

Solache-Berrocal G¹, Barral A^{2,4}, Martín M³, Román-García P¹, Llosa JC², Naves-Díaz M¹, Cannata-Andía JB¹, Rodríguez I¹

¹ Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Instituto Reina Sofía de Investigación - Hospital Universitario Central de Asturias - Universidad de Oviedo - REDinREN del Instituto de Salud Carlos III - Oviedo (España)

² Servicio de Cirugía Cardíaca - Área del Corazón - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

³ Servicio de Cardiología - Área del Corazón - Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (España)

⁴ Servicio de Cirugía Cardiovascular - Hospital Universitario Miguel Servet - Zaragoza (España)

Asociación del polimorfismo 1G>2G de la MMP1 con calcificación de la válvula aórtica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000400003>

Correspondencia: M^a Isabel Rodríguez García - Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral - Hospital Universitario Central de Asturias - Edificio FINBA - Avda. de Roma, s/n - 33011 Oviedo (España)

Correo electrónico: irodriguez@hca.es

Fecha de recepción: 29/01/2016

Fecha de aceptación: 06/06/2016

Trabajo premiado con una beca de Investigación Básica FEIOMM 2013.

Resumen

Introducción: La causa más frecuente de estenosis aórtica es la acumulación activa de calcio en los velos valvulares, lo que conlleva graves consecuencias clínicas. Diversas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) han sido implicadas en el desarrollo de esta enfermedad. Por ello, se estudió la posible asociación entre un polimorfismo funcional de MMP1 y la cantidad de calcio depositado en la válvula aórtica.

Pacientes y métodos: Se incluyeron en el estudio 45 pacientes sometidos a reemplazo valvular. El contenido en calcio de los velos de las válvulas extraídas en la cirugía se determinó mediante microtomografía computarizada. De muestras de sangre periférica se extrajo ADN para genotipar el polimorfismo -1607 1G>2G de MMP1 por PCR y posterior digestión.

Resultados: Se observaron diferencias significativas en el contenido en calcio de las válvulas aórticas en individuos con distintos genotipos de -1607 1G>2G ($p=0,042$). Así, los portadores del alelo 2G (en homocigosis o heterocigosis) presentan valores más altos de calcio medido tanto como DMO ($p=0,004$) como BV/TV ($p=0,002$). La asociación con BV/TV fue independiente del sexo, la edad, el grado de función renal y la anatomía de la válvula ($p=0,02$), y se observó también una tendencia con la DMO ($p=0,07$).

Conclusión: La asociación entre el polimorfismo 1G>2G de MMP1 y el contenido en calcio de la válvula aórtica sugiere que el alelo 1G tendría un efecto protector ante el depósito de calcio. Estos resultados apoyarían la importancia de ampliar el estudio para confirmar si este polimorfismo se podría usar como un posible predictor del desarrollo de estenosis aórtica.

Palabras clave: *valvulopatía aórtica, metaloproteasa de matriz extracelular, polimorfismos, microCT, contenido en calcio.*

The association of MMP1 1G>2G polymorphism with aortic valve calcification

Summary

Introduction: The most common cause of aortic stenosis is active calcium accumulation in the valve cusps, which implies serious clinical consequences. Various extracellular matrix metalloproteases (MMPs) have been implicated in the development of this disease. Therefore, the possible association between a functional MMP1 polymorphism and the amount of calcium deposited on the aortic valve is studied.

Patients and methods: 45 patients undergoing valve replacement were included in the study. The calcium content in valve cusps removed during surgery was determined by computed micro-tomography. DNA was extracted from peripheral blood samples for genotyping the -1607 1G>2G polymorphism of MMP1 by PCR and subsequent digestion.

Results: Significant differences were observed in the calcium content in aortic valves in individuals with different -1607 1G>2G genotypes ($p=0.042$). Thus, 2G allele carriers (homozygous or heterozygous) present higher calcium levels measured as BMD ($p=0.004$) as well as BV/TV ($p=0.002$). The association with BV/TV was independent of sex, age, degree of renal function and anatomy of the valve ($p=0.02$). BMD tendency ($p=0.07$) was also observed.

