performed in the afternoon, as close as possible to the dark (active) cycle to allow animals to rest during the light phase before training. A metallic grid at the back of the treadmill delivered a constant intensity ( $\approx 2$  mA) electric shock upon

contact and motivated mice to keep running. In this training protocol, electric shocks were virtually absent in all animals. All training sessions were monitored by an experienced investigator to ensure proper running and lack of stress. Parallel WT and MF groups not undergoing training served as sedentary (Sed) controls. Sample size at the beginning of the experimental protocol was WT-Sed n=11 (5 male, 6 female); MF-Sed n=9 (5 male, 4 female); WT-Ex n=10 (5 male, 5 female); MF-Ex n=10 (5 male, 5 female).

### Blood Pressure Assessment

Systemic blood pressure was noninvasively measured in all mice by a tail cuff system (Panlab NIPB system, consisting of control unit LE5007 and the automatic heater and scanner for 6 mice, LE56506). Briefly, mice were placed in a warming restrainer (34°C), with the tail carefully inserted into an inflatable cuff. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were automatically measured. Mean BP was calculated as  $1/3 \times \text{SBP} + 2/3 \times \text{DBP}$ .

Before initiating the exercise protocol, all mice were placed in the setup as many times as needed until they became adapted, thereby minimizing stress associated with the procedure. BP was thereafter measured at baseline, and after 1, 2, 3, and 5 months of training.

### Echocardiography

Two-dimensional transthoracic echocardiography was performed in all animals, with 1.5% inhaled isoflurane administered to the animals. Each animal was scanned twice: at baseline and at the end of the experiment, at least 24 hours after the final exercise session. Images were obtained with a 10 to 13-MHz phased-array linear transducer (IL12i GE Healthcare, Madrid, Spain) in a Vivid Q system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Images were all recorded and later analyzed offline using commercially available software (EchoPac v. 108.1.6, GE Healthcare, Madrid, Spain).

The aortic root and ascending thoracic aorta were measured in a parasternal long-axis view. Both the maximum and minimum diameters (inner edge to inner edge) were measured at the aortic sinus level (for the aortic root) and at 1 mm above the sinotubular junction (for the ascending aorta). The aortic root dilation rate was calculated as the diastolic aortic root diameter at the 9-month time-point minus the diastolic aortic root diameter at the 4-month time-point.

The M-mode spectrum was traced at the papillary muscle level in a parasternal short axis view, where LV dimensions at both end-diastole (LVDD) and end-systole (LVSD) were measured. The anterior wall and posterior wall thickness at end-cardiac diastole were also measured. LV ejection fraction (LVEF) was subsequently calculated as follows:

$$\text{LVEF} = \frac{\text{LVDD}^3 - \text{LVSD}^3}{\text{LVDD}^3} \times 100$$

The presence of postsystolic shortening (PSS) was assessed in M-mode recordings obtained with the cursor positioned in the LV basal septum in a parasternal long-axis view. An animal was considered to have PSS if a “double peak sign” was consistently identified. The “double peak sign” consists of a normal-shaped deformation pattern (first peak) during the ejection period followed by an ongoing deformation (second peak) after aortic valve closure.

### Aortic Pulsatility and Aortic Stiffness Estimation

Aortic pulsatility was used as a distensibility estimator, and calculated as follows:

$$\text{Pulsatility} = \frac{\text{Ao}_{\text{max}} - \text{Ao}_{\text{min}}}{\text{Ao}_{\text{min}}} \times 100$$

where  $\text{Ao}_{\text{max}}$  stands for maximum aortic diameter, and  $\text{Ao}_{\text{min}}$  stands for minimum aortic diameter. The final result is shown as percentage (%).

Aortic stiffness was calculated using the BP and echocardiographic aorta diameter in vivo. For each animal, the following formula was used to calculate the  $\beta$ -index:

$$\beta = \frac{\log\left(\frac{\text{SBP}}{\text{DBP}}\right)}{\left(\frac{\text{Ao}_{\text{max}} - \text{Ao}_{\text{min}}}{\text{Ao}_{\text{min}}}\right)}$$

where SBP stands for systolic blood pressure, DBP stands for diastolic blood pressure,  $\text{Ao}_{\text{max}}$  stands for maximum aortic diameter, and  $\text{Ao}_{\text{min}}$  stands for minimum aortic diameter. The final result is dimensionless.

### Euthanasia and Sample Collection

Nine-month-old mice were euthanized with an overdose of isoflurane inhalation and ascending aorta, heart samples and the vastus medialis muscle were quickly excised, immersed in cold physiological serum, and processed as described below.

### Aortic Collagen Deposition and Elastic Fiber Ruptures

The thoracic aorta was cut just above the aortic valve, and the ascending aorta was subsequently fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. Four-micron-thick sections were obtained and stained with Verhoeff-Van Gieson stain. Sections were examined using a Leica DMRB microscope ( $\times 40$ ). Two blinded investigators quantified aortic elastic fiber ruptures by fiber discontinuities per longitude in at least 4

## 2. Hipótesis y objetivos

Exercise in Marfan Syndrome Mas-Stachurska et al

representative images in each animal, and the average was calculated for each animal.

Furthermore, sections were stained with picosirius red to analyze collagen deposition. Six representative images were taken of each animal using the brightfield and polarized light of a Leica DMRB microscope. The tunica media was delimited using the brightfield images and corresponding polarized light images were used to quantify picosirius red–stained collagen deposition.

### Left Ventricle Histological Study

The whole heart was fixed in formaldehyde and transversally cut through midventricle in 2 blocks (basal and apical blocks). Both blocks were embedded in paraffin wax and 4- $\mu$ m-thick sections were obtained from the basal block and layered in poly-L-lysine-coated glass slides. The slides were stained with picosirius red. Intramyocardial collagen deposit was quantified, excluding the endomyocardial, epicardial, and perivascular fibrosis. Pictures ( $\times 40$ ) of 3 different representative areas of left ventricle (LV) were taken from each sample and the mean percentage of collagen deposition was calculated.

In order to assess intramyocardial vessel remodeling, pictures of both right ventricle and LV were taken ( $\times 100$ ) whenever a vessel was identified. Approximately 10 intramyocardial arteries were localized and different measurements were taken: perivascular area (A), limited by perivascular fibrosis; external area (Ae), limited by outer tunica adventitia; and internal area (Ai), limited by internal elastic lamina (Figure S1). The area of the lumen, tunica media, and perivascular fibrosis were all normalized to the vessel size (Ae) to exclude any bias in selecting vessels. All pictures were taken with an Olympus BX41TF microscope and DP73 camera. Blinded quantification of vascular remodeling and collagen deposition was performed with ImageJ 1.48v.

### Skeletal Muscle Histochemistry

At the euthanasia, the *vastus medialis* was excised by transecting the muscle origins and insertions. Muscles were placed on a mounting block and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane (2-methylbutane). Samples were sectioned at 5  $\mu$ m at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cross-cryosections were stained with NADH-tetrazolium reductase to examine the oxidative capacity of muscle fibers. Based on their NADH content, fibers were classified as type I (oxidative), type IIA (aerobic glycolytic), and type IIB (anaerobic glycolytic). Fiber types of the whole muscle section were counted using an Olympus BX51 microscope connected to a movable platform and the computer-assisted stereological toolbox (CAST) software count tool.

Capillaries were identified with the endothelial-specific marker CD31. Briefly, muscle sections were incubated with

rat anti-CD31 monoclonal antibody, clone MEC 13.3 (BD Biosciences) and a donkey anti-rat IgG secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). CD31-positive structures of muscle cryosections were counted using an Olympus BX51 microscope connected to a movable platform and the computer-assisted stereological toolbox (CAST) software count tool.

### Exploration of Sex Differences

After conducting main analyses, the effect of sex was explored in further statistical analyses. The effect of sex was explored in BP, histological analyses (aortic fibrosis and elastic fiber ruptures, LV fibrosis, intramyocardial arteries assessment), and in most echocardiographic variables (aortic root diameter, LVSD, LVDD, anterior wall, posterior wall, and LVEF). The effect of sex in PSS was not studied because the low sample size in each of the groups made analyses of a categorical variable meaningless. Because sex is known to heavily influence body weight, only de-aggregated data are shown.

### Statistical Analysis

All results for continuous variables are reported as mean  $\pm$  SEM. Because no mice had yet been trained, only the effect of genotype (ie, WT versus MF) was analyzed at the 4-month time-point; a nonpaired *t* test was used for comparisons in these cases. When 2 main factors were present in the study design (eg, genotype  $\times$  training), data were modeled in a 2-way ANOVA that included the 2 main factors and their interaction. Data with a repeated measurement factor (eg, several measurements over time) were analyzed with a linear mixed-effects model. For intramyocardial vascular remodeling, each analyzed vessel was nested within mouse and a random effect was included in the model. When a significant interaction was found, least significant differences (LSD)-adjusted pairwise comparisons are reported. In the absence of a significant interaction, significant main effects, if present, are reported. A normal distribution of the residuals (Q-Q plot and Shapiro–Wilks) was checked for all analyses.

Categorical variables (eg, PSS presence) are reported as percentages. The proportion of mice with PSS in all groups at baseline was compared with a Fisher exact test. Change of PSS over time (from 4- to 9-month time-points) in MF was assessed through a McNemar test.

Mouse survival is shown on a survival curve and comparisons carried out with a log-rank test.

After main analyses were conducted, the effect of sex was tested for all analyzed parameters by adding the Sex factor and all their interactions. In the case that the Sex factor or any of its interactions was significant, this is reported.

A  $P \leq 0.05$  was considered significant. Statistical analysis was carried out with Stata v13 (College Station, TX, USA) and Graphpad Prism v6.0 (GraphPad Software, Inc, USA).

All echocardiogram and histological measurements were carried out in a blinded manner of genotype and treatment group.

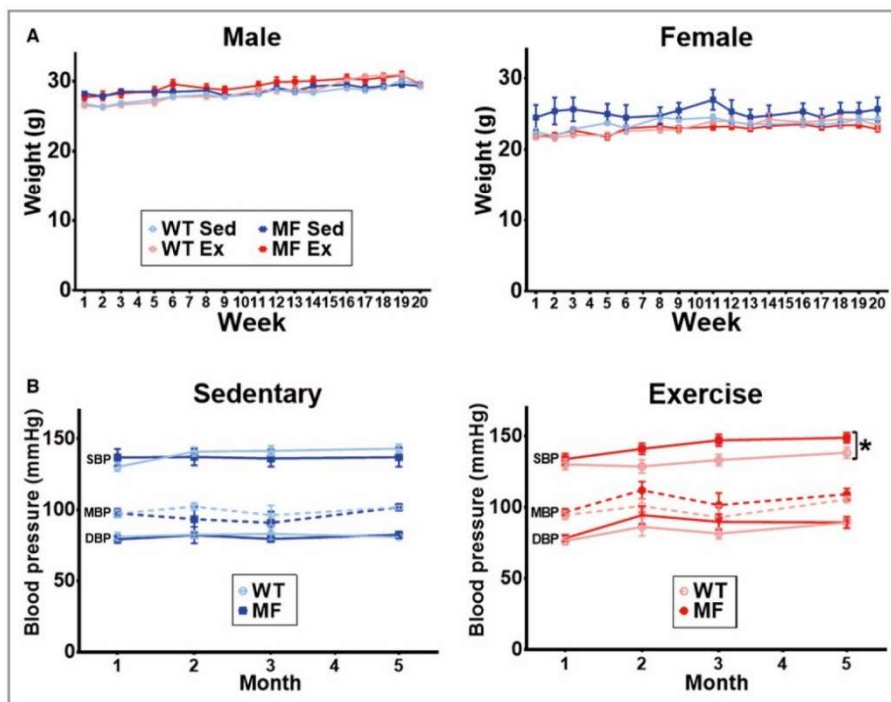
## Results

All mice subjected to exercise adequately adapted to the training protocol. Two MF mice allocated to the Sed group (1 male and 1 female mouse) died early in the experimental protocol; no other deaths occurred in any other group (Figure S2). Necropsy was not performed and the cause of death remained unknown for both dead animals. The difference in mortality between groups did not reach significance ( $P=0.063$ ).

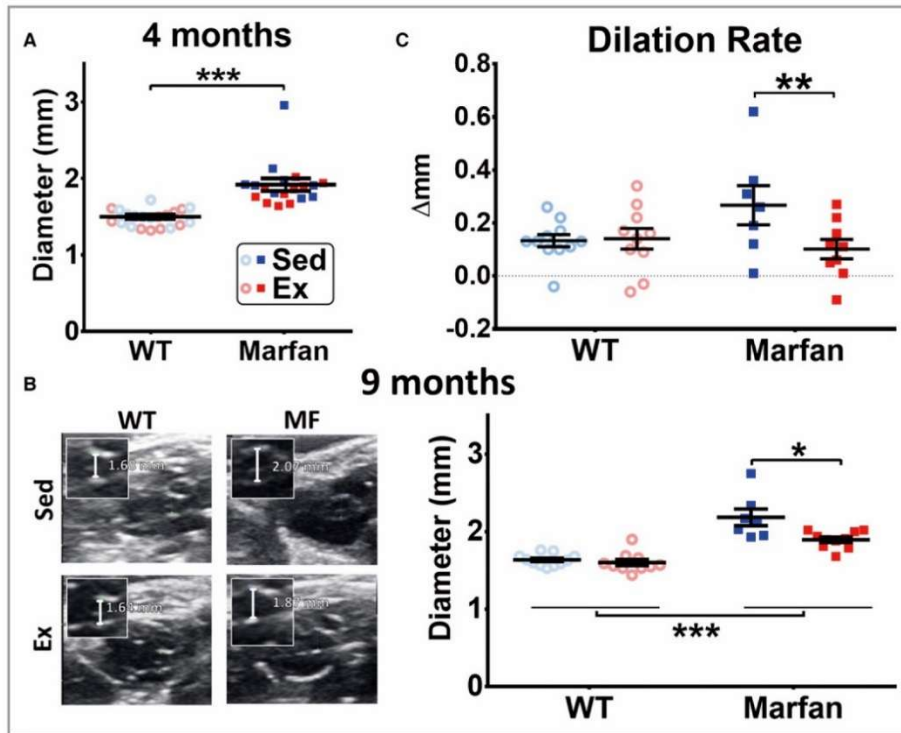
We next tested whether the intensity of physical activity promoted peripheral muscle adaptation. In *vastus medialis*, we

found a switch in the oxidative status of muscular fibers in trained WT mice in comparison to sedentary WT mice. However, capillary density evidenced by CD31-positive endothelial cells staining did not differ among groups, most likely because of the large variability observed in the trained group (Figure S3).

Because sex critically determines weight, results are shown after sex-stratification. Over the 5-month training period, weight gain was similar in all groups, both for male and female mice (Figure 1A). There were no differences in BP measurements at baseline between WT and MF mice (SBP was  $130 \pm 2$  versus  $134 \pm 3$ ; DBP was  $79 \pm 2$  versus  $79 \pm 2$ ; WT versus MF). In Sed animals, BP remained similar throughout the experimental period. In contrast, MF-Ex mice developed a higher SBP compared with WT-Ex, with no changes in DBP or mean BP (Figure 1B). However, there were no significant differences between trained WT and MF mice and their Sed littermates, likely because the statistical power was too low to uncover whether these differences arose from a decreased BP



**Figure 1.** Weight and blood pressure measurements in sedentary and trained WT and MF mice. A, Weight measurement during the experimental protocol (weeks 1–14) in all animals; results are shown separately for male and female mice (beginning the experiment, for male animals:  $n=5$  for WT-Sed, MF-Sed, MF-Sed and MF-Ex; for female animals:  $n=6$  for WT-Sed;  $n=4$  for MF-Sed;  $n=5$  for WT-Ex;  $n=5$  for MF-Ex). Analysis was performed with mixed-effects models; no significant differences were found between groups. B, Blood pressure was measured in all groups at 1, 2, 4, and 5 mo (beginning the experiment:  $n=11$  for WT-Sed,  $n=9$  for MF-Sed,  $n=10$  for WT-Ex,  $n=10$  for MF-Ex). Analysis was performed with mixed-effects models. No differences were found in Sed animals. In trained mice, a significant genotype effect was observed ( $P < 0.05$ ). \* $P < 0.05$ . Ex indicates trained group; MF, Marfan; Sed, sedentary group; WT, wild-type.



**Figure 2.** Echocardiographic measurements in sedentary and trained WT and MF mice. A, Average aortic root size at the 4-mo time-point in WT and MF mice ( $n=21$  for WT,  $n=19$  for MF). Analysis used a nonpaired  $t$  test. B, Aortic root size after the experimental protocol (9 mo) in all groups ( $n=11$  for WT-Sed,  $n=7$  for MF-Sed,  $n=10$  for WT-Ex,  $n=10$  for MF-Ex). Representative echocardiographic images of the aortic root size in all groups (left panel). Quantitative analysis (right panel) was done with 2-way ANOVA. A significant (genotype  $\times$  training group) interaction was found ( $P<0.05$ ); pairwise comparisons (training group within genotype and genotype within training group) are shown. C, Dilation rate in all groups ( $n=11$  for WT-Sed,  $n=7$  for MF-Sed,  $n=10$  for WT-Ex,  $n=9$  for MF-Ex). In 2-way ANOVA, genotype  $\times$  training group interaction was found ( $P<0.05$ ); pairwise comparisons (Sed vs Ex within each genotype) are reported: \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ . Ex indicates trained group; MF, Marfan; Sed, sedentary group; WT, wild-type. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.

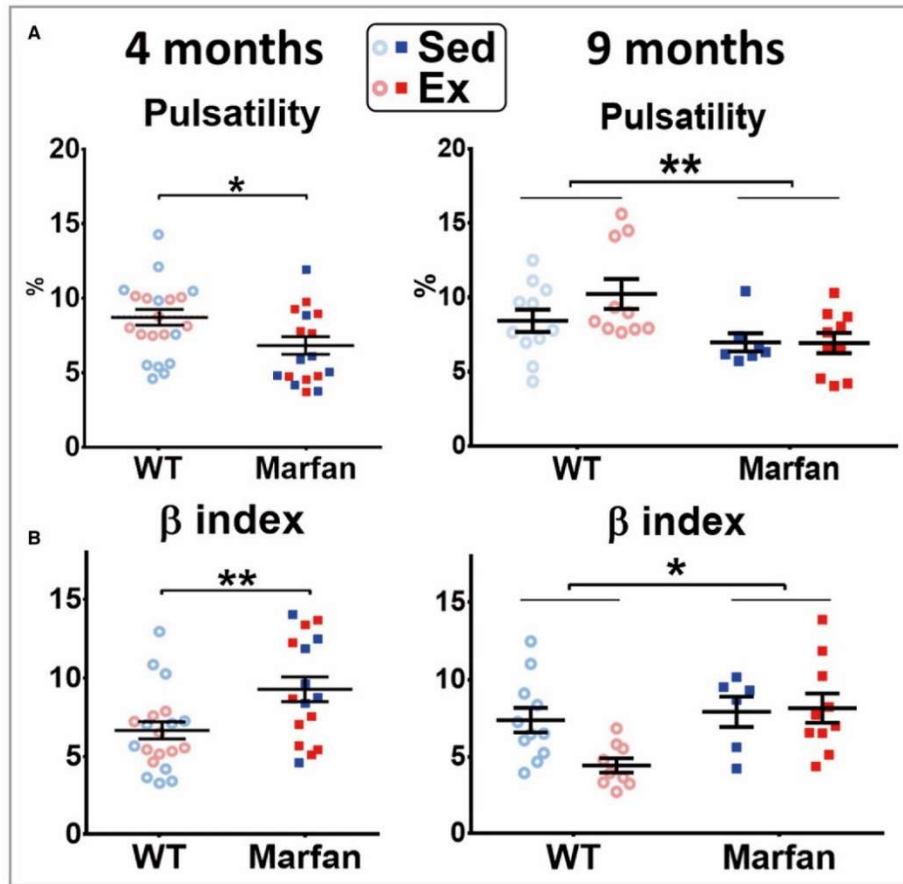
in trained WT mice, an increased BP in trained Marfan mice, or a combination of both. Although BP was lower in female- than in male-trained mice, sex had no impact on the effect of exercise (Figure S4).

