

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Mediche Specialistiche

Ciclo 27°

Settore Concorsuale di afferenza: 06/E1

Settore Scientifico disciplinare: Med. 23

TITOLO TESI

STUDIO SUL RUOLO DEI FATTORI GENETICI COINVOLTI NELLA VALVOLA
AORTICA BICUSPIDE E/O NELL'ANEURISMA DELL'AORTA TORACICA

Presentata da: Dr. DAVIDE PACINI

Coordinatore Dottorato

Prof. Sandro Mattioli

Relatore

Prof. Gaetano Gargiulo

Esame finale anno 2014-2015

INDICE

Introduzione	3
Capitolo 1	4
1.1 Definizione e cenni storici	4
1.2 Anatomia: embriologia e classificazione	5
1.3 Aortopatia ed aneurismi dell'aorta toracica	7
1.4 Classificazione delle BAV	10
Capitolo 2	14
2.1 Le basi genetiche della BAV e dell'aortopatia	14
2.2 Il gene ACTA2	17
Capitolo 3	21
3.1 Introduzione allo studio	21
3.2 Materiali e metodi	21
3.3 Risultati	29
3.4 Discussione	38
Conclusioni	42
Bibliografia	43

Introduzione

La Valvola Aortica Bicuspide (BAV) costituisce la più comune anomalia cardiaca congenita dell'adulto, la cui incidenza stimata è dello 0,5-2% nella popolazione generale. Il termine BAV si riferisce ad un gruppo eterogeneo di disordini caratterizzati da uno spettro di alterazioni della valvola aortica a cui si associano alterazioni a carico della aorta, difetti cardiaci congeniti e sindromi genetiche. Si caratterizza per la presenza di due cuspidi valvolari aortiche anziché tre e comprende diverse varianti anatomiche. Generalmente la BAV è normofunzionante anche se presenta un rischio aumentato, rispetto alla valvola tricuspide, di sviluppare una valvulopatia (stenosi e/o insufficienza) o una endocardite.

Le dilatazioni aortiche associate a BAV generalmente insorgono in età più giovanile e aumentano di dimensioni più velocemente rispetto a quelle legate ad altre eziologie.

Quando la valvola diventa severamente malfunzionante, l'intervento chirurgico riparativo è indicato. Il trattamento consiste nella sostituzione valvolare aortica o, qualora possibile, nella sua riparazione ed eventualmente nel trattamento delle lesioni associate. Le indicazioni sono simili ai pazienti con valvola aortica tricuspide. Particolare attenzione va tuttavia usata per i pazienti ad alto rischio cioè pazienti con storia familiare per dissezione o rottura aortica.

Varie ipotesi eziopatogenetiche sono state proposte, ma tuttora non è ben chiara la causa principale. Così come i fenotipi BAV sono molto variabili, le eziologie genetiche di BAV sono altrettanto molteplici e variano da forme ereditarie complesse nei casi familiari, a forme senza alcuna prova di ereditarietà nei casi sporadici.

Capitolo 1

1.1 Definizione e cenni storici

La valvola aortica bicuspid (Bicuspid Aortic Valve – BAV) è un'alterazione congenita della valvola aortica che risulta composta da due cuspidi. Frequentemente si possono individuare due piccole rudimentali cuspidi fuse tra loro; la commissura tra queste, che generalmente si presenta fusa e ad altezza anomala, viene chiamata raphe.

La valvola aortica bicuspid è la più frequente tra le cardiopatie congenite, con una prevalenza dello 0.5-2% nella popolazione generale. La trasmissione avviene per via sporadica, in modo autosomico dominante, con prevalenza nel sesso maschile (rapporto maschi/femmine = 4/1) ¹⁻⁶.

I primi studi sulle alterazioni congenite cardiache risalgono al IV secolo d.C. per opera di Aristotele. In seguito numerosi ricercatori furono impegnati nello studio della fisiopatologia cardiaca. Sicuramente il più celebre fu Leonardo da Vinci (1452-1519), il quale non si limitò allo studio morfologico e funzionale della valvola aortica ma riuscì a ideare diagrammi di funzionamento della valvola aortica e dell'unità anatomico-funzionale che essa costituisce assieme all'aorta ascendente (Figura 1). Leonardo descrisse in maniera accurata il meccanismo di chiusura della valvola e cercò anche di ideare un primo modello di valvola artificiale⁷.

Solo nel XIX secolo furono descritte ampiamente le caratteristiche anatomiche e le degenerazioni sclerotiche, senza però distinguere le forme acquisite da quelle congenite^{7,8}.



Figura 1. Disegni di Leonardo sull'anatomia e fisiologia della valvola aortica.

1.2 Anatomia e Embriologia

La valvola aortica bicuspidale presenta due cuspidi di diverse dimensioni (principalmente correlata alla “fusione” di due cuspidi che risulta più ampia), con margini usualmente lisci, eccetto che per il sovrapporsi di fenomeni degenerativi o post-endocarditici, e la presenza di un rafe che non è tuttavia presente nella totalità dei pazienti. Il rafe corrisponde alla regione di fusione delle cuspidi, non contiene tessuto valvolare e può variare in estensione. Sono disponibili diverse classificazione basate sulle componenti della cuspidale “fusa” o sull’orientamento delle cuspidi, ai quali viene descrittivamente associata la presenza del rafe (Figura 2).

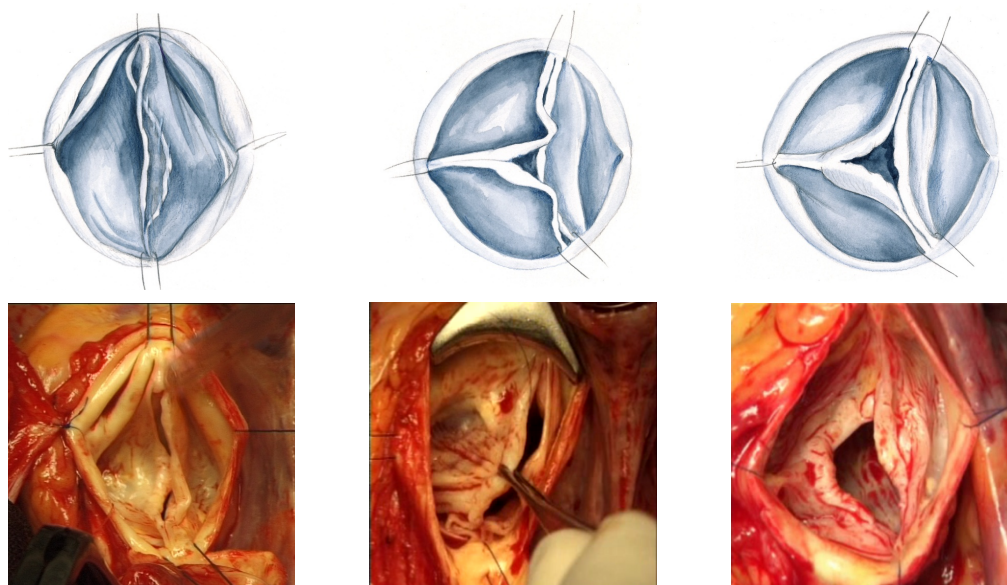


Figura 2. Esempi di tre valvole aortiche bicuspidale con le relative immagini intraoperatorie.

Diversamente da quanto ritenuto in passato, la BAV è più frequentemente associata alla presenza di 3 seni di Valsalva (e non di 2), essendo pertanto la presenza di un triangolo sottocommissurale o interleaflet rudimentale, o l’assenza di uno dei 3 triangoli sottocommissurali, il vero marcatore anatomico della BAV^{5,9-11}.

Si deve quindi specificare che esiste uno spettro continuo di BAV che varia dalla completa assenza di una commissura, con evidenti solo 2 cuspidi e 2 seni di Valsalva, fino al “sottosviluppo” di 1 o 2 commissure e delle cuspidi

relative, che si realizza nella maggioranza dei pazienti, presentandosi spesso con un rafe. Pertanto la diagnosi di BAV non è sempre agevole durante gli accertamenti diagnostici, in particolare con ecocardiografia transtoracica, anche in pazienti senza degenerazione calcifica delle cuspidi.

Il fenotipo più frequente di BAV è rappresentato dalla fusione della cuspidi coronarica destra con la sinistra, ed è riportata nel 60% dei casi. La fusione della cuspidi coronarica destra e non coronarica è presente nel 10-15% dei casi, mentre la fusione tra la cuspidi coronarica sinistra e non coronarica è stata osservata con una frequenza del 5%¹²⁻¹⁷.

I triangoli interleaflet spesso sono più piccoli di quelli normali e in questo modo contribuiscono ad una ridotta mobilità delle cuspidi.