Conclusion: The association between 1G>2G MMP1 polymorphism and calcium content of the aortic valve suggests that the 1G allele would have a protective effect against calcium deposits. These results support the importance of further study to confirm whether this polymorphism could be used as a possible predictor of aortic stenosis development.

Key words: aortic valve disease, matrix metalloproteinase polymorphisms, microCT, calcium content.

Introducción

La estenosis aórtica por degeneración es la valvulopatía más frecuente en los países desarrollados¹. Inicialmente considerada un proceso pasivo, en la actualidad se describe como una acumulación activa de calcio en los velos valvulares, acompañada de cambios en la morfología y función de las células valvulares, caracterizados por una marcada diferenciación osteoblástica que aumenta la rigidez valvular. Todo ello lleva a una reducción en el orificio de apertura de la válvula y un incremento en el gradiente de presión de sangre que la atraviesa, con graves consecuencias clínicas².

Existen numerosas evidencias que implican a las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) en este proceso³. Las MMPs constituyen una amplia familia de enzimas dependientes de zinc que ejercen su función tanto en condiciones fisiológicas como patológicas⁴. Tradicionalmente se han agrupado según su capacidad para degradar diversos componentes de la matriz extracelular, aunque también ejercen funciones en otras localizaciones. De hecho, de manera reciente se ha sugerido que actúan también sobre proteínas no relacionadas con la matriz y se destaca su papel en procesos inflamatorios^{5,6}. Además, se ha encontrado una mayor expresión de MMP-1, -2 y -3 en válvulas aórticas calcificadas que en válvulas aórticas normales, así como la presencia de MMP-9 exclusivamente en válvulas enfermas⁷.

La asociación de las MMPs con valvulopatías también se ha estudiado desde el punto de vista genético. Así, se ha descrito que el polimorfismo 1G>2G de la posición -1607 del gen MMP1 se asocia con la presencia de válvula aórtica bicúspide⁸. Este mismo

polimorfismo también se ha asociado con los niveles de densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas⁹. En función de los datos expuestos y con objeto de identificar un posible marcador precoz de enfermedad de la válvula aórtica calcificada, se estudió la asociación del polimorfismo 1G>2G con parámetros indicativos de mineralización en válvulas aórticas procedentes de reemplazo valvular.

Pacientes y métodos

Población

Se estudiaron las válvulas aórticas procedentes de 45 pacientes con diagnóstico de valvulopatía aórtica (91% estenosis, 9% insuficiencia) sometidos a recambio valvular aórtico entre abril de 2012 y mayo de 2014 en el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Universitario Central de Asturias. En la tabla 1 se muestran algunas características de mayor interés clínico, incluidos factores de riesgo cardiovascular.

Se consideró fumador actual a cualquier individuo fumador activo durante el último año, ex-fumador a aquel individuo que haya abandonado el hábito tabáquico en un periodo mayor a un año y no fumador a aquella persona que nunca haya adquirido el hábito tabáquico. La dislipemia se definió de acuerdo al cumplimiento de alguno de los siguientes criterios: historia de hiperlipidemia diagnosticada y/o tratada con medicación, dieta y/o ejercicio, cifras de colesterol total superior a 200 mg/dl, colesterol-LDL superior o igual a 130 mg/dl, colesterol-HDL inferior a 40 mg/dl o tratamiento hipolipemiente. La hipertensión arterial se definió como el cumplimiento de alguno de los siguientes criterios: historia de hipertensión diagnosticada o