### Moderate Exercise Slows the Progression of Aortic Root Dilation in Marfan Mice

All groups were subjected to echocardiographic evaluation of the aortic root (Figure 2). In accordance with clinical data and previous reports, 4-month-old MF mice had an enlarged aortic root at the beginning of the study (Figure 2A). All groups were scanned again at the end of the experimental period (9 months), with representative echocardiographic images shown in Figure 2B. In WT mice, moderate exercise did not induce changes in the size of the aortic root. In MF mice

subjected to exercise, however, aortic root diameter was smaller than in their Sed littermates (Figure 2B). To more accurately assess changes in aorta diameter over time, aortic root dilation rate was defined as the change in the aortic root size over the 5-month experimental protocol and was calculated from mouse-by-mouse aortic root size (Figure S5). Dilation rate in MF-Sed mice was twice that of WT ( $\Delta\text{mm}$ ,  $0.27\pm 0.07$  versus  $0.13\pm 0.02$ , respectively; Figure 2C). Remarkably, this parameter was blunted in trained MF mice, becoming comparable to the WT dilation rate (MF-Ex  $\Delta\text{mm}$   $0.10\pm 0.04$ ; Figure 2C). Aorta measurements at a more distal level yielded similar results: the ascending aorta was dilated at baseline in MF mice and dilation was blunted in trained mice (Figure S6).

The aortic root in MF patients is stiffer than in healthy individuals.<sup>15</sup> In our mice, aorta mechanical properties were



**Figure 3.** Aortic root pulsatility and stiffness in sedentary and trained WT and MF mice. Aortic root pulsatility (A) and  $\beta$ -index (B) at baseline ( $n=21$  for WT,  $n=17$  for MF; 4-mo-old mice; nonpaired  $t$  test) and at the end of the experimental training ( $n=11$  for WT-Sed,  $n=7$  for MF-Sed,  $n=10$  for WT-Ex,  $n=10$  for MF-Ex; 9-mo-old mice; 3-way ANOVA test). \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ . Ex indicates trained group; MF, Marfan; Sed, sedentary group; WT, wild-type. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.

estimated by combining in vivo data obtained from BP measurements and echocardiographic maximum and minimum aorta diameters. At 4 months, we observed significant differences in the aortic root expansibility (pulsatility) between WT and MF mice, which is indicative of a loss of elasticity (Figure 3A, left panel). At 9 months, differences between WT and MF persisted. WT-Ex mice showed a slight increase in pulsatility compared with WT-Sed, but it did not reach statistical significance. MF-Ex mice showed indistinguishable pulsatility from MF-Sed (Figure 3A). Subsequent calculation of the  $\beta$ -index at baseline (4 months) supported increased aortic root stiffness in MF mice compared with WT mice (Figure 3B). After the exercise training,  $\beta$ -index (aortic stiffness) significantly improved in WT but not in MF mice.

### Aortic Structural Abnormalities Remain Unaltered in Trained Marfan Mice

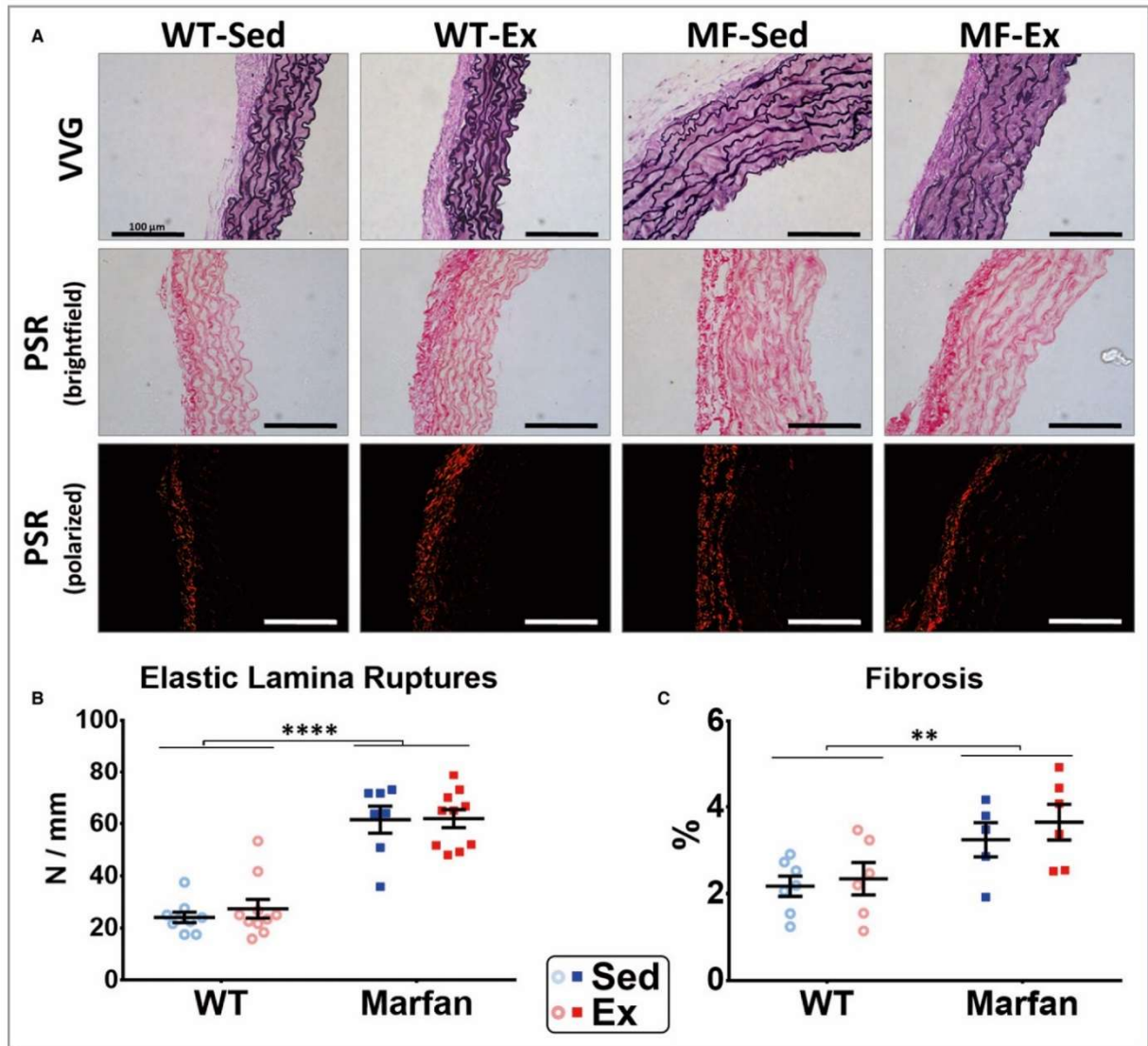
The most representative histological damage evaluated in MF mice is the rupture of elastic fibers in the tunica media of the ascending aorta. As expected, we observed a significant increase in the number of elastic lamina ruptures in MF mice, compared with WT animals (Figure 4A, upper panels and 4B for quantitative analysis). Remarkably, exercise did not increase lamina ruptures, indicating no additional structural damage in the tunica media of MF aorta.

Next, we examined the collagen content as a compensatory mechanism to the elastic fiber ruptures. In Sed mice, the tunica media had more collagen staining in MF than in WT animals (Figure 4A, middle and lower panels). As with elastic fibers,

## 2. Hipótesis y objetivos

Exercise in Marfan Syndrome Mas-Stachurska et al

ORIGINAL RESEARCH



**Figure 4.** Aorta histological analyses in sedentary and trained WT and MF mice. A, Representative images of elastic laminae (stained in black by Verhoeff-Van Gieson [VVG] staining, upper panel) and collagen content (stained by picrosirius red [PSR]), visualized under brightfield or polarized light in the middle and lower panels, respectively. B, Quantitative analysis of elastic laminae ruptures (n=9 for WT-Sed, n=7 for MF-Sed, n=10 for WT-Ex, n=10 for MF-Ex). Two-way ANOVA showed no interaction but a genotype (WT vs MF) effect was evident (\*\*\*\* $P<0.0001$ ). C, Quantitative analysis of fibrosis (n=7 for WT-Sed, n=5 for MF-Sed, n=6 for WT-Ex, n=6 for MF-Ex). Two-way ANOVA showed no interaction but a genotype effect was clear (\*\* $P<0.01$ ). Bars = 100  $\mu$ m. Ex indicates trained group; MF, Marfan; Sed, sedentary group; WT, wild-type. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.

dynamic exercise did not have any impact on these differences between WT and MF mice (Figure 4C, quantitative results).

### Exercise Improves Marfan-Associated Cardiac Hypertrophy

The potential impact of moderate exercise on the heart was also examined, with LV dilation and hypertrophy observed at

baseline in MF mice (Table 1). After the 5-month training protocol, LV hypertrophy evaluated by echocardiography significantly regressed in MF-Ex mice, as shown by decreased anterior wall and posterior wall diameters (Table 2). A nonsignificant decrease in LVDD and LVSD was also observed.

PSS is attributed to differential loading or contractility in neighboring segments and, when perfusion is normal,

**Table 1.** Echocardiographic Measurements of LV Structural and Functional Parameters in All Groups at 4 Months (Before Training)

	Wild Type (n=21)	Marfan (n=17)
AW, mm*	0.59±0.02	0.65±0.01
LVEDD, mm*	3.75±0.08	3.98±0.07
PW, mm*	0.57±0.02	0.63±0.02
LVESD, mm	2.54±0.08	2.76±0.06
LVEF, %	69±2	67±1

AW indicates anterior wall; LV, left ventricle; LVEDD, left ventricle end-diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESD, left ventricle end-systolic diameter; PW, posterior wall.

\* $P<0.05$ , wild-type vs Marfan.

predominantly reflects pressure overload. More specifically, it occurs when there is an imbalance between local (pressure-induced) wall-stress, contractility, and tissue structural properties.<sup>16</sup> PSS was more common in MF than in WT mice at 4 months (14/17 [82%] versus 7/21 [33%], respectively;  $P<0.01$ ). While the presence of PSS remained unaltered (71%) at the 9-month time-point in MF-Sed mice, it showed a decreasing trend in MF-Ex mice (PSS 40%,  $P=0.12$ , McNemar test) (Figure 5).

As with aortae, LV changes were histologically assessed from collagen content. An evident increase in collagen deposition was observed in 9-month-old MF-Sed mice. Moderate training did not modify LV fibrosis in either the WT-Ex or MF-Ex groups (Figure 6A).

In the heart, vascular remodeling was also studied in small arteries in the LV (Figure 6B). A prominent vascular remodeling in MF mice included a narrow lumen as well as thickening and increased perivascular fibrosis (Figure 6B). Again, moderate regular exercise showed no effect.

**Table 2.** Echocardiographic Measurements of LV Structural and Functional Parameters in All Groups at the 9-Month Time Point

	Wild Type		Marfan	
	Sedentary	Trained	Sedentary	Trained
LVEDD, mm <sup>†</sup>	3.89±0.1	3.79±0.04	4.24±0.19	4.04±0.08
LVESD, mm*	2.65±0.06	2.61±0.07	2.95±0.18	2.73±0.1
AW, mm <sup>†</sup>	0.66±0.02	0.64±0.01	0.72±0.02	0.69±0.02 <sup>‡</sup>
PW, mm*	0.65±0.02	0.63±0.01	0.73±0.03	0.68±0.02 <sup>‡</sup>
LVEF, %	67±1	67±2	66±3	69±3

AW indicates anterior wall; LVEDD, left ventricle end-diastolic diameter; LV, left ventricular; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESD, left ventricle end-systolic diameter; PW, posterior wall; WT, wild-type.

\* $P<0.05$ , <sup>†</sup> $P<0.01$  WT vs Marfan.

<sup>‡</sup> $P<0.05$  vs genotype-matched sedentary group.

### Effects of Exercise on Marfan-Associated Cardiovascular Remodeling Are Independent of Sex

We explored potential sex-related impacts of MF- or exercise-promoted cardiovascular remodeling. The most representative findings are shown in Figures S7 through S9. At baseline (4 months), echocardiography experiments showed that aortic dilatation and LV hypertrophy were similar in male and female MF mice (Figure S7). At the end of the experimental protocol (9 months), the protective effect of moderate exercise on aortic dilation and LV hypertrophy, both examined by echocardiography, were similar in male and female mice (Figure S8). Exploratory analyses in histology experiments suggested that LV fibrosis was reduced in trained female, but not male mice in comparison to their Sed littermates (Figure S9).

### Discussion

We evaluated the effects of exercise in the MF phenotype, particularly focusing on cardiovascular remodeling. In a murine MF model, moderate exercise (1) mitigated aortic dilation, (2) did not increase aortic elastic fiber ruptures and collagen deposition, and (3) partially reversed MF-associated cardiac hypertrophy. Overall, our results suggest positive effects of moderate exercise in cardiovascular manifestations of MF.

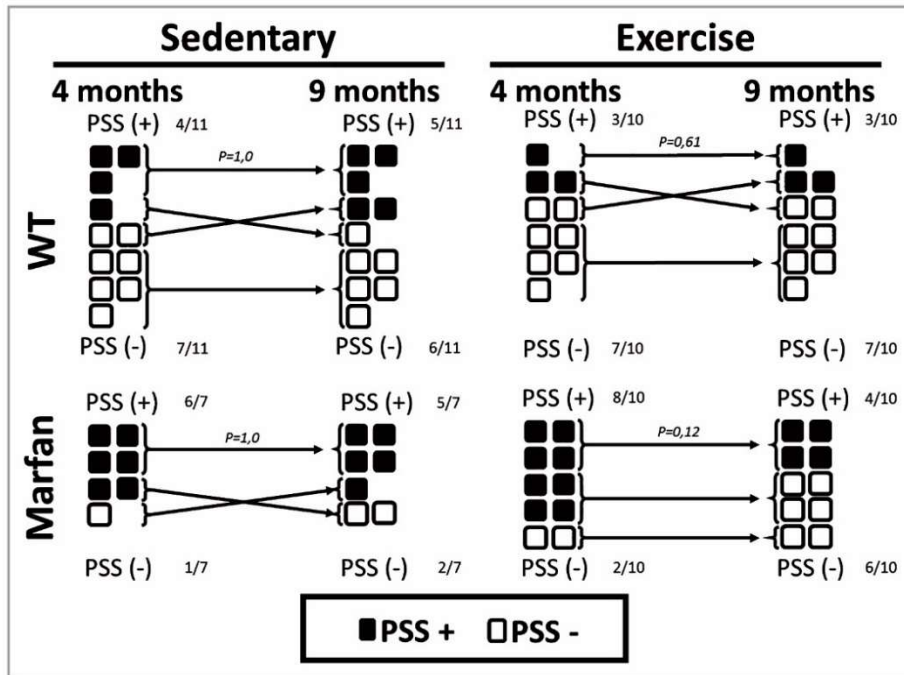
### Exercise and the Aortic Root in MF

Aortic root dilation is a hallmark of the cardiovascular phenotype of MF and a main determinant of premature mortality and morbidity. The degree of aortic dilation closely correlates with the risk of aortic dissection.<sup>17</sup> Factors such as an increased central pulse pressure,<sup>18</sup> obstructive sleep apnea,<sup>19</sup> or genetic predisposition based on polymorphisms in genes other than *FBN1*<sup>20</sup> have been proposed to influence aortic dilation rate in MF. A repetitive, pulsatile increase in aortic stretch during each exercise bout has been claimed to trigger accelerated aortic dilation.<sup>11,12</sup>

Contrary to this hypothesis, we showed that regular, moderate exercise does not accelerate aortic dilation rate, but rather normalizes its progression to values comparable to WT animals. Note that the aortic root was only assessed at baseline and at the end of the experimental protocol. Echocardiographic improvement was not accompanied by a restoration of the histological integrity of elastic fibers. Whereas histological and echocardiographic measurements usually present with parallel improvements, we found a clear blunt in aortic dilation in the absence of overt changes in elastic lamina fractures. It is possible that modest



## 2. Hipótesis y objetivos



**Figure 5.** Cardiac hemodynamic overload (postsystolic shortening [PSS]) in sedentary and trained WT and MF mice. Number of mice with and without PSS for all groups and all time-points. Analysis done with McNemar test. MF indicates Marfan; WT, wild-type.

improvements such as the one in our work may present with nonevident histological changes. In fact, we cannot rule out the possibility that improvements in microstructural ruptures in MF-Ex mice could precede evident elastic fiber repair evaluated by regular histological approaches. Such microstructural improvements in elastic fibers might have a positive physiological impact, which can be resolved by echocardiography. Indeed, elastic abnormalities might be present in advance of evident aortic dilation,<sup>21,22</sup> and alterations in elastic fiber integrity are present in the nondilated portion of the thoracic aorta,<sup>23</sup> thereby suggesting a mismatch between aorta size and elastic properties. Moreover, other factors such as fibronectin synthesis,<sup>24</sup> or endothelial<sup>25</sup> and smooth muscle cell dysfunction,<sup>26</sup> may also significantly contribute to progressive aortic dilation.