Gli osti coronarici, in particolar modo l'ostio coronarico destro, presentano dislocazioni a livello dei seni di Valsalva; la parete aortica può presentare alterazioni riguardanti la struttura delle tonache costituenti.

Dal punto di vista embriogenetico, è stato recentemente ipotizzato che le due più comuni varianti di BAV possano riconoscere embriogenesi diverse¹⁶. Il tipo 1 rappresenterebbe l'esito di un difetto di settazione del tratto di efflusso embrionario, mentre il tipo 2 deriverebbe da un difetto di formazione dei cuscinetti endocardici che costituiscono il tratto di efflusso embrionario. Nell'embriogenesi della BAV tipo 1, un ruolo importante è stato riconosciuto alle cellule derivate dalle creste neurali, mentre le anomalie di embriogenesi della BAV tipo 2 sono state descritte in ceppi di topo knock-out per il gene dell'ossido nitrico-sintetasi. Poiché alcuni studi hanno mostrato differenze sul destino della BAV in termini di disfunzione valvolare, di funzione aortica e di degenerazione di parete aortica in base alla morfologia, futuri studi clinici e sperimentali dovranno tenere conto della morfologia della BAV in virtù delle premesse embriologiche descritte¹⁸.

1.3 Aortopatia ed aneurismi dell'aorta toracica

Varie patologie non cardiache sono associate alla valvola aortica bicuspidale, ed occorrono in più del 50% degli adulti con BAV, la più frequente delle quali è la dilatazione dell'aorta toracica (Figura 3). L'associazione con questa patologia può raggiungere il 30-70% dei pazienti con valvola aortica bicuspidale¹⁹⁻²³.

Il primo a descrivere l'associazione tra la bicuspidia e gli aneurismi dell'aorta toracica (TAA) fu Abbott²⁴ nel 1928.

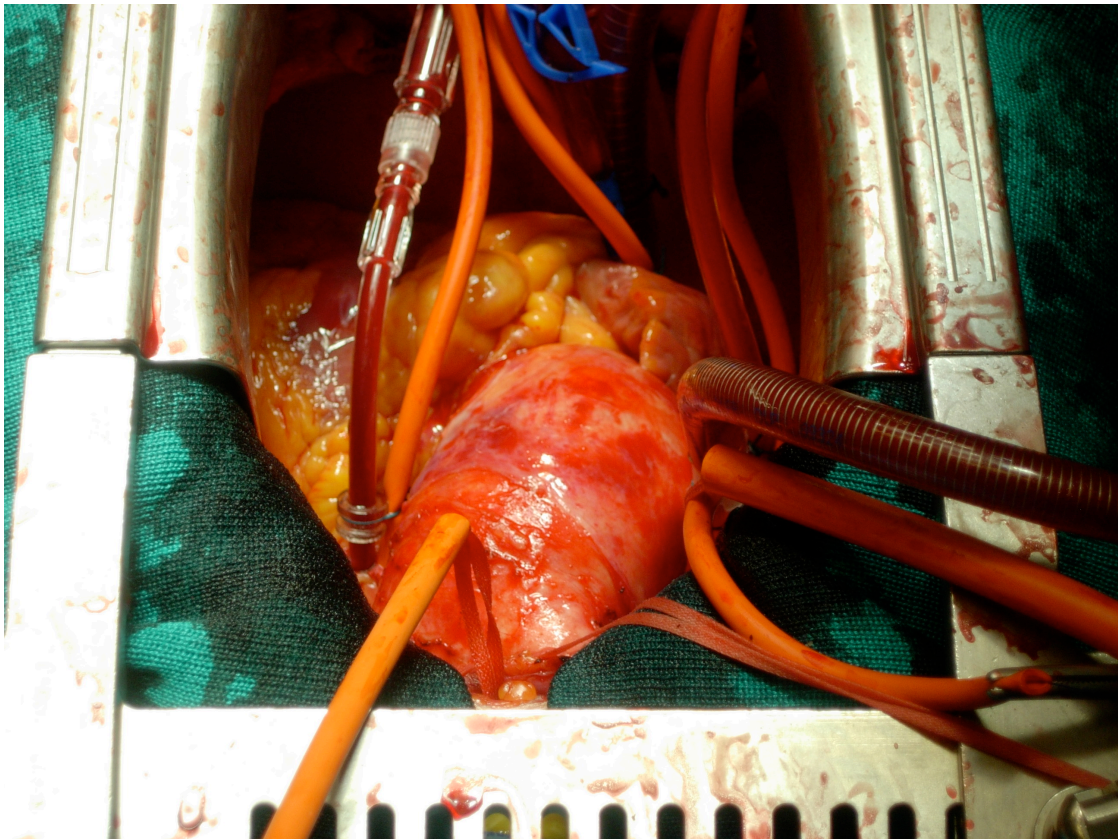


Figura 3. Fotografia intraoperatoria di aneurisma dell'aorta ascendente associato a valvola aortica bicuspidale.

La dilatazione dell'aorta ascendente rappresenta un fattore di rischio importante per dissezione e rottura, entrambi cause importanti di mortalità e morbilità nei pazienti portatori di BAV.

I primi studi a questo riguardo hanno osservato un rischio di dissezione in questi pazienti nove volte superiore rispetto alla popolazione normale^{25,26}. Le

limitazioni di questi studi osservazionali sono dovute al fatto che le osservazioni si basano su dati autoptici.

Studi più recenti hanno ridimensionato questo dato seppur confermando un aumentato rischio di dissezione nei pazienti con BAV^{26,27}.

Nel 1972 è stata descritta l'associazione tra la valvola aortica bicuspidale e medio necrosi cistica²⁸ confermata successivamente da vari studi^{29,30}.

Si tratta di una patologia della tonaca media che consiste nella perdita di cellule del muscolo liscio in assenza di un processo infiammatorio, frammentazione delle fibre elastiche e accumulo della sostanza basofila con aree di necrosi cellulare.

Gli studi hanno dimostrato che vi sono alterazione della tonaca media della parete aortica anche in assenza della disfunzione valvolare, alterazioni osservate anche nel tronco dell'arteria polmonare, confermando così la teoria dell'esistenza della patologia intrinseca sottostante³¹⁻³³. Le alterazioni istologiche della parete aortica, riscontrate nei pazienti con BAV (Figura 4), sono simili a quelle presenti nei pazienti con la sindrome di Marfan, anche se quest'ultimi presentano alterazioni di grado superiore^{34,35}.

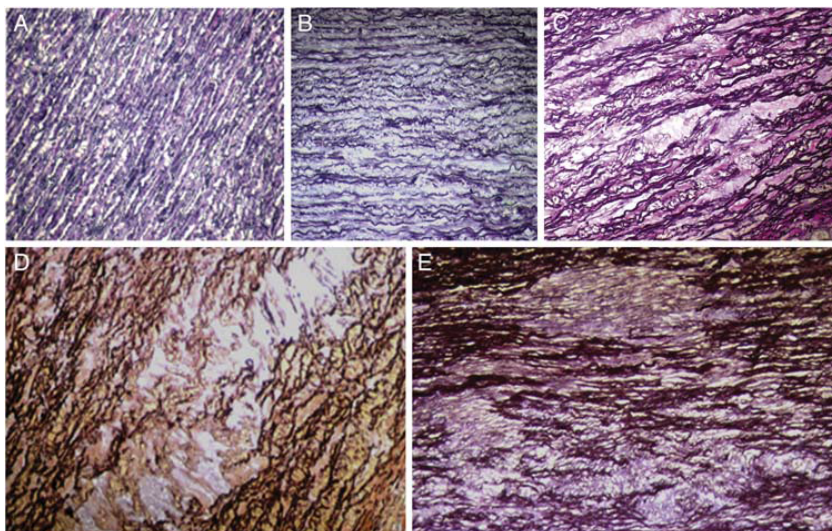


Figura 4. Gradi di malattia della tonaca media nei pazienti con valvola aortica bicuspidale. (A) grado 0; (B) grado 1; (C) grado 2; (D) grado 3; (E) grado 4. (Leone et al. Eur J Cardiothorac Surg. 2012;41(2):322-7)

Un aumento delle metalloproteinasi della matrice è stato associato ai processi di degenerazione della parete aortica. Questi enzimi fanno parte della grande famiglia delle endopeptidasi zinco-dipendenti e normalmente sono responsabili della degradazione della matrice extracellulare. Alcuni studi riportano

associazione tra i livelli elevati di MMP-9 nei pazienti con la dilatazione dell'aorta ascendente e la BAV^{36,37}.