tratada con medicación, dieta y/o ejercicio; presión arterial sistólica igual o superior a 140 mmHg o diastólica igual o superior a 90 mmHg, al menos en dos determinaciones; o tratamiento antihipertensivo que no es administrado como terapia a otra alteración distinta a la hipertensión arterial. Se consideró la existencia de diabetes *mellitus* en función de la presencia de alguna de las siguientes premisas: historia de diabetes *mellitus* acreditada en un informe médico, glucemia en ayunas superior o igual a 200 mg/dl en cualquier situación y síntomas de diabetes *mellitus*, al menos dos determinaciones de glucemia en ayunas superiores o iguales a 126 mg/dl (entendiéndose como ayunas un periodo sin ingesta de al menos 8 horas) o utilización actual de tratamientos hipoglucemiantes orales y/o insulina. La estimación del filtrado glomerular se realizó mediante la ecuación MDRD-4. La clasificación de la anatomía valvular se realizó en base a los hallazgos intraoperatorios, además de la descripción ecocardiográfica previa a la cirugía.

Los tejidos extraídos durante la intervención fueron tratados durante 24 h con formol al 4% y, tras varios lavados con agua, conservados en etanol 70% a 4°C en el Biobanco del Principado de Asturias. También se extrajo una muestra de sangre periférica en tubo con EDTA, que fue procesada en el Biobanco para la extracción del ADN genómico, que fue almacenado a -20° C hasta su utilización. Los pacientes firmaron un consentimiento informado para la utilización de sus muestras biológicas y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias.

Genotipado

El polimorfismo 1G>2G en la posición -1607 del gen MMP1 (rs1799750) fue genotipado por reacción en cadena de la polimerasa y posterior digestión con un enzima de restricción (PCR-RFLP), siguiendo un procedimiento descrito previamente¹⁰.

Cuantificación del contenido en calcio del velo aórtico

Las muestras de tejido valvular conservadas en etanol fueron analizadas mediante microtomografía computarizada (microCT) en un equipo SkyScan 1174 (Bruker, Kontich, Bélgica) disponible en el Bioterio de la Universidad de Oviedo. Las imágenes fueron obtenidas utilizando unos parámetros de 50 kV y 800 µA. Se obtuvieron unas 1.300 imágenes de cada una de las muestras con un paso de rotación de 0,3° y un promedio de marco de 2 para un escaneo de 180°. El escaneo de cada una de ellas duró

Tabla 1. Características clínicas y antropométricas de la población estudiada

Características	Valores
Edad ^a (años)	69±11
Hombres	63%
Fumadores	17,4%
Dislipemia	43,5%
Hipertensión	67,4%
Diabetes	21,7%
MDRD-4 ^b (ml/min)	82±28
Válvula aórtica bicúspide	20%

^a media ± desviación estándar.

^b filtrado glomerular en ml/min/1,73 m² (media ± desviación estándar).

entre 10 y 20 minutos (dependiendo del tamaño de la válvula) usando un tiempo de exposición de 6.200 ms. Se realizó la corrección de campo plano al principio de cada escaneo.

Las imágenes obtenidas fueron reconstruidas con el programa informático NRecon (Bruker) (Figura 1). Los valores de corrección del coeficiente de atenuación, dureza del rayo, suavizado y artefactos de anillo fueron los mismos en todas las muestras.