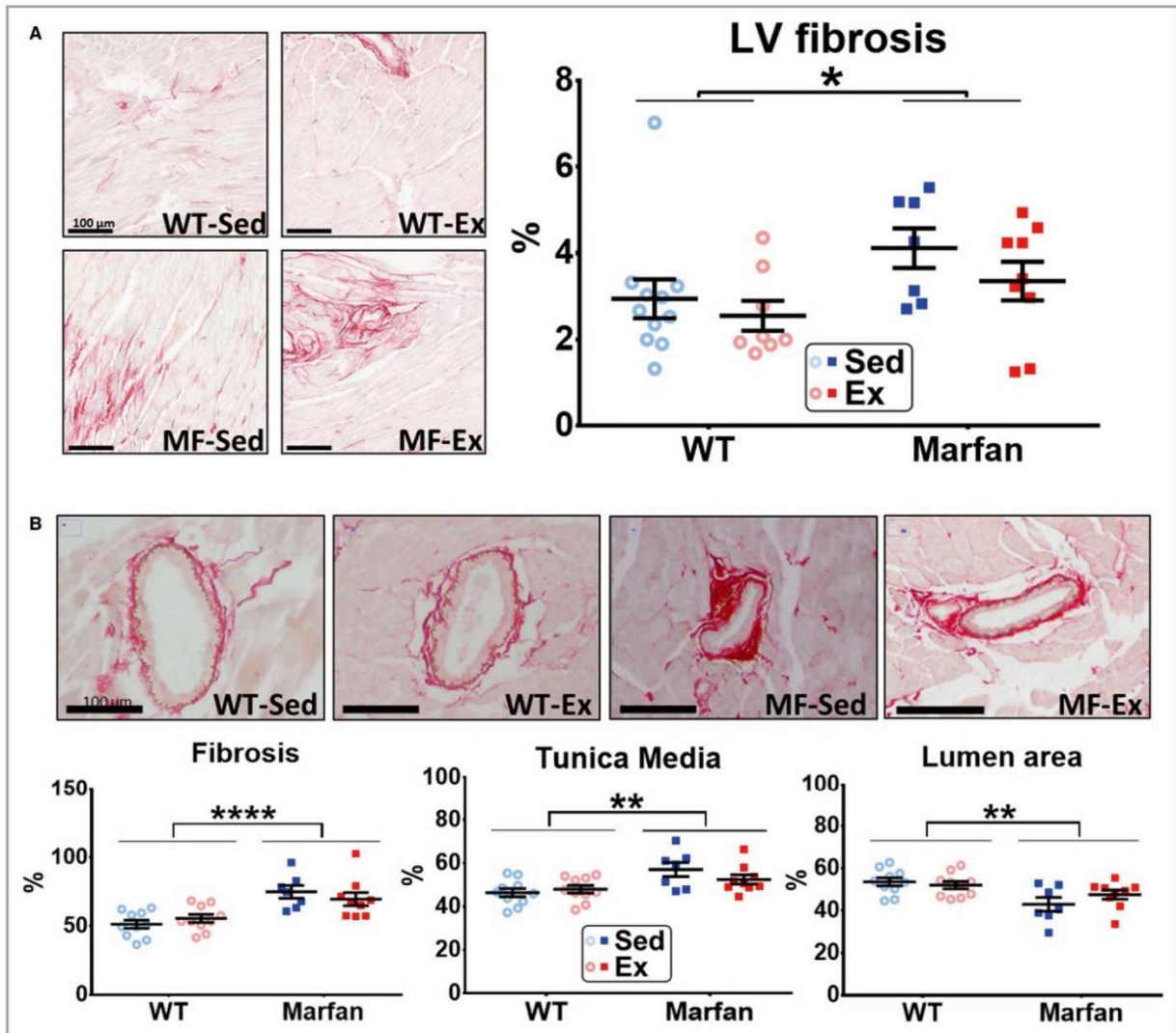
The subjacent mechanism(s) behind the reduction of aortic size in exercised Marfan mice is unknown. Of note, a recent work has suggested that inducible nitric oxide synthase (iNOS) upregulation is involved in Marfan aortic dilation.<sup>27</sup> Interestingly, exercise has been shown to reduce iNOS expression in settings in which iNOS is heavily induced (eg, in obesity<sup>28</sup> and diabetes mellitus<sup>29</sup>). On the other hand, to date most therapeutic approaches for Marfan syndrome target BP, but BP was not reduced in our model. Similarly,

iNOS blockade normalized aortic size in MF mice while increasing BP.<sup>27</sup> Altogether, these results point to iNOS downregulation as an attractive potential mediator of exercise-associated benefits in MF.

### Exercise and Marfan-Associated Cardiomyopathy

The most frequent and well-known cardiac manifestation of MF is mitral valve prolapse.<sup>5</sup> If severe, mitral prolapse and regurgitation may evolve as progressive LV dilation and dysfunction and, eventually, heart failure. Nevertheless, recent data support the existence of a primary myocardial affection in MF patients even in the presence of competent valves.<sup>6,7,30</sup> Structural abnormalities in the MF cardiomyopathy include LV hypertrophy and, in some series, dilation; these may be accompanied by variable degrees of systolic dysfunction, which occasionally remains subclinical and only detectable through deformation analysis.<sup>31</sup> Currently, it is unclear whether this cardiomyopathy is associated with worse clinical outcomes.

Our findings in this animal model of MF concur with most of these cardiac manifestations. We show increased collagen deposition in the LV myocardium of MF mice. A similar trend was previously reported in the same mouse strain, but failed



**Figure 6.** Histological analysis of the left ventricle in sedentary and trained WT and MF mice. A, Representative picosirius red-stained myocardial samples of all groups (left panel) and their respective quantitative analysis (right panel);  $n=11$  for WT-Sed,  $n=7$  for MF-Sed,  $n=8$  for WT-Ex,  $n=9$  for MF-Ex. B, Histological evaluation of intramyocardial vessels (upper panel) and quantitation of the perivascular fibrosis, tunica media thickness, and lumen area ( $n=10$  for WT-Sed,  $n=7$  for MF-Sed,  $n=10$  for WT-Ex,  $n=9$  for MF-Ex). Two-way ANOVA (all measurements) showed no significant interaction, but a genotype (WT vs MF) was found for all analyses. Bars are  $100\ \mu\text{m}$ .  $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ;  $***P<0.0001$ . Ex indicates trained group; LV, left ventricular; MF, Marfan; Sed, sedentary group; WT, wild-type. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.

to reach significance, likely because of the limited sample size and large intrinsic variability.<sup>30</sup> The clinical and physiological significance of such fibrosis is unknown, but could contribute to some characteristics of MF cardiomyopathy. It is possible that both myocardial fibrosis and hypertrophy underlie the diastolic dysfunction observed in patients with MF.<sup>32</sup> Moreover, fibrosis is a hallmark of cardiac arrhythmogenesis and likely contributes to the increased burden of ventricular arrhythmias in these patients.<sup>33</sup>

Our results indicate a positive impact of moderate exercise on MF cardiomyopathy as evidenced by an antihypertrophic effect and the absence of deleterious effects on LV myocardial fibrosis (Table 2). This is consistent with the role of physical activity in other cardiac conditions reported in human and animal models. Moderate exercise improves cardiac remodeling in hypertensive patients<sup>34</sup> and blunts cardiac hypertrophy and fibrosis in a hypertrophic cardiomyopathy mouse model.<sup>35</sup>

## 2. Hipótesis y objetivos

### Clinical Implications

Whereas moderate aerobic physical activity in healthy individuals and in patients with some cardiovascular disorders is largely acknowledged,<sup>9</sup> MF patients are usually excluded or largely limited from obtaining these positive effects by current recommendations. Moderate-to-strenuous dynamic exercise is prohibited for these patients and only low-dynamic sports such as bowling, golf, and archery are allowed.<sup>12</sup> Nevertheless, this recommendation (level of evidence C) lacks clinical or experimental supporting data.<sup>12</sup>

Our results suggest not only that moderate physical activity may be safe, but that it might prove beneficial in MF patients by decelerating the aortic dilation rate and improving signs of cardiac hemodynamic overload. If our results were reproduced in humans, physical activity of moderate intensity should not only be allowed, but encouraged in patients with MF. This idea is supported by a case report showing that a cardiovascular physical therapy program reversed LV dilatation and hypertrophy in a patient with MF.<sup>36</sup>

It is important to note that the present results reflect changes promoted by light or moderate endurance training. More intense forms of physical activity or other sorts of exercise may yield opposite results. Current evidence suggests that a U-shaped relationship between exercise and outcomes exists for outcomes such as atrial fibrillation, ventricular arrhythmias, or even atherosclerosis.<sup>37</sup> Under this hypothesis, low doses of physical activity should yield beneficial effects, but might turn deleterious at strenuous doses in healthy individuals.<sup>38</sup> A U-shaped relationship has also been found in inherited cardiomyopathies. Competitive exercise accelerates the progression of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy,<sup>39</sup> although moderate exercise was shown to be safe.<sup>40</sup> Further research is needed to explore the potential benefits of encouraging light or moderate physical activity in patients with MF.

### Limitations

First, the *Fbn1*<sup>C1039G/+</sup> mouse strain presents a low risk of aortic dissection and relatively long lifespan. During the 5-month experimental period, only 2 of 22 MF mice died, neither of them in the MF-Ex group. Whether our results would similarly apply to individuals at high risk remains unknown. Second, the translation of results obtained in mouse models to human beings, and interpretation of the exercise intensity in human terms, warrants caution. Reported data suggest that our study assessed moderate exercise intensity.<sup>41</sup> Moreover, the lack of a clear phenotype for athlete's heart, including LV hypertrophy and dilation parameters, further supports the characterization of the exercise as moderate. Third, a rigorous measurement of aortic root stiffness requires invasive blood pressure recordings. We measured the noninvasive blood

pressure (tail-cuff) to estimate aortic stiffness, but it remains controversial whether this method provides a robust estimation of central BP in mice. Last, valve regurgitation, either mitral or aortic, is a frequent clinical observation in MF patients, but they were not assessed in our mice. It is therefore possible that they could modify the effect of exercise in the cardiovascular phenotype of MF. Nevertheless, we could not envisage any clustered response to exercise for aortic dilation, fibrosis, or any of the echocardiographic parameters, thereby suggesting a similar phenotypic response in all animals.

### Conclusions

In a murine model of MF, moderate dynamic exercise prevented aortic root dilation and mitigates cardiac hypertrophy. Our data invite validation in other animal models of MF and eventually in patients.

### Acknowledgments

The authors thank Laura Barberà and Nadia Castillo for excellent technical assistance.

### Sources of Funding

This work was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI13/01580, PI16/00703); Sociedad Española de Cardiología; National Marfan Foundation; Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2015-64136R, SAF2017-83039-R, TIN2014-52923-R); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2014SGR334); CERCA Programme/Generalitat de Catalunya and Centro de Investigación Biomédica en RED (CIBERCV 16/11/00354).

### Disclosures

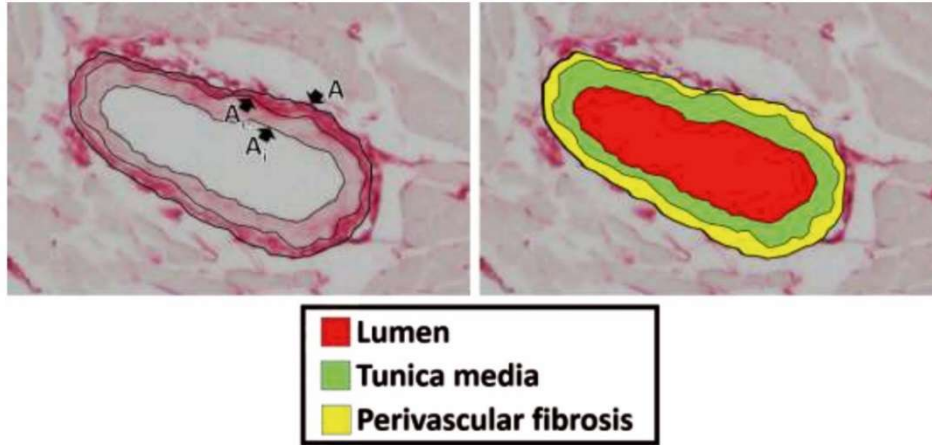
None.

### References

1. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991;352:337–339.
2. Doyle JJ, Gerber EE, Dietz HC. Matrix-dependent perturbation of TGFβ signaling and disease. *FEBS Lett*. 2012;586:2003–2015.
3. Perrucci GL, Rurali E, Gowran A, Pini A, Antona C, Chiesa R, Pompilio G, Nigro P. Vascular smooth muscle cells in Marfan syndrome aneurysm: the broken bricks in the aortic wall. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:267–277.
4. Singh MN, Lacro RV. Recent clinical drug trials evidence in Marfan syndrome and clinical implications. *Can J Cardiol*. 2015;32:66–77.
5. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, Bersin RM, Carr VF, Casey DE, Eagle KA, Hermann LK, Isselbacher EM, Kazerooni EA, Kouchoukos NT, Lytle BW,

- Milewicz DM, Reich DL, Sen S, Shinn JA, Svensson LG, Williams DM; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, Society for Vascular Medicine. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. *Circulation*. 2010;121:e266–e369.
6. Campens L, Renard M, Trachet B, Segers P, Muino Mosquera L, De Sutter J, Sakai L, De Paepe A, De Backer J. Intrinsic cardiomyopathy in Marfan syndrome: results from in-vivo and ex-vivo studies of the Fbn1C1039G/+ model and longitudinal findings in humans. *Pediatr Res*. 2015;78:256–263.
  7. Cook JR, Carta L, Bénard L, Chemaly ER, Chiu E, Rao SK, Hampton TG, Yurchenco P; GenTAC Registry Consortium, Costa KD, Hajjar RJ, Ramirez F. Abnormal muscle mechanosignaling triggers cardiomyopathy in mice with Marfan syndrome. *J Clin Invest*. 2014;124:1329–1339.
  8. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, ap Rhys CM, Holm TM, Loeyes BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med*. 2007;13:204–210.
  9. Schuler G, Adams V, Goto Y. Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J*. 2013;34:1790–1799.
  10. Volianitis S, Secher NH. Cardiovascular control during whole body exercise. *J Appl Physiol*. 2016;121:376–390.
  11. Iskandar A, Thompson PD. A meta-analysis of aortic root size in elite athletes. *Circulation*. 2013;127:791–798.
  12. Braverman AC, Harris KM, Kovacs RJ, Maron BJ. Eligibility and disqualification recommendations for competitive athletes with cardiovascular abnormalities: Task Force 7: aortic diseases, including Marfan syndrome: a scientific statement from the American Heart Association and American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:2398–2405.
  13. Cheng A, Owens D. Marfan syndrome, inherited aortopathies and exercise: what is the right answer? *Heart*. 2015;101:752–757.
  14. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:172–181.
  15. Hirata K, Triposkiadis F, Sparks E, Bowen J, Wooley CF, Boudoulas H. The Marfan syndrome: abnormal aortic elastic properties. *J Am Coll Cardiol*. 1991;18:57–63.
  16. Claus P, Weidemann F, Dommke C, Bitó V, Heinzel FR, D'hooge J, Sipido KR, Sutherland GR, Bijns B. Mechanisms of postsystolic thickening in ischemic myocardium: mathematical modelling and comparison with experimental ischemic substrates. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33:1963–1970.
  17. Kim EK, Choi SH, Sung K, Kim WS, Choe YH, Oh JK, Kim D-K. Aortic diameter predicts acute type A aortic dissection in patients with Marfan syndrome but not in patients without Marfan syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147:1505–1510.
  18. Jondeau G, Boutouyrie P, Lacombe P, Laloux B, Dubourg O, Bourdarias JP, Laurent S. Central pulse pressure is a major determinant of ascending aorta dilation in Marfan syndrome. *Circulation*. 1999;99:2677–2681.
  19. Kohler M, Blair E, Risby P, Nickol AH, Wordsworth P, Forfar C, Stradling JR. The prevalence of obstructive sleep apnoea and its association with aortic dilatation in Marfan's syndrome. *Thorax*. 2009;64:162–166.
  20. Benke K, Agg B, Matyas G, Szokolai V, Harsanyi G, Szilveszter B, Odler B, Polos M, Maurovich-Horvat P, Radovits T, Merkely B, Nagy ZB, Szabolcs Z. Gene polymorphisms as risk factors for predicting the cardiovascular manifestations in Marfan syndrome. Role of folic acid metabolism enzyme gene polymorphisms in Marfan syndrome. *Thromb Haemost*. 2015;114:748–756.
  21. Akazawa Y, Motoki N, Tada A, Yamazaki S, Hachiya A, Matsuzaki S, Kamiya M, Nakamura T, Kosho T, Inaba Y. Decreased aortic elasticity in children with Marfan syndrome or Loey's-Dietz syndrome. *Circ J*. 2016;80:2369–2375.
  22. Groenink M, de Roos A, Mulder BJ, Verbeeten B, Timmermans J, Zwinderman AH, Spaan JA, van der Wall EE. Biophysical properties of the normal-sized aorta in patients with Marfan syndrome: evaluation with MR flow mapping. *Radiology*. 2001;219:535–540.
  23. Chung AWY, Au Yeung K, Sandor GGS, Judge DP, Dietz HC, Van Breemen C. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res*. 2007;101:512–522.
  24. Sabatier L, Chen D, Fagotto-Kaufmann C, Hubmacher D, McKee MD, Annis DS, Mosher DF, Reinhardt DP. Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol Biol Cell*. 2009;20:846–858.
  25. Sytyng HT, Chung AWY, Yang HHC, Van Breemen C. Dysfunction of endothelial and smooth muscle cells in small arteries of a mouse model of Marfan syndrome. *Br J Pharmacol*. 2009;158:1597–1608.
  26. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res*. 2001;88:37–43.
  27. Oller J, Méndez-Barbero N, Ruiz EJ, Villahoz S, Renard M, Canelas LI, Briones AM, Alberca R, Lozano-Vidal N, Hurlé MA, Milewicz D, Evangelista A, Salaices M, Nistal JF, Jiménez-Borreguero LJ, De Backer J, Campanero MR, Redondo JM. Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adams1 and in a mouse model of Marfan syndrome. *Nat Med*. 2017;23:200–212.
  28. Silva JF, Correa IC, Diniz TF, Lima PM, Santos RL, Cortes SF, Coimbra CC, Lemos VS. Obesity, inflammation, and exercise training: relative contribution of eNOS and iNOS in the modulation of vascular function in the mouse aorta. *Front Physiol*. 2016;7:1–13.
  29. Kleindienst A, Battault S, Belaidi E, Tanguy S, Rosselin M, Boulghobra D, Meyer G, Gayraud S, Walther G, Geny B, Durand G, Cazorla O, Reboul C. Exercise does not activate the  $\beta_3$  adrenergic receptor-eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res Cardiol*. 2016;111:40.
  30. Tae H-J, Petrashevskaya N, Marshall S, Krawczyk M, Talan M. Cardiac remodeling in the mouse model of Marfan syndrome develops into two distinctive phenotypes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310:H290–H299.
  31. Kiotseoglou A, Saha S, Mogridge JC, Kapetanakis V, Govindan M, Alpendurada F, Mullen MJ, Nassiri DK, Camm J, Sutherland GR, Bijns BH, Child A. Impaired biventricular deformation in Marfan syndrome: a strain and strain rate study in adult unoperated patients. *Echocardiography*. 2011;28:416–430.
  32. De Backer JF, Devos D, Segers P, Matthys D, François K, Gillebert TC, De Paepe AM, De Sutter J. Primary impairment of left ventricular function in Marfan syndrome. *Int J Cardiol*. 2006;112:353–358.
  33. Savolainen A, Kupari M, Toivonen L, Kaitila I, Viitasalo M. Abnormal ambulatory electrocardiographic findings in patients with the Marfan syndrome. *J Intern Med*. 1997;241:221–226.
  34. Kokkinos PF, Narayan P, Collier JA, Pittaras A, Notargiacomo A, Reda D, Papademetriou V. Effects of regular exercise on blood pressure and left ventricular hypertrophy in African-American men with severe hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333:1462–1467.
  35. Konhilas JP, Watson PA, Maass A, Boucek DM, Horn T, Stauffer BL, Luckey SW, Rosenberg P, Leinwand LA. Exercise can prevent and reverse the severity of hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2006;98:540–548.
  36. Medeiros WM, Peres PA, Carvalho AC, Gun C, De Luca FA. Effect of a physical exercise program in a patient with Marfan syndrome and ventricular dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2012;98:e70–e73.
  37. Guasch E, Mont L. Diagnosis, pathophysiology, and management of exercise-induced arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14:88–101.
  38. Calvo N, Ramos P, Montserrat S, Guasch E, Coll-Vinent B, Domenech M, Bisbal F, Hevia S, Vidorreta S, Borrás R, Falces C, Embid C, Montserrat JM, Berrueto A, Coca A, Sitges M, Brugada J, Mont L. Emerging risk factors and the dose-response relationship between physical activity and lone atrial fibrillation: a prospective case-control study. *Europace*. 2016;18:57–63.
  39. James CA, Bhonsale A, Tichnell C, Murray B, Russell SD, Tandri H, Tedford RJ, Judge DP, Calkins H. Exercise increases age-related penetrance and arrhythmic risk in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:1290–1297.
  40. Sawant AC, Te Riele ASJM, Tichnell C, Murray B, Bhonsale A, Tandri H, Judge DP, Calkins H, James CA. Safety of American Heart Association-recommended minimum exercise for desmosomal mutation carriers. *Heart Rhythm*. 2016;13:199–207.
  41. Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub> max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1301–H1310.