Inoltre, alterazioni delle altre componenti la parte arteriosa, come le cellule muscolari lisce, in particolare l'actina e la miosina, influenzano negativamente la capacità contrattile delle stesse e potrebbero intervenire nello sviluppo di dilatazioni patologiche dei vasi arteriosi stessi.

Il fenotipo BAV sembrerebbe predire il tipo e la localizzazione della dilatazione dell'aorta ascendente. I pazienti con fusione delle cuspidi destra e sinistra tipicamente presentano diametri dell'anulus e dei seni di Valsalva maggiori rispetto a quei pazienti con fusione delle cuspidi destra e non coronarica; viceversa, i diametri dell'arco aortico sono maggiori in questo secondo gruppo rispetto al primo^{15,16}.

La dilatazione del bulbo aortico può essere presente anche in età pediatrica, suggerendo che questo processo inizia precocemente nel corso della vita^{38,39}.

1.4 Classificazione delle BAV

Nel tentativo di ordinare la variabilità fenotipica, vari autori hanno proposto diverse classificazioni della valvola aortica bicuspid^{13,40,41}.

1.4.1 Classificazione morfologica

La BAV include differenti quadri morfologici, a loro volta correlati a differenti quadri emodinamici; Osler⁴² fu tra i primi ad identificare come elemento patologico centrale una malformazione commissurale, con fusione delle cuspidi e con frequente formazione di un rafe fibroso totale o parziale.

Una classificazione, basata sulle caratteristiche anatomiche della BAV, distingue le valvole in base alla presenza e al numero di alcune strutture (Figura 5)⁴¹:

Tipo 0: Definita "Perely", costituita dal completo sviluppo di due cuspidi valvolari, due seni e due commissure;

Tipo 1: Caratterizzata dal rudimentale sviluppo di tre cuspidi, tre seni e tre commissure. Tuttavia, la fusione di due cuspidi porta allo sviluppo di un rafe fibroso, lì dove si congiungono le stesse;

Tipo 1a: Nel quale l'area commissurale, vista dal ventricolo sinistro appare costituita da una dentellatura e non da uno spazio;

Tipo 1b: In cui il bordo della cuspidi "unificata" è maggiore dell'opposto;

Tipo 1c: In cui la distanza circonferenziale tra le cuspidi non è uguale;

Tipo 2: Caratterizzato dalla presenza di più di un rafe.

main category: number of raphes	0 raphe - Type 0		1 raphe - Type 1			2 raphes - Type 2
	21 (7)		269 (88)			14 (5)
I. subcategory: spatial position of cusps in Type 0 and raphes in Types 1 and 2	lat 13 (4)	ap 7 (2)	L-R 216 (71)	R-N 45 (15)	N-L 8 (3)	L-R/R-N 14 (5)
II. subcategory: V F I A N S L N S V C S U T B (I+S) L I A O No	6 (2)	1 (0.3)	79 (26)	22 (7)	3 (1)	6 (2)
	7 (2)	5 (2)	119 (39)	15 (5)	3 (1)	6 (2)
		1 (0.3)	15 (5)	7 (2)	2 (1)	2 (1)
			3 (1)	1 (0.3)		

Figura 5. Classificazione valvola aortica bicuspid secondo Sievers.

Una delle classificazioni più utilizzate, invece, riguarda le caratteristiche morfologiche evidenziabili all'esame ecocardiografico ed è basata sulla tipologia delle cuspidi fuse (Figura 6)¹⁶:

tipo 1: la fusione avviene tra la cuslide coronarica sinistra e la destra (BAV antero-posteriore);

tipo2: fusione tra la cuslide destra e la non coronarica (BAV destra-sinistra);

tipo 3: la fusione tra la cuslide non coronarica e cuslide sinistra (rara).

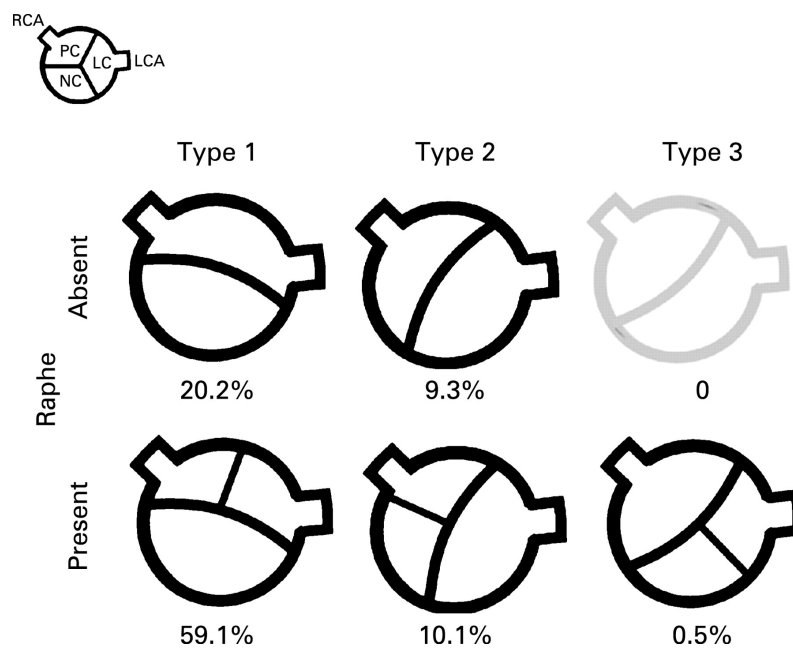


Figura 6. Classificazione valvola aortica bicuspidale secondo Schaefer.

1.4.2 Classificazione integrata

Una nuova classificazione delle BAV che associa alla descrizione della valvulopatia la descrizione della forma del bulbo aortico è stata proposta da Schaefer nel 2008¹⁶ (Figura 7).

Si ha quindi:

- **tipo N** (“normal” shape): il diametro dei seni di Valsalva è maggiore del diametro della giunzione sino-tubulare ed è maggiore o uguale del diametro dell’aorta ascendente;
- **tipo A** (ascending distension): il diametro dei seni di Valsalva è maggiore del diametro della giunzione sino-tubulare e minore del diametro dell’aorta ascendente;
- **tipo E** (“effaced”): il diametro dei seni di Valsalva è uguale o minore del diametro della giunzione.

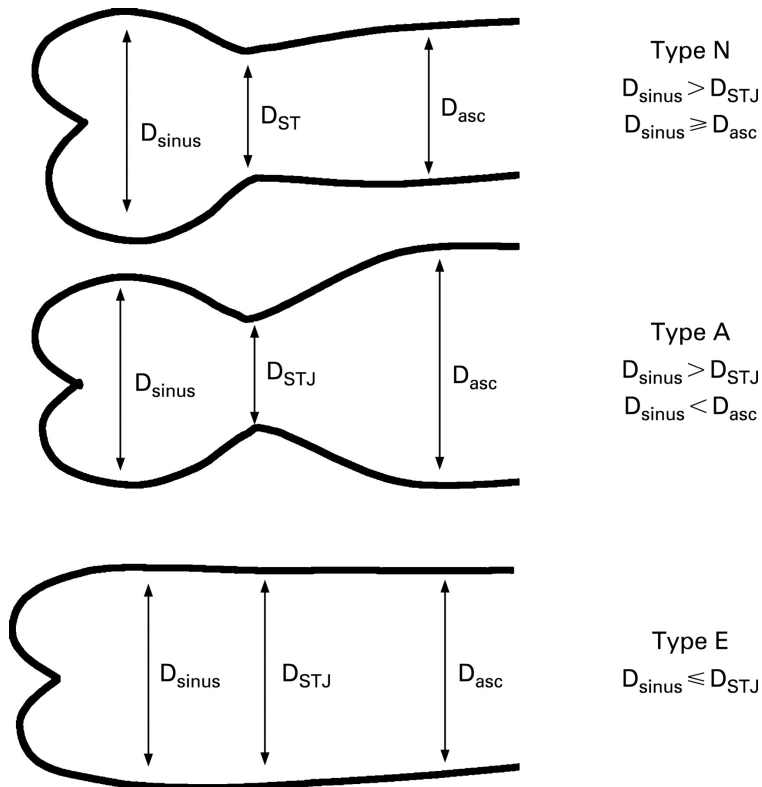


Figura 7. Classificazione morfologica della BAV con le alterazioni associate dell’aorta ascendente.

Nelle serie esaminate, i pazienti con la fusione delle cuspidi coronariche destra e sinistra più frequentemente hanno presentato una forma di tipo N, mentre la forma di BAV dove la fusione è avvenuta tra la cuspidi destra e non coronarica è stata associata con la forma A dell’aorta ascendente. Il tipo E

dell'aorta ascendente è stato osservato nel 5% dei pazienti con fusione delle cuspidi coronariche.