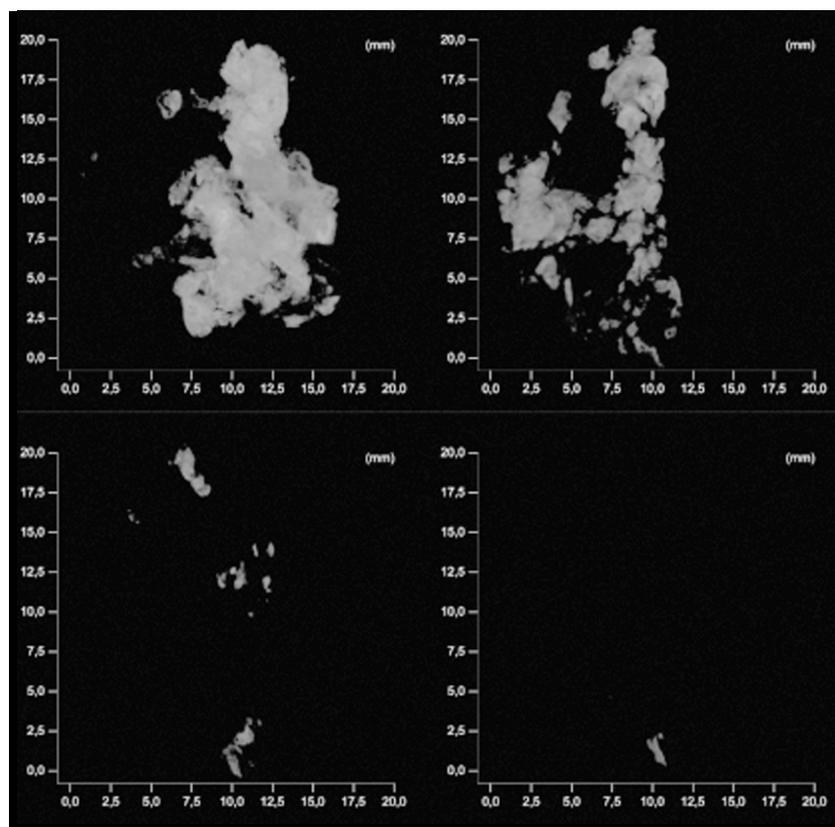
El análisis morfométrico en 3D fue realizado mediante el programa informático CTAn (Bruker). El volumen de interés fue delimitado manualmente en cada una de las muestras. El umbral que se usó para todas ellas fue de 0,74-3,39 g/cm³ de densidad mineral ósea (DMO).

Se consideraron los parámetros de DMO y el cociente volumen óseo/volumen total (BV/TV) como medidas de la cantidad de calcio depositado.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa informático SPSS versión 15.0. En primer lugar se confirmó que las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo estuviesen en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba χ^2 . Se utilizó una prueba ANOVA para comparar los valores medios de los parámetros estudiados en los diferentes genotipos y, posteriormente, un test de Bonferroni para discriminar a qué parejas de genotipos se debía la significación estadística. Seguidamente, en función de estos resultados, se agruparon los genotipos en dos categorías cuyos valores medios para la DMO y el BV/TV se compararon mediante una prueba T. Por último, se realizó un análisis de regresión lineal corregido por las variables sexo, edad, filtrado glomerular medido utilizando la fórmula MDRD-4 y presencia de válvula aórtica bicúspide. Un p-valor <0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Figura 1. Imágenes obtenidas tras el análisis mediante microtomografía computarizada (microCT) de los velos valvulares aórticos. Se muestran 4 ejemplos de velos valvulares con distintos grados de calcificación



Resultados

Los individuos analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo -1607 1G>2G, con una frecuencia de 0,49 para el alelo minoritario (1G en nuestra población), similar a la de otras poblaciones europeas (dbSNP).

Se calcularon los valores medios de DMO y BV/TV en los grupos de población definidos por los distintos genotipos para el polimorfismo -1607 de MMP1 y se encontraron diferencias en ambas variables, aunque éstas eran estadísticamente significativas sólo en el caso del BV/TV (Tabla 2).

Mediante un análisis *post hoc* se comprobó que presentaban diferencias significativas los individuos homocigotos para el alelo 2G frente a los homocigotos para 1G ($p=0,042$), con valores de contenido en calcio en los individuos heterocigotos similares a los de los homocigotos para el alelo 2G. Así, aplicando un modelo de herencia recesiva para el efecto del alelo 1G, se comprobó que los portadores del alelo 2G presentaban valores significativamente más altos de contenido en calcio en la válvula aórtica (3 veces en la DMO y 2 veces en el BV/TV) que los no portadores (valores de DMO de $62,52 \pm 10,99$ mg/cm³ en portadores del alelo 2G frente a $20,08 \pm 8,54$ mg/cm³ en homocigotos para el alelo 1G; y valores de BV/TV de $5,44 \pm 0,62\%$ en portadores del alelo 2G frente a $2,52 \pm 0,59\%$ en homocigotos para el alelo 1G) (Figura 2). Estas diferencias significativas se mantuvieron para los niveles de

BV/TV tras el ajuste por sexo, edad, presencia de válvula aórtica bicúspide y filtrado glomerular ($p=0,021$), manteniendo la tendencia, aunque sin llegar a ser significativa, para los niveles de DMO ($p=0,073$).