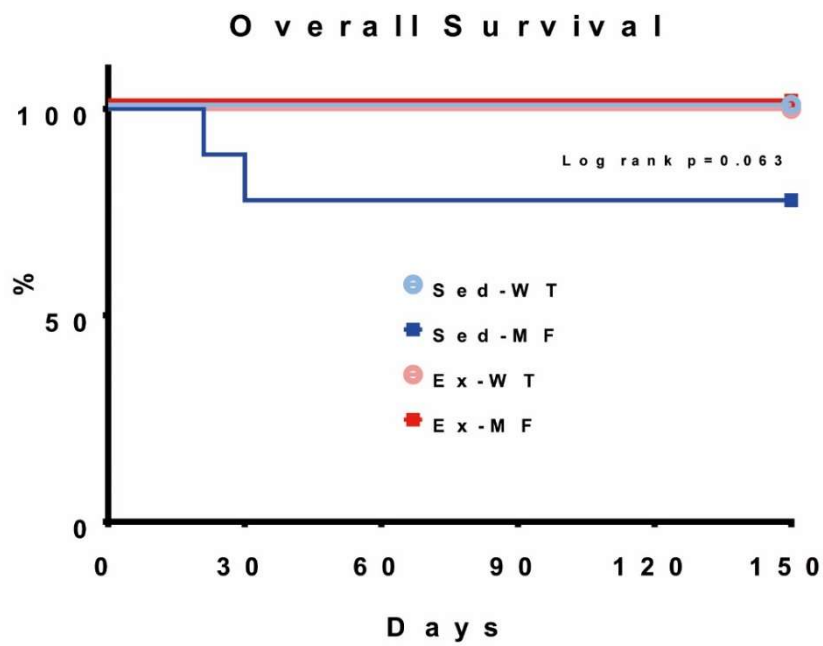
## **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

**Figure S1.** Intramyocardial artery assessment.

First, the perivascular area (**A**, limited by perivascular fibrosis), the external area (**Ae**, limited by outer tunica adventitia) and internal area (**Ai**, limited by internal elastic lamina) were identified and limits traced (left panel). Thereafter, the area within each of these limits was automatically quantified. Perivascular fibrosis was then calculated as  $A - Ae$  (yellow area in the right panel); tunica media area was calculated as  $Ae - Ai$  (green area in the right panel); and luminal area was identified as  $Ai$  (red area in the right panel).

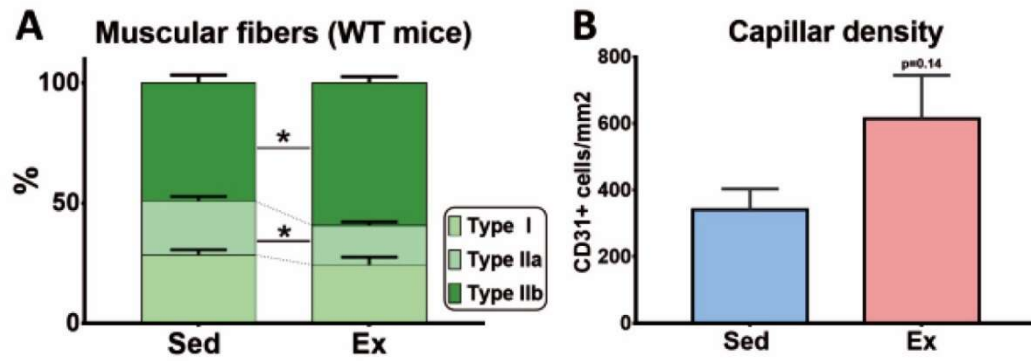
## 2. Hipótesis y objetivos

**Figure S2.** Survival rate during the experimental protocol in all groups.



Analysis with Log-rank test. WT: wild-type; MF: Marfan; Sed: sedentary group; Ex: trained group.

Figure S3. *Vastus medialis* adaptation after training.

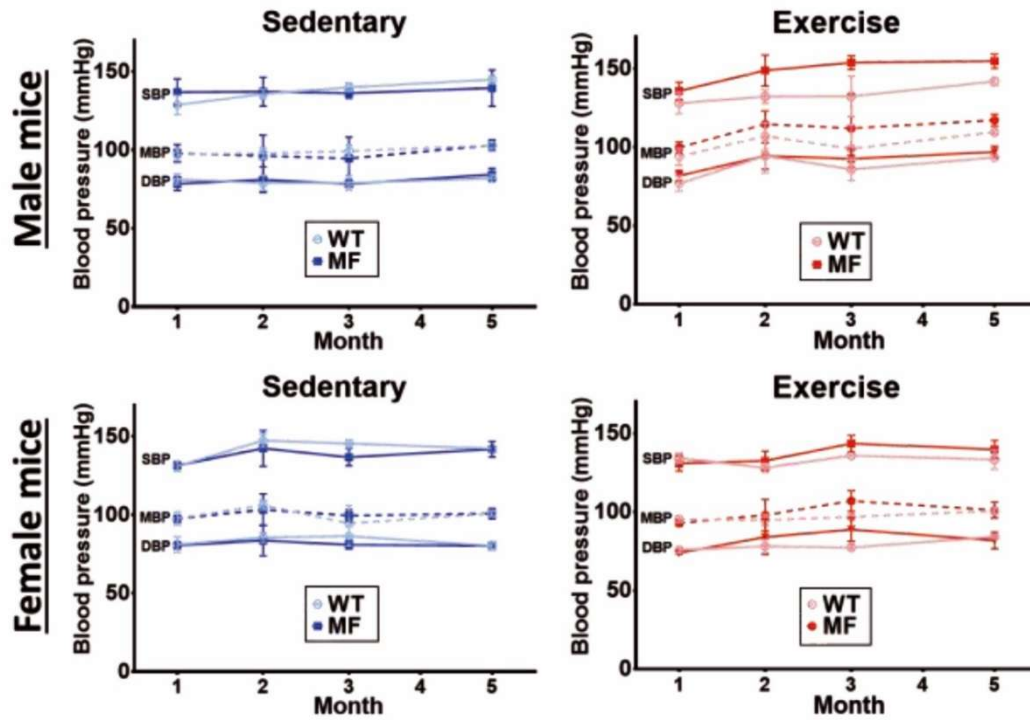


(A) Proportion of muscular fibers according to its oxidative status (n=9 per group). (B) Capillar density evaluated in CD31 immunohistochemistry stained samples (n=6 per group). \*p<0.05 Sed vs Ex. WT: wild-type; Sed: sedentary group; Ex: trained group.



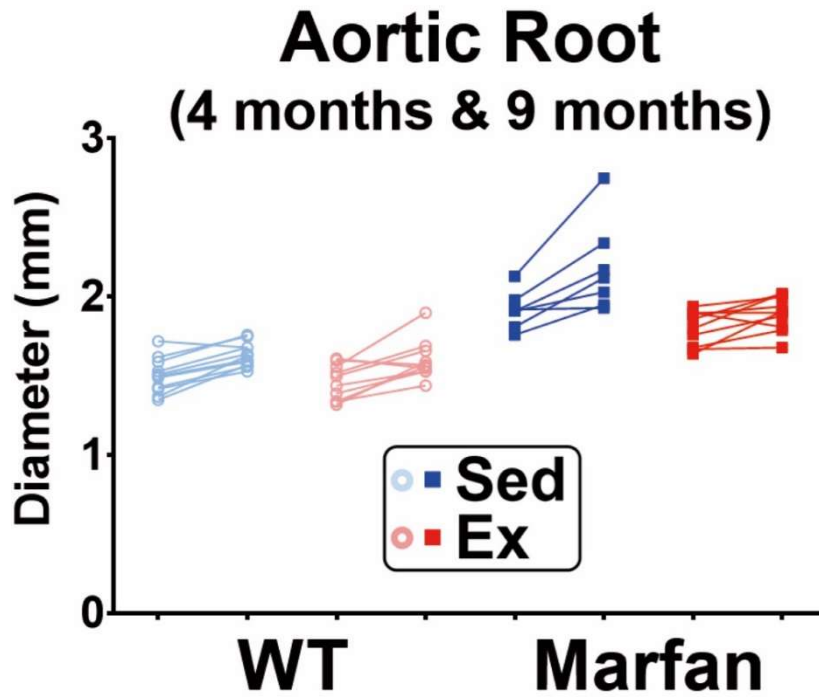
## 2. Hipótesis y objetivos

**Figure S4.** Blood pressure measurement in all groups according to sex (for male animals: n=5 for all WT-Sed, MF-Sed, MF-Sed and MF-Ex; for female animals: n= 6 for WT-Sed; n=4 for MF-Sed; n=5 for WT-Ex; n=5 for MF-Ex).



WT: wild-type; MF: Marfan.

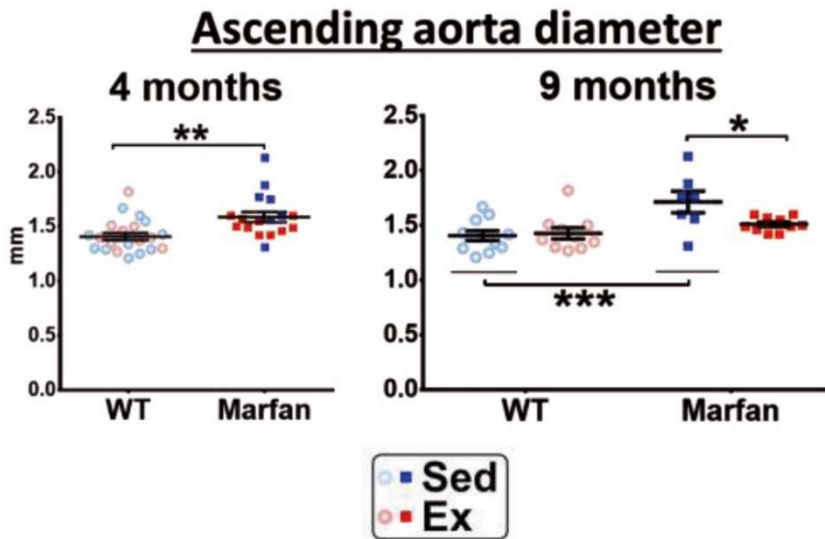
**Figure S5.** Changes of the aortic root size during the experimental protocol examined for each mouse (at 4 months and at 9 months; n=11 for WT-Sed, n=10 for WT-Ex, n=7 for MF-Sed, n=10 for MF-Ex).



Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice. WT: wild-type; MF: Marfan; Sed: sedentary group; Ex: trained group.

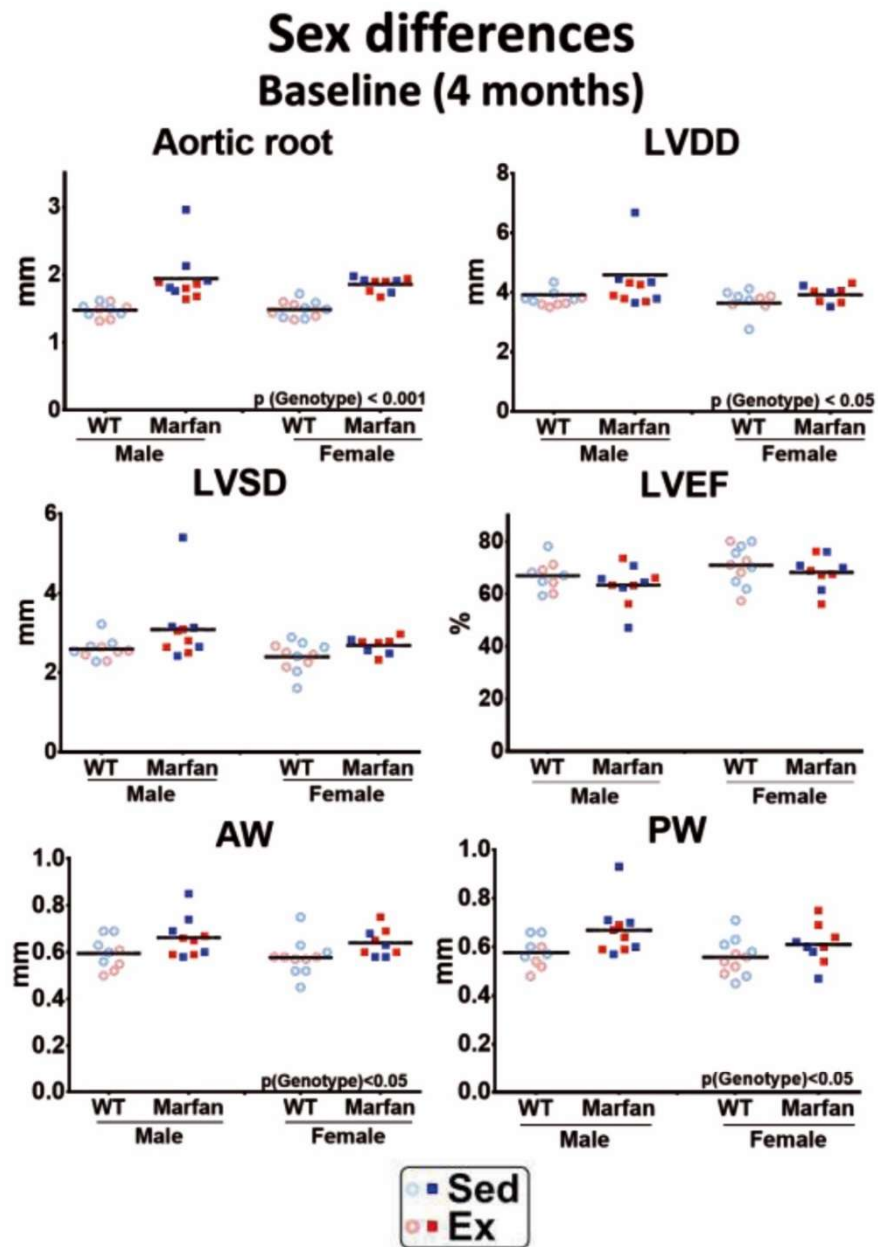
## 2. Hipótesis y objetivos

**Figure S6.** Measurements of the ascending aorta in all groups at the 4-month time-point (left panel; comparison with a *t*-test; n=21 for WT, n=17 for MF) and at the 9-month time-point (right panel; comparison with two-way ANOVA; significant interaction was found; n=11 for WT-Sed, n=7 for MF-Sed, n=10 for WT-Ex, n=10 for MF-Ex).



\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . WT: wild-type; MF: Marfan; Sed: sedentary group; Ex: trained group. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.

**Figure S7.** Echocardiographic results according to sex at the 4-month time point (for most measurements: male mice n=10 for both WT and MF; female mice; n=11 for WT, n=9 for MF).

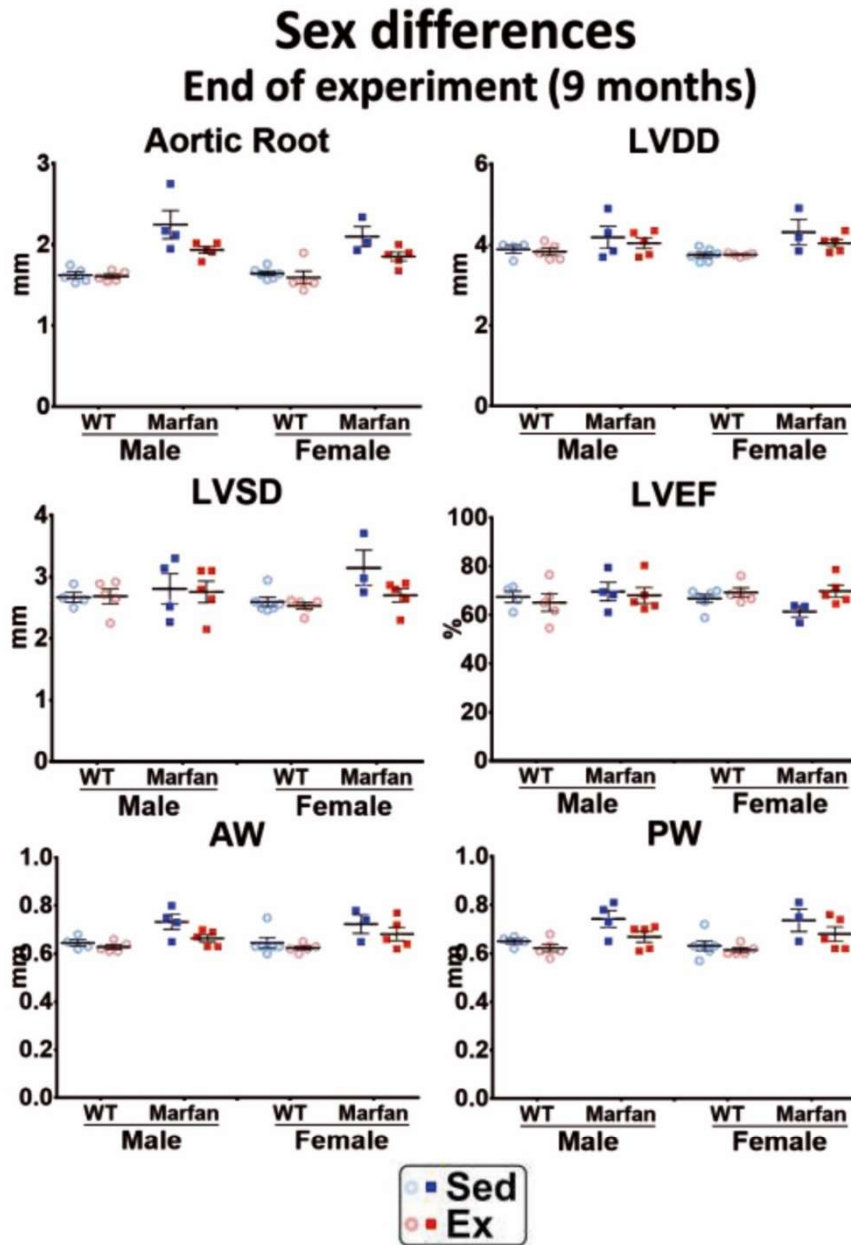


Comparisons were carried out with 2-way ANOVA (genotype [WT, MF], sex and genotype x sex). No significant interaction was found in any comparison. WT: wild-

## 2. Hipótesis y objetivos

type; MF: Marfan; Sed: sedentary group; Ex: trained group; LVEDD: left ventricle end-diastolic diameter; LVESD: left ventricle end-systolic diameter; AW: anterior wall; PW: posterior wall; LVEF: left ventricular ejection fraction. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.