Altra classificazione è stata proposta da Fazel et al. in base al tipo di coinvolgimento dell'aorta ascendente⁴³. Nel gruppo I vi è dilatazione isolata del bulbo aortico, Nel gruppo II è presente la dilatazione isolata del tratto tubulare dell'aorta ascendente, nel gruppo III vi è la dilatazione di aorta ascendente e arco, mentre nel gruppo IV la dilatazione coinvolge il bulbo aortico, l'aorta ascendente e l'arco trasverso.

Recentemente sono stati introdotti i due nuovi sottogruppi: *Ia*, dove la giunzione sino tubulare è preservata, e *Ib*, dove la giunzione si presenta dilatata.

Capitolo 2

2.1 Le Basi genetiche della BAV e dell'aortopatia

Le alterazioni patologiche dovute a mutazioni di singoli geni che, oltre colpire l'aorta interessano altri organi e tessuti, sono definite forme sindromiche; se invece si limitano a coinvolgere la sola aorta o eventualmente altre arterie sono definite forme non sindromiche. In generale, circa il 20% dei casi di aneurismi dell'aorta toracica non sindromici sono familiari⁴⁴⁻⁴⁷. Mutazioni di alcuni geni possono produrre sia forme sindromiche sia forme non sindromiche di patologie dell'aorta toracica.

Una nuova classificazione delle patologie aortiche ereditarie prevede la suddivisione in gruppi in base alla funzione del gene coinvolto dalla mutazione e riconosce le seguenti classi:

- 1) Patologie dovute ad alterazioni di geni codificanti i componenti della matrice extracellulare (FBN1, COL3A1, COL4A5, EFEMP2);
- 2) Geni codificanti i componenti del signaling del TGF-B/BMP (TGFBR1, TGFBR2, SMAD3);
- 3) Geni codificanti i componenti della contrattilità delle cellule muscolari lisce vascolari (ACTA2, MYH11, MYLK, PRKG1, PKGI, FLNA);
- 4) Geni codificanti i componenti di altri percorsi di signaling (NOTCH1, JAG1, SLC2A10).

Numerose evidenze hanno suggerito una predisposizione genetica alla BAV. Infatti, sebbene la maggior parte dei pazienti con BAV non abbia anomalie extracardiache, BAV è presente anche in pazienti con sindromi genetiche conosciute (Figura 8).

TABLE 1 Human Genetic Syndromes That Include Bicuspid Aortic Valve			
Syndrome	Genetic Defect	Clinical Features	OMIM No.
Turner	Monosomy X	Short stature, infertility, coarctation	—
Loeys-Dietz	<i>TGFBR1</i> , <i>TGFBR2</i> mutations	TAAD, craniosynostosis, bifid uvula, skeletal defects	609192, 608967 (type 1) 610168, 610380 (type 2)
DiGeorge	22q11.2 deletion	Truncus arteriosus, tetralogy of Fallot, craniofacial defects	188400 (DiGeorge) 192430 (VCF)
Familial TAAD	<i>ACTA2</i> mutations (10%–15%)	TAAD, Premature coronary artery disease, cerebral aneurysms	607086 (AAT1) 607087 (AAT2) 132900 (AAT4) 608967 (AAT5) 611788 (AAT6) 613780 (AAT7) 614816 (LDS type 4)
Andersen-Tawil	<i>KCNJ2</i> mutations (60%)	Dysmorphic features, cardiac arrhythmias, periodic paralysis	170390 (LQTS 7)
Larsen	<i>FLNB</i> mutations	Craniofacial and skeletal defects	150250
Kabuki	<i>KMT2D</i> , <i>KDM6A</i> mutations (70%)	Mental retardation, hearing loss, coarctation	147920 (type 1) 300867 (type 2)

AAT = aortic aneurysm, familial thoracic; LDS = Loeys-Dietz syndrome; LQTS = long-QT syndrome; OMIM = Online Mendelian Inheritance in Man; TAAD = thoracic aortic aneurysms and dissections; VCF = velocardiofacial syndrome.

Figura 8. Varie sindromi genetiche che presentano una associazione con la valvola aortica bicuspidale.

La più alta penetranza di BAV nelle sindromi genetiche avviene in donne con sindrome di Turner, che è causata da una mancanza parziale o completa di un cromosoma X. L'incidenza di BAV è superiore al 30% delle donne con sindrome di Turner, e la prevalenza di coartazione, aneurismi aortici e dissezione aortiche è superiore rispetto alle forme sporadiche⁴⁸. Nella popolazione generale, la BAV è più frequente nei maschi (1-2%) rispetto alle femmine (0.5%)⁴⁹, suggerendo che la perdita di geni dal cromosoma X può predisporre allo sviluppo della BAV. Comunque i geni responsabili di questo effetto non sono stati identificati. L'associazione con altre cardiopatie congenite quali la sindrome del cuore sinistro ipoplasico, la coartazione aortica, difetti del setto interventricolare è ben nota, anche se il link genetico non è noto⁵⁰. Occasionalmente, la BAV dimostra una ereditarietà complessa in famiglie senza caratteristiche sindromiche. Una trasmissione autosomica dominante è stata osservata in alcuni alberi genealogici di terza generazione, ma nessun modello di singolo gene è in grado di spiegare chiaramente l'ereditarietà. La prevalenza di BAV nei parenti di primo grado di pazienti con BAV è 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Fattori ambientali, genetici ed epigenetici possono essere responsabili della variabile penetranza ed espressione fenotipica.

Attraverso l'analisi di linkage, che permette di determinare la posizione cromosomica di un locus responsabile di una determinata malattia, si sono scoperti multipli loci genetici per la BAV. I geni più significativamente associati sono localizzati sui cromosomi 3p22 (TGFB2), 5q15-21, 9q22.33 (TGFB1), 9q34-35 (NOTCH1), 10q23.3 (ACTA2), 13q33-qter, 15q25-q26.1, 17q24 (KCNJ2), 18q e 18q22.1⁵¹⁻⁵³. La maggior parte delle famiglie sono state identificate per aneurismi dell'aorta toracica e dissezione; la BAV è stata trovata incidentalmente in alcuni pazienti.

Tutti questi studi confermano che la BAV sia eterogenea dal punto di vista genetico e che nella sua formazione intervengano distinti geni ancora largamente sconosciuti. Il NOTCH1 rappresenta l'unico gene per la BAV che è stato isolato attraverso l'analisi di linkage, comunque è la causa di una minima parte dei casi familiari.

Nelle famiglie con BAV ereditaria, le mutazioni genetiche si correlano con caratteristiche specifiche e con la prognosi. Ad esempio, la mutazione del gene ACTA2 potrebbe causare una sindrome che può includere aneurismi aorta toracica, precoce coronaropatia e malattia cerebro-vascolare eventualmente associata a BAV. Le mutazioni del NOTCH1 predispongono a BAV con stenosi calcifica ma che non è associata a malattia aortica o ad altre patologie extracardiache. Inoltre, la BAV si presenta anche in un 20% di casi di sindrome di Loeys-Dietz⁵⁴. Comunque, la conoscenza di particolari mutazione all'interno di determinate famiglie può indirizzare i clinici a screenare per altri tipi di patologia sia i probandi che i familiari. Inoltre, più geni coinvolti nella genesi della BAV verranno scoperti, più informazioni genetiche influenzeranno le decisioni cliniche e terapeutiche dei pazienti portatori di BAV. Gli studi eseguiti su larghi numeri di pazienti con BAV e aneurismi dell'aorta toracica indicano che molti tipi di alterazioni genetiche contribuiscono al rischio di sviluppare queste complesse malattie, da polimorfismi che coinvolgono un singolo comune nucleotide a rare anomalie cromosomiche. Nella maggioranza dei pazienti, tutto l'onere delle varianti genetiche e dei fattori ambientali, rispetto ad una singola variante o classi di varianti, contribuiscono il rischio di aneurismi dell'aorta toracica.

L'architettura genetica della BAV verosimilmente dovrebbe consistere in svariate differenti varianti genetiche che interagiscono in maniera additiva nel determinare un aumento del rischio di BAV. La scoperta di geni determinanti lo sviluppo della BAV richiederà lo sviluppo di metodi complessi e combinati di diagnosi genetica quali, analisi di linkage, genome-wide association (GWA), ecc.

La ridotta penetranza e la variabile espressività rappresenta il maggior impedimento nell'identificazione di nuovi geni BAV nelle famiglie. Inoltre ci sono soggetti che trasmettono la BAV ai loro discendenti e che si pensa siano i portatori della mutazione genetica responsabile che possono loro stessi non essere portatori di BAV o possono avere altre anomalie cardiovascolari.