Discusión

Este estudio es el primero en el que se describe una asociación entre un polimorfismo del gen MMP1 y la cantidad de calcio presente en las válvulas aórticas. La literatura recoge diversas asociaciones de variantes de este gen con otras afecciones cardiovasculares¹¹⁻¹³. Entre estas variantes, una de las más estudiadas es el polimorfismo 1G>2G en la región promotora del gen, pues el alelo de la inserción confiere una mayor actividad transcripcional¹⁴ que puede tener efectos en la célula y, por tanto, en el organismo. Así, se observó un incremento significativo del riesgo de padecer aterosclerosis en la arteria carótida en individuos portadores del alelo 2G¹⁵ y una mayor presencia de este alelo en pacientes que habían sufrido ictus isquémico¹⁶.

Sin embargo, hasta ahora no se habían descrito asociaciones de este polimorfismo y la enfermedad de la válvula aórtica calcificada, a pesar de que las MMPs juegan un papel importante en su fisiopatología^{17,18}.

Dos aspectos importantes en el desarrollo de la enfermedad de la válvula aórtica calcificada son la inflamación y el remodelado de la matriz extracelular⁵. Ambos son modulados por las células intersticiales de la válvula (VIC), las cuales pasan de un estado de reposo en el que conservan la homeostasis tisular, a un estado activado en el que toman características de miofibroblastos¹⁹. Las VIC activadas responden a la inflamación secretando, entre otros muchos factores, MMPs, lo que contribuirá a la acumulación de tejido fibroso desorganizado, a mantener las válvulas en un estado de inflamación crónica e inducirá la diferenciación osteoblástica de las VIC. Este último acontecimiento favorecería y aceleraría el depósito de calcio, que tendría como consecuencia la reducción de la función valvular²⁰.

La interacción entre las células y la matriz extracelular que las contiene es fundamental en la fisiología y funcionalidad del tejido valvular y puede afectar al fenotipo de las VIC³. La matriz extracelular de las válvulas cardiacas está constituida hasta en un 90% por colágeno y, de hecho,

un depósito excesivo de la proteína, acompañado de un alineamiento alterado de sus fibras, incrementa la rigidez del tejido²¹. Existen diversos estudios en los que se ha demostrado el papel crucial del colágeno en la calcificación de las válvulas aórticas²²⁻²⁴. En concreto, en cultivo *in vitro* de velos de válvula aórtica porcina tratados con colagenasa se observó un aumento en la cantidad de colágeno y, simultáneamente, una disminución en