**Figure S8.** Echocardiographic results according to sex at the 9-month time point (n=3-6 per group).

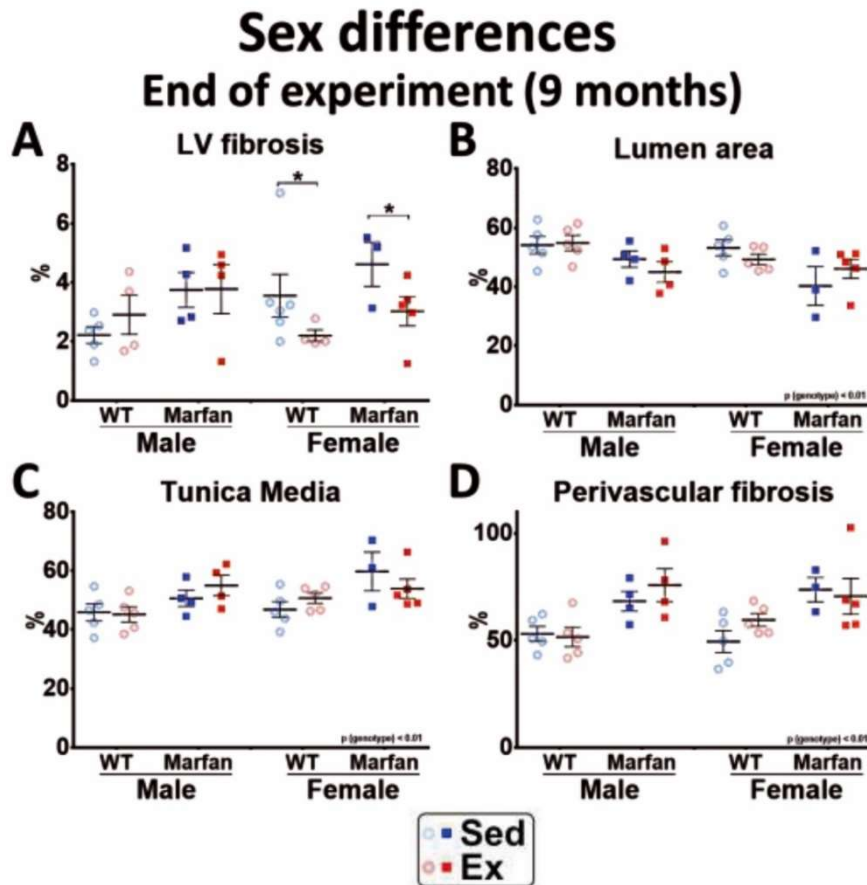


Comparisons were carried out with 2-way ANOVA (genotype [WT, MF], sex and genotype x sex). No significant interaction was found in any comparison. WT: wild-type; MF: Marfan; Sed: sedentary group; Ex: trained group; LVEDD: left ventricle end-

## 2. Hipótesis y objetivos

diastolic diameter; LVESD: left ventricle end-systolic diameter; AW: anterior wall; PW: posterior wall; LVEF: left ventricular ejection fraction. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.

Figure S9. Effects of sex on LV histological assessment (n=3-6 per group).



(A) LV fibrosis; (B) Lumen area of intramyocardial arteries; (C) Tunica media of intramyocardial arteries; (D) Perivascular fibrosis of intramyocardial arteries. Analyses performed with a three-way ANOVA. For panel A, a Sex x Group interaction was found ( $p=0.02$ ); pairwise comparisons (Sed vs Ex within each Sex) are shown. In panels B, C and D, no significant effect of sex or their interactions was found. \* $P<0.05$ . WT: wild-type; MF: Marfan; Sed: sedentary group; Ex: trained group; LVEDD: left ventricle end-diastolic diameter; LVESD: left ventricle end-systolic diameter; AW: anterior wall; PW: posterior wall; LVEF: left ventricular ejection fraction. Open circles represent WT mice, closed squares represent Marfan mice; blue symbols are sedentary mice, red symbols are trained mice.



## Journal of the American Heart Association

OPEN ACCESS 



### **Cardiovascular Benefits of Moderate Exercise Training in Marfan Syndrome: Insights From an Animal Model**

Aleksandra Mas-Stachurska, Anna-Maria Siegert, Monserrat Batlle, Darya Gorbenko del Blanco, Thayna Meirelles, Cira Rubies, Fabio Bonorino, Carla Serra-Peinado, Bart Bijmens, Julio Baudin, Marta Sitges, Lluís Mont, Eduard Guasch and Gustavo Egea

*J Am Heart Assoc.* 2017;6:e006438; originally published September 25, 2017;

doi: 10.1161/JAHA.117.006438

The *Journal of the American Heart Association* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231  
Online ISSN: 2047-9980

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jaha.ahajournals.org/content/6/9/e006438>

Subscriptions, Permissions, and Reprints: The *Journal of the American Heart Association* is an online only Open Access publication. Visit the Journal at <http://jaha.ahajournals.org> for more information.

### Artículo 3 (población C)

**Objetivo:**

4. Detectar diferencias de género en la presentación de engrosamiento postsistólico y los factores asociados al mismo como la tensión arterial y el tratamiento farmacológico.

**Mas-Stachurska A**, Bouma BJ, de Bruin-Bon R, Mulder B, Bijnens B, Sitges M. Remodelado cardiaco asociado con el síndrome de Marfan: impacto del sexo y el tratamiento vasodilatador. Rev Esp Cardiol. 2022. doi: 10.1016/j.recesp.2022.05.006.

Factor de impacto: 6,975. Cuartil: Q2. Área de conocimiento: Cardiology and Cardiovascular Medicine.

## Carta científica

**Remodelado cardiaco asociado con el síndrome de Marfan: impacto del sexo y el tratamiento vasodilatador****Cardiac remodeling in patients with Marfan syndrome: impact of gender and vasodilator therapy****Sr. Editor:**

El síndrome de Marfan (SM) tiene su causa en una mutación de la fibrilina-1, elemento de la aorta y regulador de la vía de señalización del factor de crecimiento transformador beta. La prescripción de fármacos pretende reducir los efectos de la fibrosis y la presión arterial (PA) y prevenir la disección aórtica. Datos recientes apoyan la existencia de una afección del miocardio en presencia de válvulas normofuncionantes. Se observa remodelado miocárdico patológico en forma de hipertrofia o dilatación, fibrosis y disfunción del ventrículo izquierdo. La disfunción sistólica ocasionalmente permanece subclínica y solo se detecta a través del análisis de la deformación miocárdica<sup>1</sup>. El engrosamiento postsistólico (EPS), que puede detectarse con ecocardiografía, se ha descrito en estados de sobrecarga de presión o isquemia miocárdica<sup>1</sup>. La alta prevalencia de EPS entre los pacientes con SM aun con PA dentro de la normalidad, descrita recientemente, indica que la miocardiopatía del SM expresa características similares a los estados de sobrecarga de presión<sup>2</sup>.

La escasa literatura existente sobre el impacto del sexo en la dilatación y los eventos aórticos en el SM presenta resultados aún controvertidos. Mientras algunos autores defienden bajar en 5 mm el punto de corte de dilatación aórtica para la indicación quirúrgica para las mujeres<sup>3</sup>, otros postulan que los varones tienen más riesgo de disección aórtica<sup>4,5</sup>.

En nuestro estudio se plantea una hipótesis acerca del impacto diferencial del sexo en la manifestación de los signos de miocardiopatía en el SM. Se han analizado las ecocardiografías de 45 sujetos jóvenes con SM para detectar posibles diferencias de sexo en la presentación de EPS y los factores asociados con este, como la PA y la medicación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital *Academisch Medisch Centrum* de Ámsterdam y los participantes concedieron el consentimiento informado. Todos fueron atendidos en una consulta monográfica de SM por un

cardiólogo y una enfermera especializados. La decisión del cardiólogo sobre la prescripción de la medicación vasodilatadora se tomaba de manera individualizada según la evolución de la PA de cada paciente. La comparación por sexos y por la presencia de EPS se muestra en la [tabla 1](#).

No se encontraron diferencias entre varones y mujeres (23 y 22 respectivamente) en cuanto a edad, dimensiones de la aorta o el ventrículo izquierdo, fracción de eyección del ventrículo izquierdo y PA sistólica y diastólica. En cambio, cuando se estudió la presencia de EPS, se encontró que 16 mujeres (73%) y 14 varones (61%) mostraban EPS. Tomaban la medicación 17 varones (74%) y 13 mujeres (59%;  $p = 0,292$ ). Esa diferencia del tratamiento farmacológico de los pacientes con SM se hace aún más evidente si se observa la diferencia entre los subgrupos de mujeres con SM y EPS+ y varones con SM y EPS+: ellas están significativamente menos medicadas (9 [56%] frente a 13 [93%];  $p = 0,039$ ) pese a que no hay diferencias significativas en dilatación aórtica y dimensiones ventriculares. Comprensiblemente, sus PA son aproximadamente 5 mmHg mayores (mujeres con SM y EPS+: PA sistólica,  $120,8 \pm 10$  mmHg y PA diastólica,  $75,8 \pm 8$  mmHg; varones con SM y EPS+: PA sistólica,  $117 \pm 15$  mmHg y PA diastólica,  $71 \pm 10$  mmHg;  $p = 0,4$  y  $p = 0,157$  respectivamente). Esa diferencia de la PA adquiere significación estadística a pesar de pequeño tamaño muestral si se compara a las mujeres con SM y EPS+ frente a las mujeres con SM sin EPS: PA diastólica de  $75,8 \pm 8$  frente a  $66,8 \pm 8$  mmHg ( $p = 0,049$ ) y PA sistólica  $120,8 \pm 10$  frente a  $114 \pm 9,7$  mmHg ( $p = 0,23$ ).

En nuestro grupo de sujetos con SM se reveló una alta prevalencia de EPS, mayor entre las mujeres, sin alcanzar significación estadística. Las pacientes afectas muestran mayor presencia de la deformación alterada que los varones con SM. Esta característica se asocia con que las mujeres reciben tratamiento con menos frecuencia a pesar de que los diámetros aórticos y ventriculares son muy similares entre ambos sexos. Es difícil explicar en el presente estudio por qué las mujeres con SM reciben menos tratamiento farmacológico. No obstante, esta diferencia tiene repercusión en su PA, pues la PA diastólica es más alta en las mujeres con EPS+ que en las que no presentan este signo.

En nuestra serie, las pacientes tienen menos probabilidad de ser tratadas y mayor remodelado del ventrículo izquierdo. Se debe estudiar los motivos de estas diferencias en futuras investigaciones

**Tabla 1**

Comparación de la presencia de engrosamiento postsistólico entre sexos

	Mujeres (n=22)	Varones (n=23)	p	Mujeres con EPS+, n=16 (73%)	Mujeres con EPS-, n=6 (27%)	p	Varones con EPS+, n=14 (61%)	Varones con EPS-, n=9 (39%)	p
Edad (años)	29 ± 7	28 ± 8	0,7	31,2 ± 6,6	23,9 ± 7,2	0,059	30,3 ± 7,8	25,3 ± 7,7	0,18
Raíz aórtica indexada (mm/m <sup>2</sup> )	20,6 ± 3	20,8 ± 2,8	0,83	20,5 ± 3,3	20,9 ± 2,5	0,59	21,1 ± 2,3	20,2 ± 3,5	0,56
DTDVI indexado (mm)	26,1 ± 3,4	25,3 ± 4	0,50	25,3 ± 3	28,3 ± 2,8	0,021	25,4 ± 4,7	25,2 ± 3,1	0,88
DTSVI indexado (mm)	16,3 ± 2,5	16,2 ± 3,7	0,87	15,6 ± 2,5	17,6 ± 2,2	0,11	16,4 ± 4	15,8 ± 3,3	0,98
FEVI (%)	62,6 ± 5	60,0 ± 5,4	0,09	61,9 ± 4	64,2 ± 7,1	0,49	59,2 ± 5,8	60,9 ± 4,9	0,40
PA sistólica (mmHg)	118,9 ± 10	118,4 ± 13	0,89	120,8 ± 10	114 ± 9,7	0,23	117 ± 15	120,9 ± 10	0,48
PA diastólica (mmHg)	73,4 ± 9	71,5 ± 9	0,51	75,8 ± 8,4	66,8 ± 8,4	0,049	71 ± 10	72,6 ± 8,5	0,69
Tratamiento, sí	13 (59)	17 (74)	0,29	9 (56)	4 (67)	1	13 (93)	4 (44)	0,018

DTDVI: diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DTSVI: diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; EPS: engrosamiento postsistólico; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; PA: presión arterial; tratamiento: fármacos del grupo de bloqueadores beta o losartán.

Significación si  $p < 0,05$ . Las variables continuas se muestran en números absolutos y se han analizado con el la prueba de la t de Student para muestras independientes y se expresan en media ± desviación estándar. La variable categórica (tratamiento, sí) se ha analizado con un test de la  $\chi^2$  y se expresan como n (%).

<https://doi.org/10.1016/j.recesp.2022.05.006>

0300-8932/© 2022 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Mas-Stachurska A, et al. Remodelado cardiaco asociado con el síndrome de Marfan: impacto del sexo y el tratamiento vasodilatador. *Rev Esp Cardiol.* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2022.05.006>

y debería hacerse un esfuerzo común en mejorar las tasas de tratamiento de estas pacientes.

#### FINANCIACIÓN

No ha habido financiación para la realización de la investigación o la preparación del artículo.

#### CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

A. Mas-Stachurska ha contribuido a la concepción y el diseño, la adquisición, el análisis y la interpretación de los datos; redactó el manuscrito y accede a asumir responsabilidades sobre todos los aspectos del artículo y a investigar y resolver cualquier cuestión relacionada con la exactitud y la veracidad de cualquier parte del trabajo.

R. de Bruin, B.J. Bouma, B. Mulder y B. Bijmens han contribuido sustancialmente a la concepción, el diseño, la adquisición, el análisis y la interpretación de los datos y han hecho una revisión crítica de su contenido.

M. Sitges ha contribuido sustancialmente a la concepción y el diseño, su análisis e interpretación y la redacción del artículo y ha hecho una revisión crítica de su contenido intelectual, así como accede a asumir responsabilidades sobre todos los aspectos del artículo y a investigar y resolver cualquier cuestión relacionada con la exactitud y la veracidad de cualquier parte del trabajo.

#### CONFLICTO DE INTERESES

Ningún autor de este artículo tiene conflictos de intereses que declarar.

Aleksandra Mas-Stachurska<sup>a,b,c,d,\*</sup>, Berto J. Bouma<sup>e</sup>, Rianne de Bruin Bon<sup>e</sup>, Barbara Mulder<sup>e</sup>, Bart Bijmens<sup>c,f</sup> y Marta Sitges<sup>a,b,c,g,h</sup>

<sup>a</sup>Institut Clínic Cardiovascular, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España

<sup>b</sup>Departamento de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

<sup>c</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

<sup>d</sup>Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, España

<sup>e</sup>Cardiology Department, Amsterdam University Medical Centers, Location Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, Países Bajos

<sup>f</sup>Institució Catalana de Investigació y Estudios Avanzados (ICREA), Barcelona, España

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

<sup>h</sup>Centres de Recerca de Catalunya (CERCA), Generalitat de Catalunya, Barcelona, España

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [astachur@gmail.com](mailto:astachur@gmail.com) (A. Mas-Stachurska).

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Kiotseoglou A, Moggridge JC, Child AH, Rask P. The role of advanced echocardiography and cardiovascular magnetic resonance in the assessment of myocardial function in Marfan syndrome-An update. *Echocardiography*. 2017;34:760-767.
2. Mas-Stachurska A, Egea G, de Bruin-Bon R, et al. Postsystolic thickening is a potential new clinical sign of injured myocardium in marfan syndrome. *Sci Rep*. 2021;11:15790.
3. Meijboom LJ, Timmermans J, Zwinderman AH, Engelfriet PM, Mulder BJM. Aortic root growth in men and women with the Marfan's syndrome. *Am J Cardiol*. 2005;96:1441-1444.
4. Detaint D, Faivre L, Collod-Beroud G, et al. Cardiovascular manifestations in men and women carrying a FBN1 mutation. *Eur Heart J*. 2010;31:2223-2229.
5. Franken R, Groenink M, de Waard V, et al. Genotype impacts survival in Marfan syndrome. *Eur Heart J*. 2016;37:3285-3290.

## 4. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de esta tesis doctoral se pueden resumir en el hallazgo, con una elevada prevalencia, de un signo de postcarga aumentada, el engrosamiento postsistólico (EPS), en sujetos con SM, tanto a nivel de la población de pacientes como en el modelo experimental murino. Esta prevalencia es variable según el género o el tratamiento vasodilatador recibido y se reduce con la práctica de ejercicio físico.

En el primer subproyecto, observamos una alta prevalencia de EPS en el SM, detectado tanto en un modelo experimental murino como en una cohorte de pacientes con SM. El EPS en el segmento basal del tabique interventricular del ventrículo izquierdo (VI) es un marcador de sobrecarga de presión que puede obtenerse fácilmente y detectarse de forma reproducible, tanto en escenarios clínicos como experimentales, mediante ecocardiografía convencional (modo M) y avanzada (Doppler Tisular) (56,59). El EPS se ha descrito en sujetos sin patología aparente e incluso se ha considerado fisiológico en algunos estudios (56,61) y por ello algunos autores han propuesto el punto de corte de un EPS 10-20% más prominente para definirlo como patológico (97,55). En nuestro proyecto se definió la presencia de EPS en sujetos humanos a partir del aumento de un 5% de la curva postsistólica respecto a la curva sistólica de la deformación miocárdica del ventrículo izquierdo, con el fin de detectar la disfunción en la etapa muy inicial de la lesión miocárdica. En los ratones de 4 meses de edad, la presencia de EPS se asoció a la dilatación de la raíz aórtica a pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la presión arterial entre el grupo de ratones con EPS y aquellos sin EPS. Curiosamente, los pacientes con EPS muestran una presión arterial sistólica más baja que los controles y se observa una asociación entre el aumento de la prevalencia de EPS con el aumento de la edad.

Debido a la progresiva rigidez de la aorta como parte del proceso natural de envejecimiento, se ha descrito que la presencia de EPS aumenta en la población anciana (61, 98). En consecuencia, y con el fin de evitar, al menos en cierta medida, la posible influencia del envejecimiento en la prevalencia de EPS, se seleccionó al tercil más joven (18-24 años) de nuestro grupo de pacientes con SM para un análisis más detallado. Esta selección se basa en el hecho que los humanos menores de 24 años parecen ser los más comparables, en términos de edad, con los ratones de 4 meses de edad, considerando la esperanza de vida habitual de los ratones (18-20 meses de edad). Por tanto, analizamos la presencia de EPS y su relación con la presión arterial y la dilatación aórtica en pacientes adultos jóvenes. Destacablemente, a pesar del pequeño número de sujetos (N=16, 5 sujetos con EPS +), se observó una asociación

significativa entre la presencia de EPS (EPS +) y la dilatación aórtica. Ambos grupos de sujetos jóvenes con SM (ratones jóvenes con SM y pacientes jóvenes con SM) mostraron la misma asociación entre EPS y dilatación de la raíz aórtica. Esta asociación no se observó en pacientes mayores. Creemos que diferentes factores de confusión relacionados con el envejecimiento podrían influir en el estrés de la pared aórtica y, por consiguiente, explicar esta falta de asociación en el grupo poblacional completo que incluyó pacientes con un rango de edad de 18 a 49 años. De acuerdo con varios estudios previos (36,38), demostramos que la dilatación de la raíz aórtica y de la aorta ascendente se acompaña de dilatación ventricular izquierda tanto en ratones como en humanos con SM (36, 38). Estudios previos han descrito que los pacientes con SM desarrollan lesión miocárdica en forma de fibrosis y trastorno de la arquitectura miocárdica causada tanto por un depósito anormal de colágeno como por su desorganización. La afectación miocárdica en pacientes con SM ocurre incluso en presencia de válvulas normofuncionantes (36-38). Anomalías estructurales en la miocardiopatía del SM, como la hipertrofia y dilatación del VI y grados variables de disfunción sistólica, ocasionalmente son subclínicos y detectables solo a través del análisis de la deformación miocárdica, como con la detección del engrosamiento postsistólico (EPS) (43). No está aclarado si esta miocardiopatía se asocia a un peor pronóstico clínico. Nuestros hallazgos en el modelo animal de SM coinciden con la mayoría de las observaciones previas acerca de estas manifestaciones cardíacas como p. ej. el aumento de colágeno en el miocardio del VI en los ratones enfermos. En la misma línea que concluyen en su estudio Cook et al (36), nuestros resultados histopatológicos apoyan la hipótesis de que la señalización canónica de TGF- $\beta$  contribuye a la descompensación cardíaca inducida por la sobrecarga de presión. A nivel de la función del VI, todo eso indica la existencia de miocardiopatía en el SM (53).