Sebbene la formazione di BAV è geneticamente determinata, il tasso di progressione a malattia clinicamente evidente o lo sviluppo di una patologia aortica può essere guidata dalla interazione di vari fattori genetici coinvolti nella BAV stessa, di fattori genetici coinvolti nello sviluppo della stenosi aortica della valvola tricuspidale e dei ben stabiliti fattori di rischio cardiovascolare quali il fumo, l'ipertensione e la dislipidemia.

L'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali nell'influenzare le complicazioni valvolari aortiche è evidente anche negli studi sperimentali. Nei topi è stata dimostrato che lo sviluppo stenosi valvolare aortica calcifica in valvola tricuspidale richiede sia modifiche dietetiche sia mutazioni genetiche specifiche⁵⁵.

Poiché la formazione di BAV e lo sviluppo di complicazioni relate coinvolge molti geni, lo sviluppo clinico di tests genetici per identificare pazienti a rischio per complicazioni correlate alla BAV come stenosi valvolare o aneurismi dell'aorta toracica richiederà molto tempo e ricerca.

2.2 IL GENE ACTA2

Il gene *ACTA2* è localizzato sul cromosoma 10q23.3. E' costituito da 9 esoni e codifica per l'alfa-actina delle cellule del muscolo liscio (Figura 9).

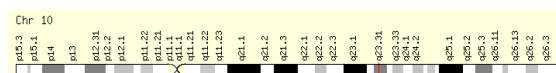


Figura 9. Schema del gene ACTA2.

Le actine costituiscono una famiglia di proteine citoscheletriche indispensabili per la funzione cellulare. Tutti i vertebrati codificano sei isoforme di actina tessuto-specifiche: due per le cellule muscolari striate (scheletriche (ACTA1) e cardiache (ACTC), due per le cellule muscolari lisce (SMCs) [vascolari (ACTA2) e viscerali (ACTG2)] e due per le cellule non muscolari (ACTB e ACTG1). All'interno del gruppo SMCs, l'ACTA2 è la più largamente rappresentata costituendo il 40% delle proteine cellulari totali ed il 70% di tutte le forme di actina (Figura 10).

L'ACTA2 non è necessaria per la formazione del sistema cardiovascolare, come è dimostrato sperimentalmente da Schildmeyer et al. in topi ACTA2 null⁵⁶, forse per l'espressione della forma scheletrica dell'ACTA1 che compensa la perdita di ACTA2. Comunque, nonostante l'aumento dell'ACTA1, la contrattilità

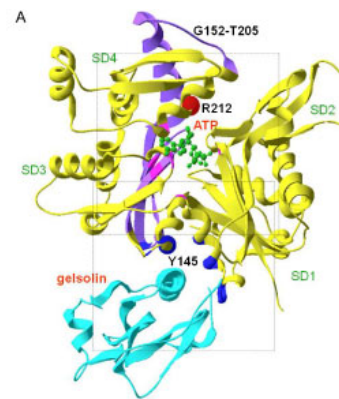


Figura 10. Struttura della proteina ACTA2.

vascolare risulta compromessa. La funzione principale delle cellule del muscolo liscio vascolare (SMCs) è la regolazione della pressione arteriosa e del flusso sanguigno tramite contrazione. La forza contrattile delle SMCs necessita dell'interazione ciclica tra SMC alfa-actina, codificata da ACTA2, e beta-miosina catena-pesante, codificata dal gene MYH11 localizzato nel cromosoma 16. Mutazioni che coinvolgono questo gene possono alterare le funzioni di queste proteine e predisporre a una varietà di patologie vascolari che includono gli aneurismi dell'aorta toracica, le dissezioni aortiche, sviluppo precoce di malattia coronarica e di stroke. Nel 2007 Guo et al.⁵⁷ hanno mostrato che mutazioni missenso in ACTA2 sono responsabili del 14% degli aneurismi e dissecazioni dell'aorta toracica (TAAD) ereditati; in 14 di 98 casi familiari di TAAD era possibile identificare una mutazione in ACTA2 da ritenere causativa del quadro di TAAD. Analisi strutturali e immunofluorescenza dei filamenti di actina nelle SMCs degli individui con mutazione in ACTA2 in eterozigosi hanno illustrato che queste mutazioni interferiscono con

l'assemblaggio dei filamenti di actina e di conseguenza potrebbero causare una diminuzione della contrazione.

Tessuto aortico degli affetti presentava degenerazione della tunica media, aree focali di iperplasia e disorganizzazione delle SMCs della media, e arterie stenotiche nella vasa vasorum per proliferazione delle SMCs. Questi dati, insieme a pubblicazioni precedenti che riportavano mutazioni nel gene MYH11 causative di TAAD familiare, indicano che la contrazione delle SMCs svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità strutturale dell'aorta ascendente^{58,59}.

Tra i segni clinici associati a mutazioni in ACTA2 si riportano livido reticularis e iris flocculi, anche se la prevalenza di queste caratteristiche non è stata determinata. In alcune famiglie, individui con mutazione nel gene ACTA2 possono inoltre presentare PDA oppure BAV. Infatti, in 2 delle 14 famiglie con mutazione nel gene ACTA2, descritte da Guo et al.⁵⁷ 3 pazienti mutati presentavano BAV (Figura 11).

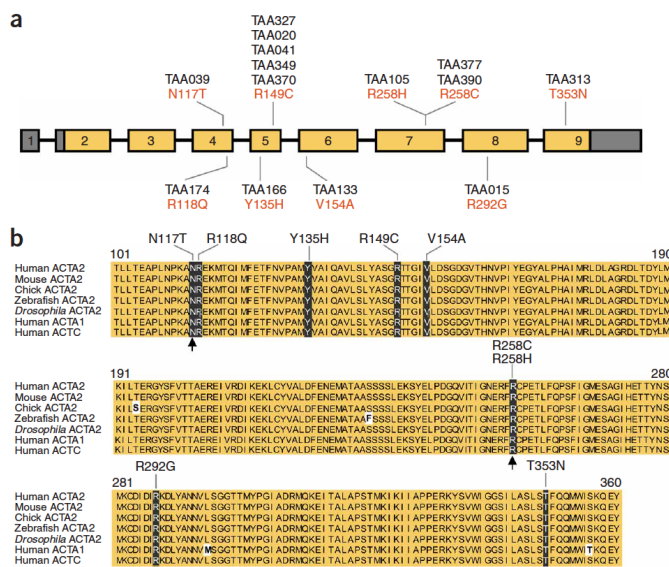


Figura 11. Esempio di mutazione del gene ACTA2 in individui con forme familiari di AAT.

Mutazioni specifiche nel gene ACTA2 possono rispettivamente predisporre il paziente a TAAD e stroke precoce, a TAAD e patologia coronarica (coronary artery disease), a Moyamoya disease, oppure nel caso di mutazioni che alterano l'amminoacido Arginina in posizione 179 della proteina ACTA2, a un quadro multisistemico da disfunzione dei muscoli lisci che causa alto rischio a patologia vascolare grave (TAAD, PDA, stenosi e dilatazione dei vasi cerebrali, ipertensione della sostanza bianca alla RM cerebrale, ipertensione

polmonare, midriasi congenita, ipotonia della vescica urinaria, malrotazione e ipoperistalsi dell'intestino. Oltre a forme familiari di patologie dell'aorta toracica, sono state riportate anche mutazioni ACTA2 in forme non familiari.

Capitolo 3

3.1 Introduzione allo studio

A nostra conoscenza, nessuno studio ha indagato il ruolo di ACTA2 nello sviluppo di BAV; Guo e coll.⁵⁷ hanno riportato ACTA2 come causa del 14% dei casi di TAA e dissezioni, e studi successivi hanno confermato questo dato con un'incidenza variabile dal 12 al 21%^{60,61}.

Obiettivi di questo studio sono stati: 1) la valutazione del ruolo delle mutazioni di ACTA2 nello sviluppo del fenotipo BAV + TAA in una coorte di 20 pazienti, 2) l'individuazione di eventuali segni clinici correlati alla patologia cardiovascolare, per cui ogni paziente è stato sottoposto ad accurate visite ambulatoriali, 3) la determinazione della reale prevalenza della familiarità di BAV-TAA valutata tramite l'esecuzione di un esame ecocardiografico a tutti i familiari di primo grado dei probandi arruolati.