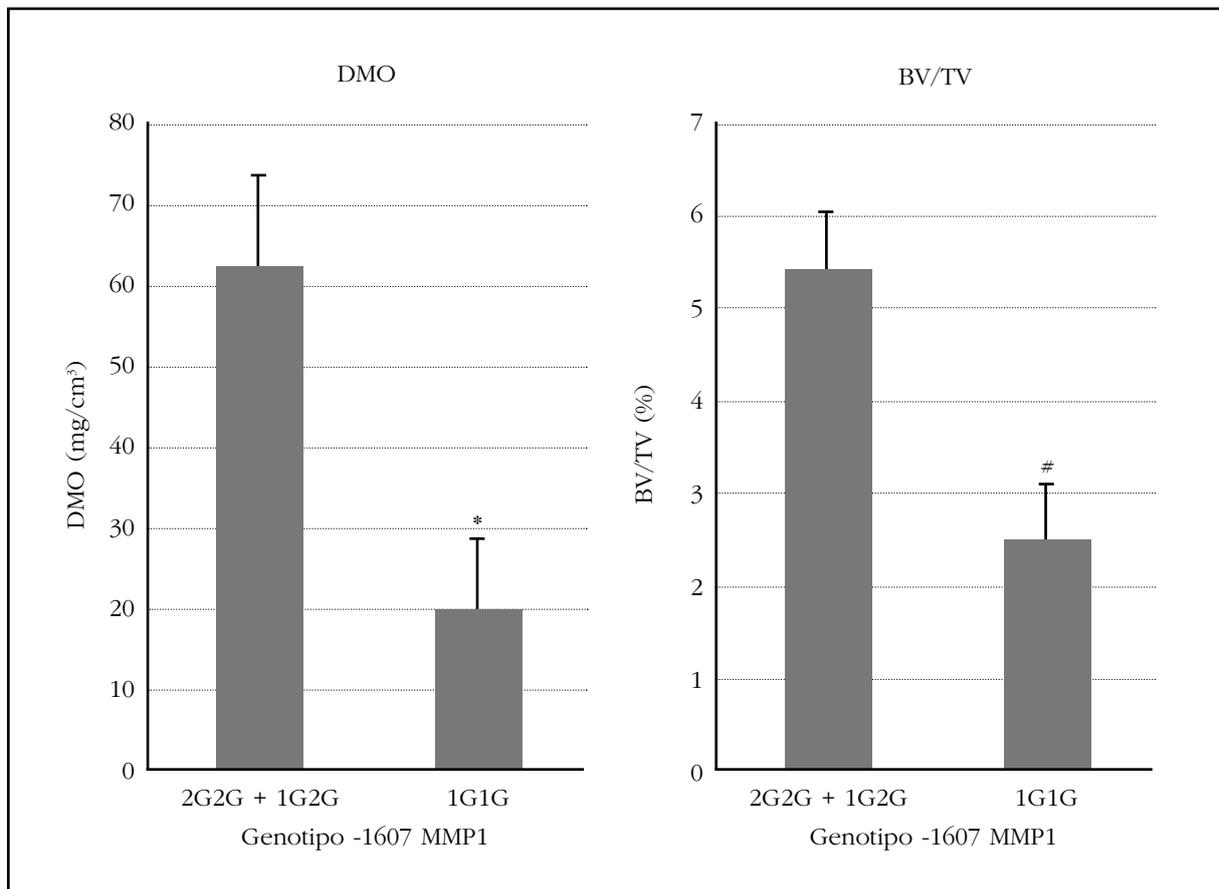
la cantidad de otros componentes de la matriz extracelular como el ácido hialurónico²⁵. Asimismo, se detectó un incremento tanto en la proliferación como en la apoptosis de las VIC, las cuales expresaron marcadores asociados a un fenotipo de miofibroblasto (alfa-actina de músculo liso) y de osteoblasto (fosfatasa alcalina, osteocalcina y sialoproteína ósea) resultando en un aumento de la mineralización del tejido²³.

Tabla 2. Valores de DMO y BV/TV para cada genotipo del polimorfismo -1607 de MMP1

Genotipo -1607 MMP1	DMO (mg/cm ³)	BV/TV (%)
2G2G (N=13)	66,72±65,31	5,87±3,76
1G2G (N=20)	59,79±63,22	5,16±3,51
1G1G (N=12)	20,08±29,59	2,52±2,03
Total (N=45)	51,20±58,96	4,66±3,46
p-valor	0,095	0,033

Los datos se representan como media ± desviación estándar. P-valor obtenido mediante ANOVA.