Basándonos en nuestras observaciones sobre remodelado del VI, así como sobre la presencia de EPS y su asociación con la dilatación aórtica en pacientes muy jóvenes, concluimos que los individuos con SM muestran el mismo signo que se observa en sujetos hipertensos afectados de remodelado cardíaco (cardiopatía hipertensiva), a pesar de mantener la tensión arterial en rangos de normalidad.

Hay dos posibles explicaciones de este hallazgo. Primero, la composición arquitectónica anómala de la pared arterial en SM, y la rigidez asociada, alteraría la propagación del flujo y de la onda de presión; ello afectaría al estado funcional del VI, aunque los valores de la presión arterial periférica permanecieran dentro de los rangos normales. El mecanismo de este efecto aún no se ha aclarado por completo. En segundo lugar, alteraciones del ensamblaje de la matriz extracelular causadas en conjunto por la fibrilina 1 mutada, la señalización alterada de TGF $\beta$  y la

#### 4. Discusión

fibrosis cardíaca asociada (36), contribuyen al estrés de la pared local principalmente en los cardiomiocitos, lo que finalmente conduce a aumento de masa del VI y al desarrollo de EPS, ambos signos de sobrecarga de presión. Nuestros hallazgos sugieren que el tejido miocárdico del ventrículo izquierdo en los pacientes con SM es más susceptible a esta sobrecarga de presión ya que se observan estos hallazgos propios de la sobrecarga de presión aun sin valores altos de presión arterial. Confiamos que estos hallazgos alienten la búsqueda de nuevos métodos preventivos y terapéuticos, especialmente en edades muy tempranas.

La prevención de la dilatación y de la rotura aórtica en pacientes con hipertensión y dilatación aórtica es de vital importancia, y los beneficios de los fármacos vasodilatadores en este escenario están bien establecidos. Sin embargo, el papel de los fármacos vasodilatadores en la prevención del remodelado aórtico en pacientes con SM y sin valores elevados de presión arterial sigue estudiándose (99). Aunque los agentes como el losartan tienen un efecto vasodilatador, se cree que su beneficio cardiovascular probablemente también se produce a través de una modulación no hemodinámica de TGF $\beta$  y de vías metabólicas resultantes en fibrosis; esta última hipótesis fue evidenciada en múltiples estudios con animales, pero no tanto en el ámbito clínico. El análisis ecocardiográfico de los patrones de la deformación regional del VI (como el EPS) podría integrarse fácilmente en el entorno clínico (mediante el modo M o DTI) y detectar signos de disfunción miocárdica incluso en las primeras etapas de la enfermedad (como el caso de adultos muy jóvenes). Elucidar los mecanismos de la disfunción cardíaca en el SM tendría implicaciones importantes a la hora de establecer una indicación quirúrgica aórtica y valvular, así como para el desarrollo de nuevas terapias médicas de prevención de insuficiencia cardíaca. Al demostrar la susceptibilidad de la mecánica miocárdica en el corazón de los pacientes con SM quedarían justificadas terapias preventivas intensivas ya en etapas asintomáticas y muy tempranas de la enfermedad, a pesar de que los pacientes muestren una presión arterial normal.

Otro punto fundamental que se ha planteado en esta tesis doctoral es evaluar los efectos que produce el ejercicio físico en el fenotipo del SM, centrándose especialmente en el remodelado cardiovascular en un modelo murino de SM. El ejercicio físico moderado ha demostrado un amplio beneficio en la población general reduciendo la mortalidad cardiovascular y contribuyendo al mejor control del riesgo vascular al mejorar el perfil lipídico, el control de la presión vascular y del sobrepeso. Sin embargo, típicamente y en relación al

potencial riesgo de rotura aórtica, el ejercicio físico no ha estado recomendado e incluso ha sido restringido, en pacientes con SM. En nuestro estudio, observamos que el ejercicio de intensidad moderada mitigó la dilatación aórtica, no aumentó el número de las roturas de fibras elásticas aórticas ni los depósitos de colágeno y revirtió parcialmente la hipertrofia ventricular asociada al SM. En general, nuestros resultados muestran efectos positivos del ejercicio de intensidad moderada en las manifestaciones cardiovasculares del SM. La dilatación de la raíz aórtica es un sello distintivo del fenotipo cardiovascular del SM y un determinante principal de la morbimortalidad prematura. El grado de dilatación aórtica se correlaciona estrechamente con el riesgo de disección aórtica (100). Se ha propuesto que factores como el aumento de la presión arterial, de la presión central del pulso (101), las apneas obstructivas de sueño (99), el excesivo entrenamiento físico (93) o una predisposición genética relacionada con polimorfismos en genes distintos que FBN1 (103), influyen en la progresión de la dilatación aórtica y, en consecuencia, en el riesgo de disección o rotura aórtica en el SM.

En nuestras investigaciones se evidencia que el ejercicio de intensidad moderada y regular no acelera la tasa de dilatación aórtica, sino que más bien normaliza su progresión a valores comparables al observado en los animales sanos. No obstante, la mejoría ecocardiográfica no se acompañó de una restauración de la integridad histológica de las fibras elásticas. Mientras que los resultados histológicos y ecocardiográficos generalmente se presentan de forma simultánea, nosotros encontramos una clara reducción en la velocidad de progresión de la dilatación aórtica sin cambios evidentes en fracturas de la lámina elástica. Es posible que estas mejoras modestas (como las encontradas en nuestro estudio) puedan presentarse sin cambios histológicos evidentes. En primer lugar, no podemos descartar la posibilidad de que las mejoras en las rupturas microestructurales de la pared aórtica en ratones entrenados con SM puedan preceder a la reparación de la fibra elástica evaluada mediante análisis histológicos repetidos. Tales mejoras microestructurales en las fibras elásticas podrían tener un impacto fisiológico positivo, pudiendo traducirse en los hallazgos morfofuncionales de la ecocardiografía. En segundo lugar, el hecho de que las anomalías elásticas puedan estar presentes antes de la dilatación aórtica medible y evidenciable (104,105) y que las alteraciones en la integridad de la fibra elástica estén presentes en la porción no dilatada de la aorta torácica (106), sugiere la posibilidad de una falta de paralelismo entre el tamaño de la aorta y sus propiedades elásticas. Además, otros factores como la síntesis de fibronectina (107) o la disfunción endotelial (108) y de las células del músculo liso (109) también pueden contribuir significativamente a la dilatación aórtica progresiva.

Nuestros resultados no revelan datos sobre el mecanismo subyacente del efecto del ejercicio sobre el sistema cardiovascular en el SM, dejando espacio para múltiples hipótesis. Se



#### 4. Discusión

conocen varios efectos biológicos mediados por el ejercicio que podrían ser relevantes en un sujeto con SM como p. ej. alteraciones de la presión arterial, aumento de la perfusión tisular, reducción de la rigidez arterial, remodelado de la matriz extracelular, mejoría en la función de las células endoteliales y mejoría del rendimiento contráctil de las células musculares. Abordar estos cambios uno por uno puede sugerir algunas pistas sobre estos mecanismos.

Los ratones con SM del grupo entrenado con ejercicio físico mostraron un ligero aumento de la presión arterial sistólica, en comparación con los ratones sin SM. Sin embargo, vimos que, a pesar de este incremento en la presión arterial, hubo una menor dilatación aórtica y una menor hipertrofia de ventrículo izquierdo. Ese tipo de discrepancia entre la presión arterial y complicaciones aórticas en el SM se ha observado en estudios previos con antihipertensivos del grupo calcioantagonistas, en los que se evidenció un mayor crecimiento del aneurisma y una clara relación con un aumento del riesgo de disección y de cirugía aórtica tanto en ratones como en pacientes afectados de SM tratados con calcioantagonistas respecto a sujetos afectados sin este tratamiento (110). Estos datos nos permiten deducir que la reducción de la presión arterial *per se* no parece que sea imperiosamente beneficiosa en el SM, más bien se esperaría que ocurriera un efecto favorable mediante el proceso de inhibición de las vías específicas de señalización con la medicación como betabloqueadores y ARA II. El aumento de la perfusión de los tejidos en respuesta al ejercicio puede proporcionar una mejor oxigenación y suministro de nutrientes al corazón y aorta para combatir el daño cardiovascular en los afectados de SM. En nuestro experimento observamos vasos intramiocárdicos de pequeño tamaño con signos de aumento de fibrosis perivascular en el corazón de ratones con SM en comparación con ratones sin SM; posiblemente esa sea en parte responsables del daño cardíaco (fibrosis cardíaca) observado en los ratones con SM. A pesar de que el entrenamiento no cambió el tamaño de los vasos o la fibrosis, sí que redujo la progresión de la hipertrofia cardíaca.

La rigidez aórtica es una característica típica en pacientes y ratones con SM (111-113), la cual es causada, en parte, por la reducción de la integridad de la fibra de elastina y, en parte, por el remodelado de la matriz extracelular. No detectamos que tras el ejercicio se produjera reversión del aumento de la rigidez aórtica en ratones con SM. Eso podría ser explicado por el hecho de encontrar los mismos números de roturas de láminas elásticas y del depósito de colágeno entre ratones con SM, tanto sedentarios como entrenados. Dado que la fibrilina 1, la proteína más comúnmente mutada en el SM, es componente principal de láminas elásticas, el acúmulo de rupturas de láminas elásticas, por lo general, precede a la dilatación aórtica. Contrariamente, en nuestro proyecto detectamos enlentecimiento de la progresión del aneurisma en ratones con SM después del entreno físico a pesar de la continua acumulación de

roturas de láminas elásticas. Como muestran los resultados de las investigaciones proteómicas, la elastina y el colágeno examinados en este estudio, no son las únicas proteínas de la matriz extracelular que incitan interés para ser estudiadas en el aneurisma de aorta (113,114), ni las únicas que puedan haber sido influenciadas positivamente por el ejercicio. Según un enfoque simplista podríamos confiar en que la abundancia de estas proteínas en la matriz extracelular determina la estabilidad de la aorta, pero, en cambio, nos parece más importante la calidad de estas fibras y la de la red que forman juntas. Esto último también determina la (dis)función de las células endoteliales y de las células musculares lisas. Las células endoteliales son esenciales en la detección de las características del corriente sanguíneo y en la comunicación con las células musculares lisas subyacentes para la preservación de la integridad vascular (115). La disfunción de las células endoteliales es un hecho conocido en pacientes con SM (116,117), por lo que la mejora de la función endotelial mediante el ejercicio podría influir positivamente en la potencial dilatación aórtica. Curiosamente, una citocina inducida por el ejercicio, producida y secretada por las células del músculo esquelético y del corazón, la irisina, del grupo de las miocinas, revierte la disfunción de las células endoteliales y reduce la aterosclerosis en ratones con dislipemia (118). La correcta comunicación a través de las miocinas inducidas por el entrenamiento podría ser una vía implicada en la mejora de la función cardiovascular y requeriría una investigación adicional.

Además, las células musculares lisas de la pared de la aorta poseen propiedades mecanosensoras, lo que indica que los cambios mecánicos inducen las vías de señalización y, por lo tanto, determinan el comportamiento celular. El ejercicio induce una mayor fuerza mecánica en células musculares. Una explicación plausible del resultado observado del efecto del entrenamiento es que el ejercicio pudo reducir el efecto de la sintasa de óxido nítrico inducible (NOS-2) en la aorta de ratón con SM (119,120,121) y, por consiguiente, normalizar la tasa de dilatación aórtica hasta los niveles de los ratones sin SM. Una generación continua de óxido nítrico por la NOS-2 provoca la relajación vascular y disminuye la contractilidad de las células musculares lisas. Cabe destacar que un trabajo reciente ha sugerido que la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) está involucrada en la progresión de la dilatación aórtica en el SM (119). Curiosamente, se ha demostrado que el ejercicio reduce la expresión de la iNOS en escenarios en los que la iNOS está altamente inducida, p. ej. en obesidad (120) y en la diabetes mellitus (121). Por otro lado, hasta la fecha, la mayoría de los enfoques terapéuticos en el síndrome de Marfan se centran en el efecto sobre la presión arterial, pero en nuestro modelo experimental ésta no se redujo con el ejercicio físico. De la misma manera, otro estudio mostró que el bloqueo de iNOS (con L-NAME), normalizó el tamaño aórtico en ratones enfermos de SM a pesar del

#### 4. Discusión

aumento de la presión arterial inducido por el mismo agente inhibidor de la NOS (119). En conjunto, estos resultados apuntan a la inhibición de la iNOS como un potencial mediador de los beneficios del ejercicio en el SM observados en nuestro estudio.

Los resultados de nuestro experimento con el ejercicio físico indican, asimismo, un impacto positivo del entreno con ejercicio físico de intensidad moderada sobre la miocardiopatía del SM, evidenciando progresión enlentecida de la misma. Esto es consistente con el papel de la actividad física en otras patologías cardíacas predisponentes a la hipertrofia ventricular izquierda que se describe en humanos y modelos animales.

Kokkinos et al (1995) observaron una reducción significativa (1mm) del grosor del tabique interventricular y de la pared posterior del ventrículo izquierdo en pacientes afroamericanos con severa hipertensión arterial después de 4 meses de entreno físico de intensidad moderada (122). Un experimento en un modelo animal de miocardiopatía hipertrófica demostró efecto beneficioso de la actividad física iniciada en etapas tempranas de la vida, antes de la expresión fenotípica de la enfermedad. Konhilas et al (2006) constataron también reducción de los parámetros metabólicos equivalentes a la hipertrofia y fibrosis cardíaca (123). Mientras que el papel de la actividad física aeróbica moderada en individuos y en pacientes con algunos trastornos cardiovasculares es ampliamente reconocido (124), los pacientes con SM generalmente son excluidos de las recomendaciones de realizar ejercicio. El ejercicio dinámico de intensidad moderada y alta está prohibido a estos pacientes y únicamente son recomendados los deportes de baja carga dinámica como bolos, golf y tiro con arco (90). No obstante, esta recomendación (nivel de evidencia C) carece de datos experimentales que puedan apoyarla (90). Nuestros resultados sugieren que la actividad física de carga moderada no solo puede ser segura, sino que podría resultar beneficiosa en pacientes con SM. Se esperaría la desaceleración de la tasa de dilatación aórtica y una mejora de los signos de sobrecarga hemodinámica cardíaca. Una vez nuestros resultados sean reproducidos en humanos, la actividad física de intensidad moderada no solo debería permitirse, sino incluso fomentarse entre pacientes con SM.

Nuestros hallazgos coinciden con la descripción de un caso del programa individualizado de fisioterapia cardiovascular que consiguió revertir la dilatación e hipertrofia del VI en un paciente con SM (125). Muy recientemente, Gibson y col. encontraron resultados muy similares acerca del efecto del ejercicio en los ratones con SM (126), pero con la diferencia de que en ese estudio se realizó un entreno de baja carga. Es importante reseñar que nuestros resultados reflejan cambios promovidos por un entrenamiento de resistencia de carga ligera a moderada. Formas más intensas de actividad física u otro tipo del ejercicio podrían producir resultados similares u

opuestos. Se necesitan más experimentos controlados en humanos para poder explorar estos beneficios potenciales de la actividad física moderada y, así, fomentarla en pacientes con SM.

En resumen, los fenómenos de la perfusión del corazón y de la pared de aorta, el remodelado de la matriz extracelular en la aorta, la disfunción endotelial y la contractilidad celular del músculo liso son procesos influenciados por el ejercicio en el SM, y merecen una mayor investigación en estudios preclínicos y clínicos. Por último, estos estudios pueden conducir a un cambio de paradigma en la manejo del síndrome de Marfan, alentando a los médicos a aconsejar a los pacientes afectados de SM que inicien un programa de ejercicio moderado.

Para completar esta tesis doctoral analizamos si existían diferencias en la prevalencia del EPS según el género de los pacientes con SM. Nuestro estudio es el primero en revelar un claro impacto diferencial del género, siendo significativamente más frecuente el EPS en las mujeres que en los hombres con SM. Las pacientes mujeres, no sólo muestran una mayor presencia de la deformación alterada en comparación con los hombres con SM, sino también respecto a las mujeres sanas (casi 3 veces más). Esta característica se asocia al hecho de que las mujeres reciben con menor frecuencia tratamiento con betabloqueadores y losartan, a pesar de que los diámetros aórticos y ventriculares son muy similares entre ambos géneros. El papel de los fármacos betabloqueadores y los ARA2 (losartan) en la prevención del remodelado cardiaco y aórtico debido a la sobrecarga de presión es ampliamente reconocido (74,96). Es difícil explicar en el presente estudio el por qué las mujeres con SM de nuestra serie son menos tratadas farmacológicamente. No obstante, esta diferencia tiene repercusión en su presión arterial, siendo ésta más alta en el caso de mujeres con EPS +, en comparación con las que no presentan este signo. Las mujeres premenopáusicas suelen tener valores de presión arterial más bajos que los hombres en la población general (127). Este hecho contrasta con el hallazgo de presión arterial diastólica más elevada en las mujeres en edad premenopáusica afectas de SM y EPS + en nuestra serie.

Este estudio no nos ha permitido confirmar si la redistribución del EPS es más desventajosa en las mujeres porque reciben menos tratamiento vasodilatador o porque hay una susceptibilidad intrínseca diferencial del miocardio femenino. A nivel del remodelado cardiaco, el género juega un papel importante en la aparición de la hipertrofia cardíaca en respuesta a la sobrecarga de presión (128) tanto patológica como adaptativa. Los estudios que valoran la magnitud de la respuesta cardíaca al ejercicio físico tanto en la ecocardiografía como en la

#### 4. Discusión

resonancia cardíaca no varían en los resultados. Ambas técnicas coinciden en enseñar menores grosos parietales del ventrículo izquierdo y menor masa cardíaca indexada por la superficie corporal en mujeres atletas que hombres atletas a pesar de la misma carga, tipo y duración del entreno (129-132). No obstante, estas cohortes estudiadas expuestas a situación de sobrecarga de presión en escenarios de sesiones de deporte presentan corazones estructuralmente normales. Las situaciones de sobrecarga de presión en corazones intrínsecamente diferentes con alguna patología que los haga más susceptibles a los efectos de sobrecarga hemodinámica puedan mostrar otros comportamientos. Estudios clínicos previos han demostrado que la hipertrofia cardíaca patológica aparece más tarde en las mujeres que en los hombres; sin embargo, una vez establecida, es un factor de riesgo de insuficiencia cardíaca más potente en mujeres que en hombres (96). Se ha confirmado histopatológicamente que el estado de sobrecarga de presión provoca apoptosis de los miocitos (133). No obstante, su extensión, la rapidez con la que se instaura, su irreversibilidad y otras peculiaridades dependerían, no solo de la magnitud de la carga hemodinámica y la duración de ésta, sino también de factores como el género y la edad del inicio de la sobrecarga (134). En la línea del rol de género se especula que las diferencias de género en la hipertrofia cardíaca podrían atribuirse a las hormonas sexuales y sus receptores (135). Particularmente, el estrógeno y el andrógeno ejercen efecto opuesto sobre el corazón y la circulación periférica tanto en estudios con humanos como con roedores (136). Los resultados de un estudio con un modelo de ratones hembras ovariectomizadas expuestas a sobrecarga de presión provocada mediante constricción de la aorta transversal muestran consonancia con esta observación, demostrando que el 17 beta-estradiol (E2) retrasa la aparición de hipertrofia cardíaca y previene la fibrosis cardíaca por un mecanismo dependiente del receptor de estrógeno (137).