3.2 Materiali e metodi

Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna. Sono stati arruolati 20 probandi, affetti da BAV associata a TAA, sottoposti a chirurgia della valvola aortica e dell'aorta ascendente presso l'Unità Operativa di Cardiochirurgia del Policlinico S.Orsola-Malpighi (Bologna). Tutti i probandi arruolati dovevano avere parenti di primo grado disponibili a partecipare allo studio. Sono stati esclusi i pazienti con una condizione sindromica predisponente allo sviluppo di aneurisma aortico. Ciascun probando, che ha firmato il consenso informato per la genotipizzazione, è stato sottoposto ad una valutazione genetica clinica completa, comprendente anamnesi personale, esame fisico, ed anamnesi familiare con redazione di pedigree familiare presso l'Unità Operativa di Genetica Medica del Policlinico S.Orsola-Malpighi (Bologna).

Ciascun familiare di primo grado, dopo aver firmato il consenso informato, è stato arruolato nello studio e sottoposto a visita genetica ed esame ecocardiografico per l'individuazione di BAV e/o TAA. Gli esami ecocardiografici sono stati eseguiti presso l'Unità operativa di Cardiologia del Policlinico S.Orsola-Malpighi (Bologna) e del Policlinico di Modena (Modena). I familiari sono stati considerati affetti da malattia se portatori di BAV,

dilatazione o dissezione aortica, o se precedentemente sottoposti a chirurgia valvolare o aortica per BAV e/o TAA.

3.2.1 Analisi gene ACTA2.

I campioni di DNA genomico sono stati estratti da linfociti derivanti da sangue intero secondo le procedure standardizzate, previa firma del modulo di consenso informato da parte degli stessi pazienti o dei tutori legali. Tutti gli esoni codificanti e le sequenze introniche fiancheggianti sono stati amplificati e sequenziati mediante coppie di *primers* opportunamente disegnati e validati.

Studio della sequenza nucleotidica. Lo screening prevede l'analisi delle sequenze di ciascun esone e delle relative regioni introniche fiancheggianti di tutti i geni presi in esame. Dopo estrazione del DNA dal sangue periferico del paziente, si procede ad amplificazione del segmento genico di interesse mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Le informazioni relative alla localizzazione genomica, alla sequenza nucleotidica, alla struttura degli esoni e degli introni, al trascritto e alla proteina codificata da ciascun gene esaminato sono state ricavate dalle banche dati internet NCBI (A), ENSEMBLE (B) ed Entrez (C). I *primers* per le reazioni di PCR e di sequenza sono stati disegnati sfruttando i programmi PRIMER-3 (D) ed Oligo 6.0 (Primer Analysis Software, Cascade, Co, USA) evitando di includervi nucleotidi polimorfici (SNPs) e regioni di omologia con altre nel resto del genoma, secondo quanto riportato dal programma BLAST (E). Gli oligonucleotidi sono stati ordinati in forma liofilizzata (Invitrogen, USA) e risospesi in H₂O deionizzata al fine di ottenere una soluzione madre 100 mM, conservata a -20°C, a partire dalla quale vengono preparate per diluizione le soluzioni di lavoro concentrate 10 mM, conservate a +4°C.

Estrazione del DNA. Dal sangue periferico dei pazienti da sottoporre allo screening è stato estratto il DNA necessario all'analisi tramite kit commerciale QUIamp DNA Blood Mini Kit (QUIAGEN Inc., Valencia, CA USA). Il protocollo prevede l'utilizzo di colonnine contenenti un filtro di silicato, su cui viene adsorbito il DNA dopo passaggi di centrifugazione e di eliminazione delle molecole ad esso complessate. Il DNA genomico così ottenuto viene valutato

qualitativamente e quantitativamente su gel di agarosio all'1% (SeaKem® LE Agarose, 50004, CAMBREX Bio Science Rockland, Rockland ME, USA).

PCR: Polymerase Chain Reaction. I campioni di DNA estratti vengono amplificati tramite PCR (157). Su un *Thermal Cycler* (GeneAmp® PCR System 2700-9700, Applied Biosystem, USA) sono state impostate le migliori condizioni in termini di temperatura e di tempo per l'amplificazione ottimale di ciascun esone. Gli ampliconi di tutti i geni in esame presentano temperature di *annealing* e concentrazioni di MgCl₂ variabili alle quali ottenere una corretta ed efficace amplificazione, scelte e adattate per soddisfare requisiti di specificità e sensibilità della reazione.

Elettroforesi. La verifica delle reazioni di PCR è stata condotta attraverso l'elettroforesi su gel d'agarosio, tecnica basata sulla migrazione del DNA in un campo elettrico. I frammenti si muovono dal polo negativo al polo positivo e vengono trasferiti con velocità diversa a seconda del loro peso molecolare: tanto più piccole sono le molecole, tanto più velocemente attraversano le maglie del gel. Il gel d'agarosio, a concentrazioni comprese tra 1 e 2% è usato per la separazione di frammenti di dimensione tra 0.1 e 20 kb.

Purificazione dei prodotti di PCR. Dopo aver verificato la presenza della banda attesa sul gel di agarosio, e quindi la buona riuscita della reazione di PCR, si procede alla purificazione degli amplificati. In seguito, l'amplificato viene risospeso in 30 µl di H₂O per ottenere il prodotto purificato. A questo punto, si può procedere con la reazione di sequenziamento.

Sequenziamento. Le reazioni di sequenza vengono realizzate aggiungendo al prodotto di PCR precedentemente purificato, un *primer* (forward o reverse) e la *master mix* di reazione (ABI Prism BigDye terminator v1.1 kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Questa contiene i 4 deossinucleotidi (dNTPs) dATP, dGTP, dCTP e dTTP; i 4 dideossinucleotidi (ddNTPs) ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP marcati con 4 fluorofori diversi; la DNA polimerasi, il *buffer* 2.5X e il MgCl₂.

La metodica applicata si basa sul principio del metodo di Sanger, anche noto come “*chain termination*” o “*dideoxy method*”. La reazione di sequenza viene realizzata al termociclatore opportunamente impostato. A reazione conclusa, i prodotti vengono opportunamente purificati su una piastra Millipore (Millipore Corporation, Billerica, USA, Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit, LSKSO9624), secondo il protocollo standardizzato. Le sequenze vengono analizzate nel sequenziatore automatico capillare Applied Biosystem 3730 DNA Analyzer. I dati di fluorescenza sono letti, interpretati e tradotti in elettroferogrammi dal 3730 Data Collection software (Figura 12). Infine, per l’analisi dei dati sono stati usati i programmi Chromas 2.23 e Sequencer Analysis 4.0, che consentono la visualizzazione dei cromatogrammi corrispondenti alle sequenze nucleotidiche del gene di interesse, confrontate per allineamento con una sequenza di riferimento ottenuta da banche dati internet.

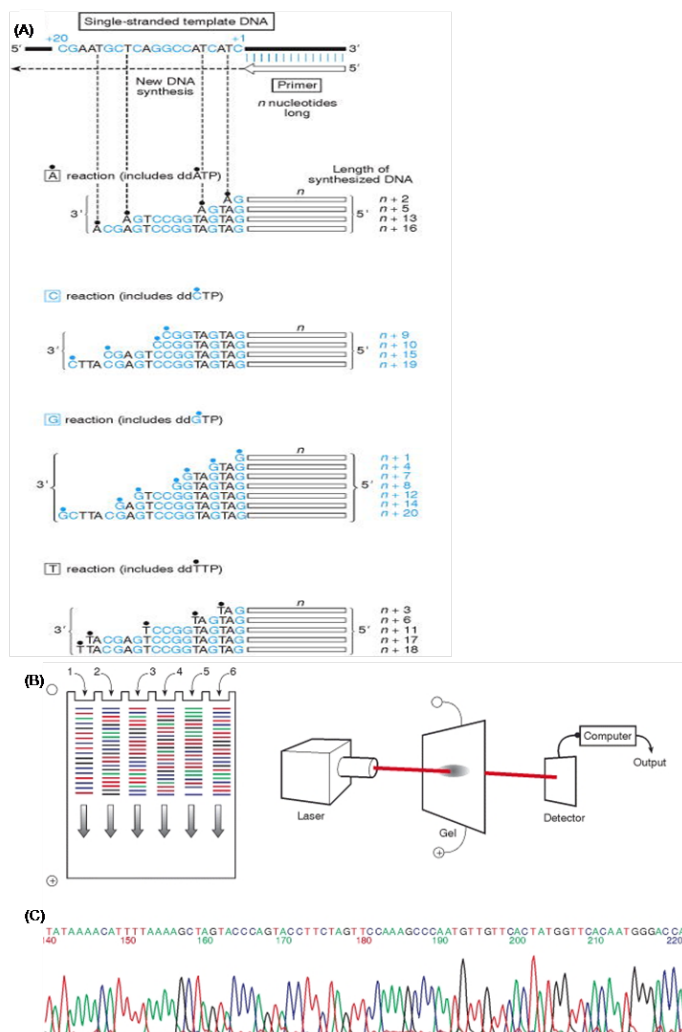


Figura 12. A) Sequenziamento del DNA. Il sequenziamento di didesossidna dipende dalla sintesi di un nuovo filamento di DNA a partire da un filamento stampo e dalla casuale incorporazione di didesossinucleotidi che interrompe la sintesi della catena. B) Principio del sequenziatore automatico: tutti e 4 i prodotti di reazione sono caricati su un singolo gel di elettroforesi. Ai dideoxinucleotidi è legato un colorante fluorescente, diverso per ciascuna delle 4 basi. La sintesi del filamento di DNA si interrompe casualmente all’incorporazione di desossinucleotidi: si ottengono frammenti di diversa dimensione. Durante la corsa elettroforica un laser eccita il colorante fluorescente, la cui emissione è rilevata e registrata elettronicamente. C) La sequenza ottenuta viene riportata in un grafico (elettroferogramma) caratterizzato da picchi di 4 colori corrispondenti alle 4 basi.