Figura 2. Valores de DMO y BV/TV para los genotipos de -1607 de MMP1 según un modelo de herencia recesiva para el alelo 1G. Se representa media ± error estándar. *p=0,004; #p=0,002



La MMP-1, también conocida como colagenasa de fibroblastos, degrada los tipos de colágeno intersticial I, II y III. En consecuencia, el incremento de su actividad favorecería la destrucción de colágeno, la diferenciación osteoblástica y la calcificación. Los resultados experimentales obtenidos en este estudio sustentan este razonamiento, asociándose las mayores cantidades de calcio en las válvulas a aquellos individuos portadores del alelo que produce una mayor transcripción del gen y, consecuentemente, una mayor cantidad de proteína MMP-1. Visto de otro modo, la falta del efecto protector que ejercería en los pacientes una menor transcripción (proporcionada por el alelo menos activo) facilitaría el desarrollo de calcificación en la válvula aórtica.

Una limitación de este trabajo es que el número de pacientes estudiados es reducido y además se trata de un estudio transversal. No obstante, se ha constatado la asociación con el polimorfismo 1G>2G, sugiriendo un efecto protector del alelo 1G que será necesario comprobar en muestras de mayor tamaño y en otras poblaciones con objeto de comprobar si este hallazgo podría utilizarse en el futuro como predictor de calcificación y estenosis valvular aórtica.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Financiación: Trabajo financiado en parte por el proyecto del Instituto de Salud Carlos III PI10/00173-Fondos FEDER.

Bibliografía

1. Jung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:162-72.
2. Towler DA. Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circ Res.* 2013;113:198-208.
3. Wang H, Leinwand LA, Anseth KS. Cardiac valve cells and their microenvironment--insights from in vitro studies. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11:715-27.
4. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015;44-46:1-6.
5. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:617-29.
6. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kiliç R, et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:80-7.
7. Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol.* 2000;9:281-6.
8. Martín M, Pichel IA, Florez Muñoz JP, Naves-Díaz M, Palacín M, Cannata-Andía JB, et al. Low transcriptional activity haplotype of matrix metalloproteinase 1 is less frequent in bicuspid aortic valve patients. *Gene.* 2013;524:304-8.
9. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density. *Matrix Biol.* 2002;21:389-92.
10. Roman-García P, Coto E, Reguero JR, Cannata-Andía JB, Lozano I, Avanzas P, et al. Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron Artery Dis.* 2009;20:383-6.
11. Han Y, Wu Z, Zhang X, Yan C, Xi S, Yang Y, et al. Impact of matrix metalloproteinase-1 gene variations on risk of acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis.* 2008;19:227-30.
12. Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res.* 2006;69:636-45.
13. Pearce E, Tregouet DA, Samnegard A, Morgan AR, Cox C, Hamsten A, et al. Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Circ Res.* 2005;97:1070-6.
14. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* 1998;58:5321-5.
15. Djuric T, Stojkovic L, Zivkovic M, Končar I, Stanković A, Djordjević A, et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter genotypes and haplotypes are associated with carotid plaque presence. *Clin Biochem.* 2012;45:1353-6.
16. Chehaibi K, Hrira MY, Nouria S, Maatouk F, Ben Hamda K, Slimane MN. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population. *J Neurol Sci.* 2014;342:107-13.
17. Fondard O, Detaint D, Jung B, Choqueux C, Adle-Biasette H, Jarraya M, et al. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J.* 2005;26:1333-41.
18. Soini Y, Satta J, Maatta M, Autio-Harmainen H. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol.* 2001;194:225-31.
19. Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol.* 2009;174:1109-19.
20. Li C, Xu S, Godlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22:1-8.
21. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation.* 2011;124:1783-91.
22. Rodriguez KJ, Masters KS. Regulation of valvular interstitial cell calcification by components of the extracellular matrix. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90:1043-53.
23. Rodriguez KJ, Piechura LM, Porras AM, Masters KS. Manipulation of valve composition to elucidate the role of collagen in aortic valve calcification. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:29.
24. Eriksen HA, Satta J, Risteli J, Veijola M, Väre P, Soini Y. Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis.* 2006;189:91-8.