Un enfoque sumamente interesante es el que pretendían determinar unos investigadores alemanes en un experimento con ratas de ambos sexos expuestas al *banding* de la aorta abdominal para inducir sobrecarga de presión (138). Se estudiaba la influencia del momento en el que se produce el insulto cardiovascular y su duración en relación con el género sobre el miocardio. El estudio reveló que no había diferencias significativas en el grado de hipertrofia ventricular izquierda según el sexo en las primeras etapas (durante 6 semanas) después de la colocación de la banda aórtica. Sin embargo, después de 12 semanas, las ratas de género masculino mostraban una disminución de la contractilidad miocárdica, acompañada de reducción de la relajación miocárdica y alteración de la función diastólica, mientras que las ratas hembras no mostraban deterioro de la estructura y función ventricular izquierda. Curiosamente,

las ratas hembras presentaban la presión arterial media más alta que las ratas machos, tanto tras 6 como tras 12 semanas después del *banding* (138).

Por el otro lado, cabe remarcar que, con el envejecimiento, la rigidez arterial aumenta más significativamente en mujeres que en hombres asociándose a dos veces mayor mortalidad en el sexo femenino (139). No obstante, justamente después de la pubertad, la rigidez arterial disminuye en las mujeres y aumenta en los hombres, hecho que proporciona más evidencia a favor de los efectos de las hormonas sexuales sobre la rigidez vascular, además de lo que sería el efecto del envejecimiento mismo del cuerpo y de la aorta (96).

Actualmente, no hay pruebas sustanciales que muestren una eficacia diferente de tratamiento antihipertensivo según el género (140). En cuanto al uso de IECA y ARA II, éstos comparten efectos similares en ambos sexos, con pequeñas diferencias a favor de efectos positivos más notorios en los hombres (141,142). Los betabloqueadores mostraron resultados positivos similares en ambos sexos, con un beneficio de supervivencia ligeramente mayor en las mujeres mayores (142).

En nuestra serie, las pacientes de sexo femenino tienen menos probabilidad de ser tratadas y presentan mayor remodelado ventricular izquierdo. Las razones que llevan a estas diferencias deben ser estudiadas en futuras investigaciones y debería existir un esfuerzo común en mejorar las tasas de tratamiento de estas pacientes.

En resumen, con este proyecto hemos conseguido ampliar nuestro estudio sobre la afectación cardiovascular en el SM, conocer mejor la adaptación fisiopatológica del corazón y de la aorta al esfuerzo, y detectamos, de manera muy precoz, la lesión cardíaca de forma no invasiva, mediante técnicas de imagen. Merece especial atención el hallazgo de que los sujetos afectados de SM de género femenino tienen menos probabilidad de ser tratadas farmacológicamente y presentan mayor remodelado ventricular izquierdo. Cabe considerar que estas anomalías del miocardio sean, en gran parte, el sustrato anatomopatológico que justifique el mayor riesgo de insuficiencia cardíaca que se observa en los enfermos con SM. El conocimiento generado en estas investigaciones se podría traducir en unas mejores prácticas para la detección, el seguimiento y la prevención de la disfunción ventricular en estos pacientes desde edades tempranas de la vida. Por otro lado, evidenciar que el ejercicio físico moderado tenga un efecto beneficioso en la función ventricular y en el comportamiento de la aorta en un modelo murino puede revocar objeciones éticas al realizar estudios similares, bajo control médico estrecho, en pacientes humanos afectados de SM. Finalmente, demostramos que las

#### 4. Discusión

técnicas ecocardiográficas de Modo M y Doppler Tisular son útiles para la detección precoz de la miocardiopatía del SM y podrían aplicarse de forma rutinaria en el seguimiento habitual de estos pacientes y adoptarse así medidas de prevención precoz, como, por ejemplo, la administración de vasodilatadores, a pesar de valores normales de la presión arterial, y la prescripción de un programa de entrenamiento físico individualizado.

## 5. CONCLUSIONES

1. En un modelo experimental murino y en pacientes con síndrome de Marfan se observó una alta prevalencia de engrosamiento postsistólico.
2. La alta prevalencia del signo de engrosamiento postsistólico, tanto en ratones como en pacientes con síndrome de Marfan, sugiere la existencia de miocardiopatía por sobrecarga de presión.
3. Este marcador puede proporcionar una herramienta de detección y monitorización del remodelado cardíaco y puede apoyar la decisión de iniciar terapias preventivas en pacientes con síndrome de Marfan, incluso con niveles normales de presión arterial.
4. En un modelo murino de síndrome de Marfan, el ejercicio dinámico de intensidad moderada se asocia a una menor dilatación aortica, menor hipertrofia cardíaca y menor frecuencia de engrosamiento postsistólico.
5. La presencia de engrosamiento postsistólico se observa con mayor frecuencia en pacientes mujeres con síndrome de Marfan que en pacientes hombres con SM; sin embargo, estas mujeres con SM reciben con menor frecuencia tratamiento vasodilatador a pesar de que su presión es significativamente más alta



## REFERENCIAS

1. Sanchez R. Enfermedad de Marfan: revisión clinicoterapéutica y guías de seguimiento. *Semin Fund Esp Reumatol*. 2011;12(4):112–122. doi:10.1016/j.semreu.2011.09.001
2. Dietz HC, Cutting CR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991;352:337–433.
3. Pyeritz R. Marfan syndrome and other disorders of fibrillin. En: Rimoin DL, Conner JM, Pyeritz RE, editores. *Principles and Practice of Medical Genetics*. 3rd ed New York: Churchill Livingstone; 1997. p. 1027–66.
4. Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet*. 2005;366:1965–76.
5. Marfan A. Un cas de déformation congénitale des quatres membres, plus prononcée aux extrémités, caractérisée par l'allongement des os avec un certain degré d'aminocisement. *Bulletins et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris*. 1886;13:220–8.
6. Lebreiro A, Martins E, Cruz C, Almeida J, Maciel MJ, Cardoso JC, et al. Marfan syndrome: Clinical manifestations, pathophysiology and new outlook on drug therapy. *Rev Port Cardiol*. 2010;29:1021–36.
7. De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RC, Pyeritz RE. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet*. 1996;62:417–26.
8. Cañadas V, Villacosta I, Bruna I, Fuster V. Marfan syndrome. Part 1: Pathophysiology and diagnosis. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:256–65.
9. Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Collod-Bérout G, Booms P, De Paepe A, et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet*. 2006;43:769–87.
10. Mizuguchi T, Matsumoto N. Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *J Hum Genet*. 2007;52:1–12.
11. Robinson PN, Booms P. The molecular pathogenesis of the Marfan syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:1698–707.
12. Pearson GD, Devereux R, Loeys B, Maslen C, Milewicz D, Pyeritz R, et al., National Heart, Lung, and Blood Institute and National Marfan Foundation Working Group. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute and National Marfan Foundation Working Group on research in Marfan syndrome and related disorders. *Circulation*. 2008;118:785–91.
13. Ramirez F, Sakai LY, Rifkin DB, Dietz HC. Extracellular microfibrils in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:2437–46.

14. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;37:275–81.
15. Pannu H, Fadulu VT, Chang J, Lafont A, Hasham SN, Sparks E, et al. Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation.* 2005;112:513–20.
16. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, Callewaert BL, De Backer J, Devereux RB, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet.* 2010;47:476–85.
17. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:407–11.
18. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science.* 2006;312:117–21.
19. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115:3719–27.
20. Aziz F, Kuivaniemi H. Role of matrix metalloproteinase inhibitors in preventing abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg.* 2007;21:392–401.
21. Callewaert B, Malfait F, Loeys B, De Paepe A. Ehlers-Danlos syndromes and Marfan syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22:165–89.
22. Mueller GC, Stark V, Steiner K, von Kodolitsch Y, Rybczynski M, Weil J, Mir TS. Impact of age and gender on cardiac pathology in children and adolescents with Marfan syndrome. *Pediatr Cardiol.* 2013 Apr;34(4):991-8. doi: 10.1007/s00246-012-0593-0. Epub 2012 Nov 25. PMID: 23183959.
23. Singh MN, Lacro RV. Recent clinical drug trials evidence in Marfan syndrome and clinical implications. *Can J Cardiol.* 2015;32:66–77.
24. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, Bersin RM, Carr VF, Casey DE, Eagle KA, Hermann LK, Isselbacher EM, Kazerooni EA, Kouchoukos NT, Lytle BW, Milewicz DM, Reich DL, Sen S, Shinn JA, Svensson LG, Williams DM; American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, Society for Vascular Medicine. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/ SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. *Circulation.* 2010;121:e266–e369.

25. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt JU. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015 Mar;16(3):233-70. doi: 10.1093/ehjci/jev014. Erratum in: *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016 Apr;17(4):412. Erratum in: *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016 Sep;17(9):969. PMID: 25712077.
26. Reed CM, Richey PA, Pulliam DA, Somes GW, Alpert BS. Aortic dimensions in tall men and women. *Am J Cardiol*. 1993;71:608–10.
27. Mart CR, Khan SA, Smith FC, Kavey RE. A new on-line method for predicting aortic root dilatation during two-dimensional echocardiography in pediatric patients with Marfan syndrome using the sinus of valsalva to annulus ratio. *Pediatr Cardiol*. 2003;24:118–21.
28. Hirata K, Triposkiadis F, Sparks E, Bowen J, Wooley CF, Boudoulas H. The Marfan syndrome: abnormal aortic elastic properties. *J Am Coll Cardiol*. 1991;18:57–63.
29. Vitarelli A, Conde Y, Cimino E, D’Angeli I, D’Orazio S, Stellato S, Padella V, Caranci F. Aortic wall mechanics in the Marfan syndrome assessed by transesophageal tissue Doppler echocardiography. *Am J Cardiol*. 2006; 97:571–577. [PubMed: 16461059]
30. Groenink M, Roos Ad, Mulder BJ, Spaan JA, v d Wall EE. Changes in aortic distensibility and pulse wave velocity assessed with magnetic resonance imaging following beta-blocker therapy in the marfan syndrome. *Am J Cardiol*. 1998; 82:203–208. [PubMed: 9678292]
31. Westenberg JJ, Scholte AJ, Vaskova Z, v d Geest RJ, Groenink M, Labadie G, v d Boogaard PJ, Radonic T, Hilhorst-Hofstee Y, Mulder BJ, Kroft LJ, Reiber JH, Roos Ad. Age-related and regional changes of aortic stiffness in the Marfan syndrome: assessment with velocity-encoded MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2011; 34:526–531. [PubMed: 21761466]
32. Marque V, Kieffer P, Gayraud B, Lartaud-Idjouadiene I, Ramirez F, Atkinson J. Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1184–1189. [PubMed: 11451749]
33. Groenink M, Langerak SE, Vanbavel E, v d Wall EE, Mulder BJ, v d Wal AC, Spaan JA. The influence of aging and aortic stiffness on permanent dilation and breaking stress of the thoracic descending aorta. *Cardiovasc Res*. 1999; 43:471–480. [PubMed: 10536677]
34. Milewicz D, Dietz H, Miller C. Treatment of aortic disease in patients with Marfan syndrome. *Circulation*. 2005;111:e150–7.
35. Campens, L. et al. Intrinsic cardiomyopathy in Marfan syndrome: Results from in-vivo and ex-vivo studies of the Fbn1C1039G/+ model and longitudinal findings in humans. *Pediatr. Res*. 78(3), 256–263. [https:// doi. org/ 10. 1038/ pr. 2015. 110](https://doi.org/10.1038/pr.2015.110) (2015).

36. Cook, J. R. et al. Dimorphic effects of transforming growth factor- $\beta$  signaling during aortic aneurysm progression in mice suggest a combinatorial therapy for Marfan syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35(4), 911–917. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.305150> (2015).
37. Tae, H. J., Petrashevskaya, N., Marshall, S., Krawczyk, M. & Talan, M. Cardiac remodeling in the mouse model of Marfan syndrome develops into two distinctive phenotypes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310(2), H290–H299. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00354.2015> (2016).
38. Creemers, E. E. & Pinto, Y. M. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc. Res.* 89(2), 265–272. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq308> (2011).
39. de Witte P, Aalberts JJ, Radonic T, Timmermans J, Scholte AJ, Zwinderman AH, et al. Intrinsic biventricular dysfunction in Marfan syndrome. *Heart.* 2011;97:2063-8.
40. Alpendurada F, Wong J, Kiotsekoglou A, Banya W, Child A, Prasad SK, et al. Evidence for Marfan cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:1085-91.
41. Kiotsekoglou, A. et al. Impaired biventricular deformation in Marfan syndrome: A strain and strain rate study in adult unoperated patients. *Echocardiography* 28(4), 416–430. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2010.01359.x> (2011).
42. Rouf, R. et al. Nonmyocyte ERK1/2 signaling contributes to load-induced cardiomyopathy in Marfan mice. *JCI Insight.* 2(15), e91588. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91588> (2017).
43. Cavanaugh, N. B. et al. A novel murine model of marfan syndrome accelerates aortopathy and cardiomyopathy. *Ann. Thorac. Surg.* 104(2), 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2016.10.077> (2017).
44. De Backer, J. F. et al. Primary impairment of left ventricular function in Marfan syndrome. *Int. J. Cardiol.* 112(3), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.10.010> (2006).
45. Savolainen A, Kupari M, Toivonen L, Kaitila I, Viitasalo M. Abnormal ambulatory electrocardiographic findings in patients with the Marfan syndrome. *J Intern Med.* 1997;241:221–226.
46. Yetman AT, Bornemeier RA, McCrindle BW. Long-term outcome in patients with Marfan syndrome: is aortic dissection the only cause of sudden death? *J Am Coll Cardiol* 2003;41:329–32.
47. Reiter MJ. Effects of mechano-electrical feedback: potential arrhythmogenic influence in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 1996;32:44–51.

## Referencias

48. Franz MR, Cima R, Wang D, Profitt D, Kurz R. Electrophysiological effects of myocardial stretch and mechanical determinants of stretch-activated arrhythmias. *Circulation* 1992;86:968–78.
49. Kiotsekoglou A, Sutherland GR, Moggridge JC, et al. Impaired right ventricular systolic function demonstrated by reduced atrioventricular plane displacement in adults with Marfan syndrome. *Eur J Echocardiogr* 2009;10:295–302.
50. Rybczynski, M. et al. Tissue Doppler imaging identifies myocardial dysfunction in adults with Marfan syndrome. *Clin. Cardiol.* 30(1), 19–24. [https:// doi. org/ 10. 1002/ clc.3 \(2007\)](https://doi.org/10.1002/clc.3(2007)).
51. Hoffmann BA, Rybczynski M, Rostock T, Servatius H, Drewitz I, Steven D, Aydin A, Sheikhzadeh S, Darko V, von Kodolitsch Y, Willems S. Prospective risk stratification of sudden cardiac death in Marfan's syndrome. *Int J Cardiol.* 2013 Sep 10;167(6):2539-45. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.06.036. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22738784.
52. Meijboom, L. J. et al. Evaluation of left ventricular dimensions and function in Marfan's syndrome without significant valvular regurgitation. *Am. J. Cardiol.* 95(6), 795–797. [https:// doi. org/ 10. 1016/j. amjca rd. 2004. 11. 042 \(2005\)](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.11.042).
53. Kiotsekoglou, A., Moggridge, J. C., Child, A. H. & Rask, P. The role of advanced echocardiography and cardiovascular magnetic resonance in the assessment of myocardial function in Marfan syndrome-An update. *Echocardiography* 34(5), 760–767. [https:// doi. org/ 10. 1111/ echo. 13517 \(2017\)](https://doi.org/10.1111/echo.13517).
54. Carlhäll, C., Wranne, B. & Jurkevicius, R. Is left ventricular postsystolic long-axis shortening a marker for severity of hypertensive heart disease?. *Am. J. Cardiol.* 91(12), 1490–1493. [https:// doi. org/ 10. 1016/ s0002- 9149\(03\) 00407-7 \(2003\)](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(03)00407-7).
55. Crispi, F. et al. Postsystolic shortening by myocardial deformation imaging as a sign of cardiac adaptation to pressure overload in fetal growth restriction. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 7(5), 781–787. [https:// doi. org/ 10. 1161/ CIRCI MAGING. 113. 001490 \(2014\)](https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.113.001490).
56. Weidemann, F. et al. How to distinguish between ischemic and nonischemic postsystolic thickening: A strain rate imaging study. *Ultrasound Med. Biol.* 32(1), 53–59. [https:// doi. org/ 10. 1016/j. ultra smedb io. 2005. 09. 003 \(2006\)](https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2005.09.003).
57. Melchiorre, K., Sutherland, G. R., Baltabaeva, A., Liberati, M. & Thilaganathan, B. Maternal cardiac dysfunction and remodeling in women with preeclampsia at term. *Hypertension* 57(1), 85–93. [https:// doi. org/ 10. 1161/ HYPER TENSI ONAHA. 110. 162321 \(2011\)](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSION.110.162321).
58. Bijnens, B., Claus, P., Weidemann, F., Strotmann, J. & Sutherland, G. R. Investigating cardiac function using motion and deformation analysis in the setting of coronary artery disease. *Circulation* 116(21), 2453–2464. [https:// doi. org/ 10. 1161/ CIRCULATIO NAHA. 106. 684357 \(2007\)](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684357).
59. Loncaric, F. et al. Basal ventricular septal hypertrophy in systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* 125(9), 1339–1346. [https:// doi. org/ 10. 1016/j. amjca rd. 2020. 01. 045 \(2020\)](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.01.045).

60. Voigt, J. U. et al. Incidence and characteristics of segmental postsystolic longitudinal shortening in normal, acutely ischemic, and scarred myocardium. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 16(5), 415–423. [https://doi.org/10.1016/s0894-7317\(03\)00111-1](https://doi.org/10.1016/s0894-7317(03)00111-1) (2003).
61. Claus, P. et al. Mechanisms of postsystolic thickening in ischemic myocardium: Mathematical modelling and comparison with experimental ischemic substrates. *Ultrasound Med. Biol.* 33(12), 1963–1970. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2007.06.003> (2007).
62. Murdoch JL, Walker BA, Halpern BL, Kuzma JW, McKusick VA. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. *N Engl J Med.* 1972;286:804–8.
63. Silverman DI, Burton KJ, Gray J, Bosner MS, Kouchoukos NT, Roman MJ, et al. Life expectancy in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol.* 1995;75:157–60.
64. Milewicz DM, Braverman AC, De Backer J, Morris SA, Boileau C, Maumenee IH, Jondeau G, Evangelista A, Pyeritz RE. Marfan syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 Sep 2;7(1):64. doi: 10.1038/s41572-021-00298-7. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers.* 2022 Jan 17;8(1):3. PMID: 34475413.
65. Halpern BL, Char F, Murdoch JL, Horton WB, McKusick VA. A prospectus on the prevention of aortic rupture in the Marfan syndrome with data on survivorship without treatment. *Johns Hopkins Med J.* 1971;129:123–9.
66. Möberg K, De Nobele S, Devos D, Goetghebeur E, Segers P, Trachet B, Vervaeke C, Renard M, Coucke P, Loeys B, De Paepe A, De Backer J. The Ghent Marfan Trial--a randomized, double-blind placebo controlled trial with losartan in Marfan patients treated with  $\beta$ -blockers. *Int J Cardiol.* 2012 Jun 14;157(3):354-8. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.12.070. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21239069.
67. Forteza A, Evangelista A, Sánchez V, Teixidó G, García D, Sanz P, et al. Study of the efficacy and safety of Losartan versus Atenolol for aortic dilatation in patients with Marfan syndrome. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:492–8.
68. Rios AS, Silber EN, Bavishi N, Varga P, Burton BK, Clark WA, et al. Effect of long-term beta-blockade on aortic root compliance in patients with Marfan syndrome. *Am Heart J.* 1999;137:1057–110.
69. Shores J, Berger KR, Murphy EA, Pyeritz RE. Progression of aortic dilatation and the benefit of long-term beta-adrenergic blockade in Marfan's syndrome. *N Engl J Med.* 1994;330:1335–41.
70. Rossi-Foulkes R, Roman MJ, Rosen SE, Kramer-Fox R, Ehlers KH, O'Loughlin JE, et al. Phenotypic features and impact of beta blocker or calcium antagonist therapy on aortic lumen size in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol.* 1999;83:1364–8.