3.2.2 Exome sequencing delle forme familiari di BAV

Tramite tecniche di nuova generazione può essere indicata l'esecuzione del sequenziamento della parte codificante di tutti i nostri geni (esoma) con lo scopo di identificare nuovi fattori genetici coinvolti nelle patologie cardiovascolari di interesse chirurgico. Dal momento che questo esame potrebbe rivelare per il paziente anche un rischio di patologia diversa di quella indagata, verrà raccolto un consenso in cui il paziente esprime quali eventuali informazioni dovranno essere comunicate (solo informazioni inerenti le patologie cardiovascolari di interesse chirurgico; anche eventuali risultati inattesi, che rappresentino un beneficio concreto e diretto in termini di terapia o di prevenzione oppure di consapevolezza delle scelte riproduttive; tutti i risultati ottenuti di cui è in quel momento nota una correlazione ad un rischio del paziente di sviluppare patologia). Qualora il paziente lo desideri, potrà inoltre ricontattare a distanza di tempo i Ricercatori coinvolti nello studio, per cambiare il consenso oppure chiedere nuove informazioni.

Exome sequencing (o ***Whole-Exome Sequencing - WES***) è un termine che identifica il sequenziamento dell'intera porzione codificante del genoma di un individuo. Grazie ai costi e ai tempi ridotti, tramite la tecnica del Next Generation Sequencing (NGS) è possibile analizzare un elevato numero di frammenti di DNA in parallelo fino ad ottenere la sequenza di molti geni in contemporanea, dell'intera porzione codificante, oppure persino dell'intero genoma di un individuo. Ciò è di estremo interesse sia per la diagnostica di routine che per la ricerca scientifica. Parlando di exome sequencing, anche se la regione codificante rappresenta soltanto l'1% circa di tutto il genoma, si stima che fino all'85% di tutte le mutazioni patogene siano contenute in essa. L'exome sequencing è ad esempio utile in quei casi di sospetta patologia su base genetica in cui manchi una diagnosi clinica precisa (e quindi un sospetto per un gene in particolare) e nei casi delle malattie geneticamente eterogenee, come tante patologie cardiovascolari di interesse chirurgico, nelle quali alcuni geni devono ancora essere scoperti e nei quali i pazienti rimangono spesso senza la conferma genetica anche dopo l'esecuzione del test molecolare tradizionale; in FTAAD l'assenza della diagnosi molecolare ha attualmente di

solito eventuali conseguenze minori per le possibilità terapeutiche dell'affetto, ma in ogni caso impedisce la possibilità di identificazione precoce di familiari a rischio di TAA, e quindi le loro possibilità di prevenzione. Tecnicamente l'exome sequencing si svolge con l'estrazione del DNA genomico del paziente e costruzione delle "librerie" secondo le istruzioni del produttore (Qiagen e Illumina/Agilent, rispettivamente).

Gli step principali della procedura sono:

1. **Exome target enrichment.** Nel nostro Centro i campioni di DNA sono stati target-enriched per l'esoma usando Illumina Truseq Exome Enrichment technology oppure Agilent SureSelect Exome capture V.5.

2. **WES runs.** L'esoma dei campioni di DNA target-enriched è stato sequenziato sulla piattaforma Illumina HiSeq2000. Resequenziamento di geni candidati su numeri grandi di pazienti verrà effettuato sull'Ion Torrent (Roche).

3. **Analisi bioinformatica di WES.** La grande quantità di dati grezzi di un esperimento con copertura media di 100x o più è stata analizzata tramite procedure predefinite:

-allineamento (alignment): Software specifici (nel nostro Centro BWA) sono in grado di confrontare (o allineare) le sequenze del paziente con le sequenze presenti nelle banche dati (le cosiddette reference sequences), ricostruendo così l'esoma del paziente.

-variant calling and annotation: una volta completato l'allineamento e aver quindi ricostruito la sequenza codificante di ogni gene, si rende necessario individuare le varianti di sequenza, ossia tutte le deviazioni del paziente rispetto alle reference sequences di ogni gene. In generale la percentuale di errore dell'NGS è pari all'1%: è cioè possibile che una variante ogni 100 sia in realtà un artefatto. Pur potendo considerarsi questa percentuale tollerabile, specialmente avendo presente la mole di dati che si ottiene da ogni exome sequencing, molti laboratori fanno utilizzo di software

atti a calcolare la probabilità che una variante sia o meno un artefatto (il nostro Centro usa GATK quality metrics). Da un punto di vista pratico è importante sottolineare che la maggior parte delle varianti rilevabili sono polimorfismi senza significato patogeno. L'obiettivo del bioinformatico e del genetista è di ottenere dati di qualità col minor numero di artefatti possibile e di interpretare propriamente il significato delle varianti.

-Prioritizzazione delle varianti candidati secondo alcuni parametri: conservation score (tramite uso di PhyloP, PhastCons, GERP), predizione dell'eventuale effetto deleterio (tramite SIFT, Polyphen2, Mutation Tester), correlazione funzionale del gene mutato rispetto ad altri geni noti associati a FTAAD (patologie del connettivo, componenti della matrice extra-cellulare o dell'apparato contrattile del muscolo liscio) valutato tramite strumenti online (TopGene, Endeavour).

-Validazione delle varianti: ogni variante con possibile significato clinico viene confermata attraverso il sequenziamento standard con elettroforesi capillare (Sanger) e con lo stesso metodo viene studiato la segregazione di tale variante. La variante verrà inoltre cercato in almeno 200 cromosomi da una popolazione di controllo per escludere che si tratti di un polimorfismo specifico per la popolazione in studio, non incluso nei reference genomes.

3.2.3 Procedure chirurgiche

Tutti gli interventi sono stati eseguiti in sternotomia mediana. La circolazione extracorporea è stata istituita, a seconda dei casi, mediante la cannulazione dell'aorta ascendente, dell'arco aortico, dell'arteria ascellare destra o dell'arteria femorale. Per il drenaggio venoso è stato cannulato in tutti i casi l'atrio destro. Le procedure chirurgiche eseguite sono state: sostituzione della valvola aortica e dell'aorta ascendente con tubo valvolato meccanico o biologico, secondo la tecnica di Bentall modificata, in 15 pazienti (Bentall De Bono); sostituzione della radice aortica con conservazione della valvola aortica nativa (Reimplantation technique) in 3 pazienti (David); sostituzione della valvola aortica e dell'aorta ascendente sopracoronarica in 1 paziente (Wheat)

e sostituzione della valvola aortica e plastica riduttiva dell'aorta ascendente in un paziente.

3.2.4 Istologia

L'analisi istologica di porzioni di aorta ascendente è stata eseguita in ciascun probando. Da ogni pezzo anatomico espantato sono stati ottenuti sei campioni da siti diversi, fissati in formalina tamponata al 10%, e inclusi in paraffina. Sezioni di 2 mm, sono state colorate con ematossilina-eosina, tricromica di Azan-Mallory, ed Weigert's elastic stain–Van Gieson stain. La degenerazione della tonaca media aortica è stata valutata istologicamente in base a: (a) frammentazione delle fibre elastiche, (b) perdita di cellule muscolari lisce, (c) accumulo di materiale basofilo (mucopolisaccaridi). Queste alterazioni, già definite come medionecrosi cistica, sono state classificate secondo la scala di Larson e Edwards (referenza): grado 0, nessuna lesione; grado 1, lesioni coinvolgenti 1-10% del tessuto mediale; grado 2, 11-25%; grado 3, 26-50%; e grado 4, 51-100%. In nessuno dei campioni è stata rilevata necrosi laminare mediale o presenza di infiltrati infiammatori.