## Referencias

71. Lacro, R. V. et al. Atenolol versus losartan in children and young adults with Marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 371, 2061–2071 (2014).
72. Chiu, H. H. et al. Losartan added to  $\beta$ -blockade therapy for aortic root dilation in Marfan syndrome: a randomized, open-label pilot study. *Mayo Clin Proc.* 2013;88(3):271-6. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.11.005.
73. Groenink, M. et al. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *Eur Heart J.* 2013;34(45):3491-500. doi: 10.1093/eurheartj/ehv334.
74. Milleron, O. et al. Marfan Sartan: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Heart J.* 2015;36(32):2160-6. doi: 10.1093/eurheartj/ehv151
75. Li L, Zhou N, Gong H, Wu J, Lin L, Komuro I, et al. Comparison of angiotensin II type 1 receptor blockers to regress pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertens Res* 2010; 33: 1289 – 1297.
76. Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Lakshmanan AP, Yamaguchi K, Ma M, et al. Olmesartan attenuates the development of heart failure after experimental autoimmune myocarditis in rats through the modulation of ANG 1-7 mas receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 208 – 219.
77. Burnier M, Wuerzner G. Pharmacokinetic evaluation of losartan. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011; 7:643–649.
78. Franken, R. et al. Circulating transforming growth factor- $\beta$  as a prognostic biomarker in Marfan syndrome. *Int. J. Cardiol.* 168, 2441–2446 (2013).
79. Chiu, H. H. et al. Losartan added to  $\beta$ -blockade therapy for aortic root dilation in Marfan syndrome: a randomized, open-label pilot study. *Mayo Clin. Proc.* 88, 271–276 (2013).
80. Groenink, M. et al. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: an open-label randomized clinical trial. *Eur. Heart J.* 34, 3491–3500 (2013).
81. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, ap Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med.* 2007;13:204–210.
82. Schuler G, Adams V, Goto Y. Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J.* 2013;34:1790–1799.
83. Sharma S, Merghani A, Mont L. Exercise and the heart: the good, the bad, and the ugly. *Eur Heart J.* 2015 Jun 14;36(23):1445-53. doi: 10.1093/eurheartj/ehv090. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25839670.

84. Mitchell JH, Haskell W, Snell P, Van Camp SP. Task Force 8: classification of sports. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Apr 19;45(8):1364-7. doi: 10.1016/j.jacc.2005.02.015. PMID: 15837288.
85. Volianitis S, Secher NH. Cardiovascular control during whole body exercise. *J Appl Physiol.* 2016;121:376-390.
86. Iskandar A, Thompson PD. A meta-analysis of aortic root size in elite athletes. *Circulation.* 2013;127:791-798.
87. Fuglsang S, Heiberg J, Hjortdal VE, Laustsen S. Exercise-based cardiac rehabilitation in surgically treated type-A aortic dissection patients. *Scand Cardiovasc J.* 2017;51(2):99-105.
88. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, et al. Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2013;128(8):873-934.
89. Ehrman, Jonathan K. PhD; Fernandez, Antonio B. MD; Myers, Jonathan PhD; Oh, Paul MD; Thompson, Paul D. MD; Keteyian, Steven J. PhD Aortic Aneurysm, *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*: July 2020 - Volume 40 - Issue 4 - p 215- doi: 10.1097/HCR.0000000000000521
90. Braverman AC, Harris KM, Kovacs RJ, Maron BJ. Eligibility and disqualification recommendations for competitive athletes with cardiovascular abnormalities: Task Force 7: aortic diseases, including Marfan syndrome: a scientific statement from the American Heart Association and American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66:2398-2405.
91. Lucà F, Abrignani MG, Parrini I, Di Fusco SA, Giubilato S, Rao CM, Piccioni L, Cipolletta L, Passaretti B, Giallauria F, Leone A, Francese GM, Riccio C, Gelsomino S, Colivicchi F, Gulizia MM. Update on Management of Cardiovascular Diseases in Women. *J Clin Med.* 2022;11(5):1176. doi: 10.3390/jcm11051176. PMID: 35268267; PMCID: PMC8911459.
92. Ghare MI, Chandrasekhar J, Mehran R, Ng V, Grines C, Lansky A. Sex Disparities in Cardiovascular Device Evaluations: Strategies for Recruitment and Retention of Female Patients in Clinical Device Trials. *JACC Cardiovasc Interv.* 2019;12(3):301-308. doi: 10.1016/j.jcin.2018.10.048. PMID: 30732736.
93. L.J. Meijboom, J. Timmermans, A.H. Zwinderman, P.M. Engelfriet, B.J. Mulder, Aortic root growth in men and women with the Marfan's syndrome, *Am. J. Cardiol.* 96 (10) (2005) 1441-1444.
94. D. Detaint, L. Faivre, G. Collod-Beroud, A.H. Child, B.L. Loeys, C. Biquet, E. Gautier, E. Arbustini, K. Mayer, M. Arslan-Kirchner, C. Stheneur, D. Halliday, C. Beroud, C. Bonithon-Kopp, M. Claustres, H. Plauchu, P.N. Robinson, A. Kiotsekoglou, J. De Backer, L. Ades, U. Francke, A. De Paepe, C. Boileau, G. Jondeau, Cardiovascular manifestations in men and women carrying a FBN1 mutation, *Eur. Heart J.* 31 (18) (2010) 2223-2229.
95. K.A. Groth, K. Stochholm, H. Hove, K. Kyhl, P.A. Gregersen, N. Vejstrup, J.R. Ostergaard, C.H. Gravholt, N.H. Andersen, Aortic events in a nationwide Marfan syndrome cohort, *Clin. Res. Cardiol.* 106 (2) (2017) 105-112.



#### 4. Referencias

96. R. Franken, M. Groenink, V. de Waard, H.M. Feenstra, A.J. Scholte, M.P. van den Berg, G. Pals, A.H. Zwinderman, J. Timmermans, B.J. Mulder, Genotype impacts survival in Marfan syndrome, *Eur. Heart J.* 37 (43) (2016) 3285–3290.
97. Cheng A, Owens D. Marfan syndrome, inherited aortopathies and exercise: what is the right answer? *Heart.* 2015;101:752–757.
98. Brainin P, Biering-Sørensen SR, Møgelvang R, Sjøgaard P, Jensen JS, Biering-Sørensen T. Postsystolic Shortening by Speckle Tracking Echocardiography Is an Independent Predictor of Cardiovascular Events and Mortality in the General Population. *J Am Heart Assoc.* 2018 Mar 8;7(6):e008367. doi: 10.1161/JAHA.117.008367. PMID: 29519813; PMCID: PMC5907576.
99. Mancia, G. et al. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2013;34(28):2159–2219. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh151>.
100. Kim EK, Choi SH, Sung K, Kim WS, Choe YH, Oh JK, Kim D-K. Aortic diameter predicts acute type A aortic dissection in patients with Marfan syndrome but not in patients without Marfan syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;147:1505–1510.
101. Jondeau G, Boutouyrie P, Lacolley P, Laloux B, Dubourg O, Bourdarias JP, Laurent S. Central pulse pressure is a major determinant of ascending aorta dilation in Marfan syndrome. *Circulation.* 1999;99:2677–2681.
102. Kohler M, Blair E, Risby P, Nickol AH, Wordsworth P, Forfar C, Stradling JR. The prevalence of obstructive sleep apnoea and its association with aortic dilatation in Marfan's syndrome. *Thorax.* 2009;64:162–166.
103. Benke K, Agg B, Matyas G, Szokolai V, Harsanyi G, Szilveszter B, Odler B, Polos M, Maurovich-Horvat P, Radovits T, Merkely B, Nagy ZB, Szabolcs Z. Gene polymorphisms as risk factors for predicting the cardiovascular manifestations in Marfan syndrome. Role of folic acid metabolism enzyme gene polymorphisms in Marfan syndrome. *Thromb Haemost.* 2015;114:748–756.
104. Akazawa Y, Motoki N, Tada A, Yamazaki S, Hachiya A, Matsuzaki S, Kamiya M, Nakamura T, Kosho T, Inaba Y. Decreased aortic elasticity in children with Marfan syndrome or Loeys-Dietz syndrome. *Circ J.* 2016;80:2369–2375.
105. Groenink M, de Roos A, Mulder BJ, Verbeeten B, Timmermans J, Zwinderman AH, Spaan JA, van der Wall EE. Biophysical properties of the normal-sized aorta in patients with Marfan syndrome: evaluation with MR flow mapping. *Radiology.* 2001;219:535–540.
106. Chung AWY, Au Yeung K, Sandor GGS, Judge DP, Dietz HC, Van Breemen C. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2007;101:512–522.

107. Sabatier L, Chen D, Fagotto-Kaufmann C, Hubmacher D, McKee MD, Annis DS, Mosher DF, Reinhardt DP. Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol Biol Cell*. 2009;20:846–858.
108. Sy Yong HT, Chung AWY, Yang HHC, Van Breemen C. Dysfunction of endothelial and smooth muscle cells in small arteries of a mouse model of Marfan syndrome. *Br J Pharmacol*. 2009;158:1597–1608.
109. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res*. 2001;88:37–43.
110. Doyle JJ, Doyle AJ, Wilson NK, Habashi JP, Bedja D, Whitworth RE, Lindsay ME, Schoenhoff F, Myers L, Huso N, Bachir S, Squires O, Rusholme B, Ehsan H, Huso D, Thomas CJ, Caulfield MJ, Van Eyk JE, Judge DP, Dietz HC; GenTAC Registry Consortium; MIBAVA Leducq Consortium. A deleterious gene-by-environment interaction imposed by calcium channel blockers in Marfan syndrome. *Elife*. 2015;4:e08648.
111. Crosas-Molist E, Meirelles T, Lopez-Luque J, Serra-Peinado C, Selva J, Caja L, Gorbenko Del Blanco D, Uriarte JJ, Bertran E, Mendizabal Y, Hernandez V, Garcia-Calero C, Busnadiago O, Condom E, Toral D, Castilla M, Forteza A, Navajas D, Sarri E, Rodriguez-Pascual F, Dietz HC, Fabregat I, Egea G. Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:960–972.
112. Wanga SA, Hibender S, Ridwan Y, van Roomen C, Vos M, van der Made I, van Vliet N, Franken R, van Riel LA, Groenink M, Zwinderman AH, Mulder BJ, de Vries CJ, Essers J, de Waard V. Aortic microcalcification associates with elastin fragmentation in Marfan syndrome. *J Pathol*. 2017. DOI: 10.1002/path.4949. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.4949/full>. Accessed September 22, 2017.
113. Abdulkareem N, Skroblin P, Jahangiri M, Mayr M. Proteomics in aortic aneurysm —what have we learnt so far? *Proteomics Clin Appl*. 2013;7:504–515.
114. Pilop C, Aregger F, Gorman RC, Brunisholz R, Gerrits B, Schaffner T, Gorman JH III, Matyas G, Carrel T, Frey BM. Proteomic analysis in aortic media of patients with Marfan syndrome reveals increased activity of calpain 2 in aortic aneurysms. *Circulation*. 2009;120:983–991.
115. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012;14:249–256.
116. Wilson DG, Bellamy MF, Ramsey MW, Goodfellow J, Brownlee M, Davies S, Wilson JF, Lewis MJ, Stuart AG. Endothelial function in Marfan syndrome: selective impairment of flow-mediated vasodilation. *Circulation*. 1999;99:909–915.
117. Takata M, Amiya E, Watanabe M, Omori K, Imai Y, Fujita D, Nishimura H, Kato M, Morota T, Nawata K, Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Hosoya Y, Nakao T, Maemura K, Nagai R,

#### 4. Referencias

- Hirata Y, Komuro I. Impairment of flow-mediated dilation correlates with aortic dilation in patients with Marfan syndrome. *Heart Vessels*. 2014;29:478–485.
118. Zhang Y, Mu Q, Zhou Z, Song H, Zhang Y, Wu F, Jiang M, Wang F, Zhang W, Li L, Shao L, Wang X, Li S, Yang L, Wu Q, Zhang M, Tang D. Protective effect of irisin on atherosclerosis via suppressing oxidized low density lipoprotein induced vascular inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2016;11: e0158038.
119. Oller J, Mendez-Barbero N, Ruiz EJ, Villahoz S, Renard M, Canelas LI, Briones AM, Alberca R, Lozano-Vidal N, Hurle MA, Milewicz D, Evangelista A, Salaices M, Nistal JF, Jimenez-Borreguero LJ, De Backer J, Campanero MR, Redondo JM. Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease *Adams1* and in a mouse model of Marfan syndrome. *Nat Med*. 2017;23:200–212.
120. Silva JF, Correa IC, Diniz TF, Lima PM, Santos RL, Cortes SF, Coimbra CC, Lemos VS. Obesity, inflammation, and exercise training: relative contribution of iNOS and eNOS in the modulation of vascular function in the mouse aorta. *Front Physiol*. 2016;7:386.
121. Kleindienst A, Battault S, Belaidi E, Tanguy S, Rosselin M, Boulghobra D, Meyer G, Gayraud S, Walther G, Geny B, Durand G, Cazorla O, Reboul C. Exercise does not activate the  $\beta_3$  adrenergic receptor–eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res Cardiol*. 2016;111:40.
122. Kokkinos PF, Narayan P, Collieran JA, Pittaras A, Notargiacomo A, Reda D, Papademetriou V. Effects of regular exercise on blood pressure and left ventricular hypertrophy in African-American men with severe hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333:1462–1467.
123. Konhilas JP, Watson PA, Maass A, Boucek DM, Horn T, Stauffer BL, Luckey SW, Rosenberg P, Leinwand LA. Exercise can prevent and reverse the severity of hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2006;98:540–548.
124. Schuler G, Adams V, Goto Y. Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J*. 2013;34:1790–1799.
125. Medeiros WM, Peres PA, Carvalho AC, Gun C, De Luca FA. Effect of a physical exercise program in a patient with Marfan syndrome and ventricular dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2012;98:e70–e73.
126. Gibson C, Nielsen C, Alex R, Cooper K, Farney M, Gaufin D, Cui JZ, van Breemen C, Broderick TL, Vallejo-Elias J, Esfandiarei M. Mild aerobic exercise blocks elastin fiber fragmentation and aortic dilatation in a mouse model of Marfan syndrome associated aortic aneurysm. *J Appl Physiol*. 2017;123:147–160.
127. Srivaratharajah, K.; Abramson, B.L. Hypertension in menopausal women: The effect and role of estrogen. *Menopause* 2019, 26, 428–430

128. A) Wu J, Dai F, Li C, Zou Y. Gender Differences in Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Transl Res.* 2020 Feb;13(1):73-84. doi: 10.1007/s12265-019-09907-z. Epub 2019 Aug 15. PMID: 31418109.
129. Martínez V, Sanz-de la Garza M, Domenech-Ximenes B, Fernández C, García- Alvarez A, Prat-González S, Yanguas C, Sitges M. Cardiac and Pulmonary Vascular Remodeling in Endurance Open Water Swimmers Assessed by Cardiac Magnetic Resonance: Impact of Sex and Sport Discipline. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Aug 20;8:719113. doi: 10.3389/fcvm.2021.719113. PMID: 34490379; PMCID: PMC8417574.
130. Sanchis L, Sanz-de La Garza M, Bijmens B, Giraldeau G, Grazioli G, Marin J, Gabrielli L, Montserrat S, Sitges M. Gender influence on the adaptation of atrial performance to training. *Eur J Sport Sci.* 2017 Jul;17(6):720-726. doi: 10.1080/17461391.2017.1294620. Epub 2017 Mar 13. PMID: 28287029.
131. Sanz-de la Garza M, Giraldeau G, Marin J, Grazioli G, Esteve M, Gabrielli L, Brambila C, Sanchis L, Bijmens B, Sitges M. Influence of gender on right ventricle adaptation to endurance exercise: an ultrasound two-dimensional speckle-tracking stress study. *Eur J Appl Physiol.* 2017 Mar;117(3):389-396. doi:10.1007/s00421-017-3546-8. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28150069.
132. Domenech-Ximenes, B., Sanz-de la Garza, M., Prat-González, S., Sepúlveda-Martínez, A., Crispi, F., Duran-Fernandez, K., Perea, R. J., Bijmens, B., & Sitges, M. (2020). Prevalence and pattern of cardiovascular magnetic resonance late gadolinium enhancement in highly trained endurance athletes. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*, 22(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12968-020-00660-w>.
133. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, Staub E, Martus P, Ruiz Noppinger P, Kintscher U, Gustafsson JA, Regitz-Zagrosek V. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 Jun;298(6):R1597-606. doi: 10.1152/ajpregu.00825.2009. Epub 2010 Apr 7. Erratum in: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 Sep;299(3):R981. Kararigas, George [corrected to Kararigas, Georgios]. PMID: 20375266.
134. Rossouw, J. E., Prentice, R. L., Manson, J. E., Wu, L., Barad, D., Barnabei, V. M., et al. (2007). Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*, 297(13), 1465–1477. <https://doi.org/10.1001/jama.297.13.1465>.
135. Donaldson, C., Eder, S., Baker, C., Aronovitz, M. J., Weiss, A. D., Hall-Porter, M., et al. (2009). Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. *Circulation Research*, 104(2), 265–275, 211p following 275. <https://doi.org/10.1161/circresaha.108.190397>.
136. Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Seeland, U., & Hetzer, R. (2010). Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circulation Journal*, 74(7), 1265–1273.

#### 4. Referencias

137. van Eickels, M., Grohe, C., Cleutjens, J. P., Janssen, B. J., Wellens, H. J., & Doevendans, P. A. (2001). 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, 104(12), 1419–1423.
138. Ruppert, M., Korkmaz-Icoz, S., Loganathan, S., Jiang, W., Lehmann, L., Olah, A., et al. (2018). Pressure-volume analysis reveals characteristic sex-related differences in cardiac function in a rat model of aortic banding-induced myocardial hypertrophy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(3), H502–H511. [https://doi.org/10.1152/ajpheart.00202.2018.](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00202.2018)
139. DuPont, J.J.; Kenney, R.M.; Patel, A.R.; Jaffe, I.Z. Sex differences in mechanisms of arterial stiffness. *Br. J. Pharm.* 2019, 176, 4208–4225.
140. Ahimastos, A. A., Formosa, M., Dart, A. M., & Kingwell, B. A. (2003). Gender differences in large artery stiffness pre- and post-puberty. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(11), 5375–5380. [https://doi.org/10.1210/jc.2003-030722.](https://doi.org/10.1210/jc.2003-030722)
141. Humphries, K.H.; Izadnegahdar, M.; Sedlak, T.; Saw, J.; Johnston, N.; Schenck-Gustafsson, K.; Shah, R.; Regitz-Zagrosek, V.; Grewal, J.; Vaccarino, V.; et al. Sex differences in cardiovascular disease—Impact on care and outcomes. *Front. Neuroendocrinol.* 2017, 46, 46–70.
142. Levinsson, A.; Dubé, M.P.; Tardif, J.C.; de Denu, S. Sex, drugs, and heart failure: A sex-sensitive review of the evidence base behind current heart failure clinical guidelines. *ESC Heart Fail.* 2018, 5, 745–754.