3.2.5 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le variabili continue sono espresse come mediana e sono state confrontate con l'U-test di Mann-Whitney. Le variabili categoriche sono espresse come percentuali e confrontate utilizzando il test χ^2 o il test esatto di Fisher, come indicato. Un valore di probabilità a due code $<0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3.3 RISULTATI

3.3.1 Risultati clinici

La tabella 1 mostra le caratteristiche dei 20 pazienti (19 maschie ed 1 femmina) arruolati nello studio. L'età media dei pazienti al momento della diagnosi di BAV era di 40,9 anni (minimo 18, massimo 61) e al momento dell'intervento chirurgico 47.2 anni (minimo 19, massimo 62). La morfologia di BAV più frequente è stata l'antero-posteriore, ed in 4 pazienti era presente una stenosi aortica calcifica. In 5 (25%) pazienti non era presente una disfunzione valvolare, 11 pazienti presentavano insufficienza valvolare (6 lieve, 4 moderata e 5 severa), 2 pazienti stenosi e 2 pazienti steno-insufficienza. Una disfunzione valvolare mitralica concomitante è stata rilevata in 3 casi. Il valore medio del massimo diametro aortico è stato 49,7 mm (minimo 42, massimo 61). Non è stata individuata nessuna relazione significativa tra le diverse forme di valvulopatia (stenosi, insufficienza e steno-insufficienza) e i diametri aortici. All'esame istologico è stata rilevata una medionecrosi cistica di grado lieve nel 55% dei casi e di grado severo nel 25%.

In nessun probando è stato rilevato alcun segno di patologia connettivale, o di qualche dismorfismo. Ad un follow-up medio di 4 anni, tutti i pazienti erano in vivi e non sono state rilevate ulteriori dilatazioni dei segmenti aortici. Due pazienti sono stati sottoposti a reintervento aortico per endocardite su protesi valvolare.

Settanta-sette familiari di primo grado, di cui 35 donne (45,5%) e 42 maschi (54,5%), sono stati arruolati nello studio: 15 genitori (19,5%, di età compresa tra 56-84 anni), 35 fratelli e sorelle (45,5%, di età compresa tra 30-83 anni), 27 figli (35%). In 4 pazienti è stata diagnosticata una BAV, in 3 BAV e TAA ed in 2 TAA con una valvola aortica tricuspide. Sono stati individuati 5 casi familiari. Di questi, 2 sono stati sottoposti ad intervento chirurgico per BAV e uno per BAV + TAA.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti e risultati dello studio

	FORME SPORADICHE		FORME FAMILIARI	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Totale	15	75	5	25
Maschi	14	93.3	5	100
Età (media ± DS)	45.9 ± 13.4		51 ± 9	
Iperensione	7	46.7	1	20
Ipercolesterolemia	3	20	3	60
Fumo	3	20	1	20
Obesità	-	-	-	-
Endocardite	1	6.7	1	20
Reintervento	-	-	2	40
Raphe	7		2	
<i>Morfologia della BAV:</i>				
LC-RC	5		2	
LC-NC	-		1	
<i>Malattia valvolare aortica:</i>				
Nessuna	2	13.3	3	60
Insufficienza	10	66.7	1	20
Stenosi	2	13.3	-	-
Steno-insufficienza	1	6.7	1	20
<i>Malattia valvolare mitralica:</i>				
Nessuna	12	80	5	100
Insufficienza	2	13.3	-	-
Stenosi	-	-	-	-
Steno-insufficienza	1	6.7	-	-
<i>Dimensioni aorta</i>				
Radice aortica (media ± DS)	41.9 ± 4.9		45.8 ± 2.2	
Aorta ascendente (media ± DS)	46.8 ± 5.7		50.2 ± 10.3	
<i>Tipo di intervento:</i>				
Bentall	11	73.3	4	80
David	2	13.3	1	20
SVAo+SAoAsc	1	6.7	-	-
SVO+PAoAsc	1	6.7	-	-
<i>Medionecrosi cistica:</i>				
Moderata	8		3	
Severa	4		1	

BAV: valvola aortica bicuspid. DS: deviazione standard. LC: cuspid coronarica sinistra. NC: cuspid non coronarica. PAoAsc: plastica riduttiva aorta ascendente. RC: cuspid coronarica destra. SAoAsc: sostituzione aorta ascendente. SVAo: sostituzione valvolare aortica.

3.3.2 Casi familiari

Famiglia 1 (Figura 13). Il probando è un maschio di 50 anni con diagnosi di BAV e TAA, associato a lieve prollasso mitralico, dall'età di 38 anni. A 46 anni è stato sottoposto ad intervento chirurgico (Reimplantation) per dilatazione della radice aortica (48 mm). L'aorta ascendente non presentava segni di dilatazione (diametro max 34 mm).

Il padre (81 anni) presentava BAV con insufficienza aortica severa, dilatazione della radice aortica (45 mm), aorta ascendente normale (35 mm) e prollasso mitralico con insufficienza moderata.

I fratelli (53 e 41 anni) presentavano entrambi valvola aortica tricuspide con dilatazione della radice aortica (48 e 45 mm) e aorta ascendente non dilatata (36 e 32 mm); nel più anziano era presente anche un prollasso mitralico con insufficienza lieve.

La sorella aveva una valvola tricuspide con radice aortica non dilatata (37 mm), un lieve prollasso mitralico senza disfunzione valvolare e un'origine anomala della coronaria destra.

Il probando ha una figlia e un figlio (23 e 16 anni) con valvola aortica tricuspide e normale diametri aortici.

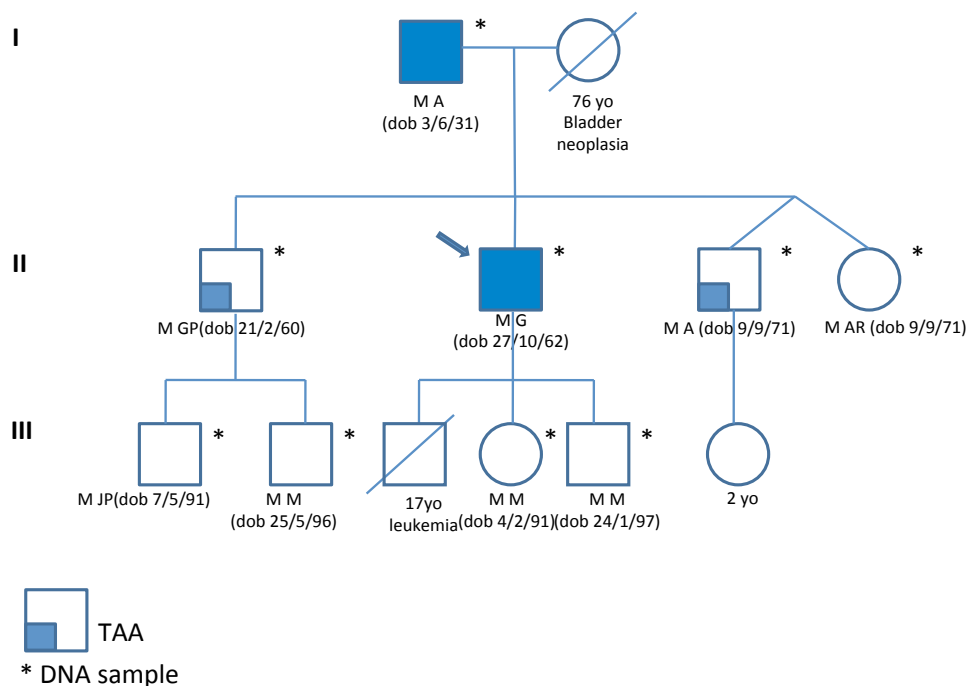


Figura 13. Albero genealogico della Famiglia 1.

Famiglia 2 (Figura 14). Il probando è un maschio di 56 anni con diagnosi di BAV dall'età di 18 anni. A 34 anni è stato sottoposto a sostituzione della valvola aortica per insufficienza aortica severa. Lo stesso anno è stato sottoposto ad osteotomia della caviglia per osteocondrite dissecante. A 53 anni, per severa dilatazione dell'aorta ascendente (61 mm) e della radice aortica (45 mm), è stato sottoposto ad impianto di tubo valvolato, secondo la tecnica di Bentall modificata.

Un fratello (53 anni) presentava BAV con insufficienza lieve e lieve dilatazione dell'aorta ascendente (42 mm) e della radice aortica (41 mm).

L'altro fratello (39 anni) aveva una valvola aortica tricuspide e normali diametri aortici.

Il figlio del probando (28 anni), era candidato ad intervento cardiocirurgico per BAV con insufficienza aortica severa associata a dilatazione ed ipocinesia ventricolare sinistra. La radice aortica era di 38 mm e l'aorta ascendente di 36 mm.

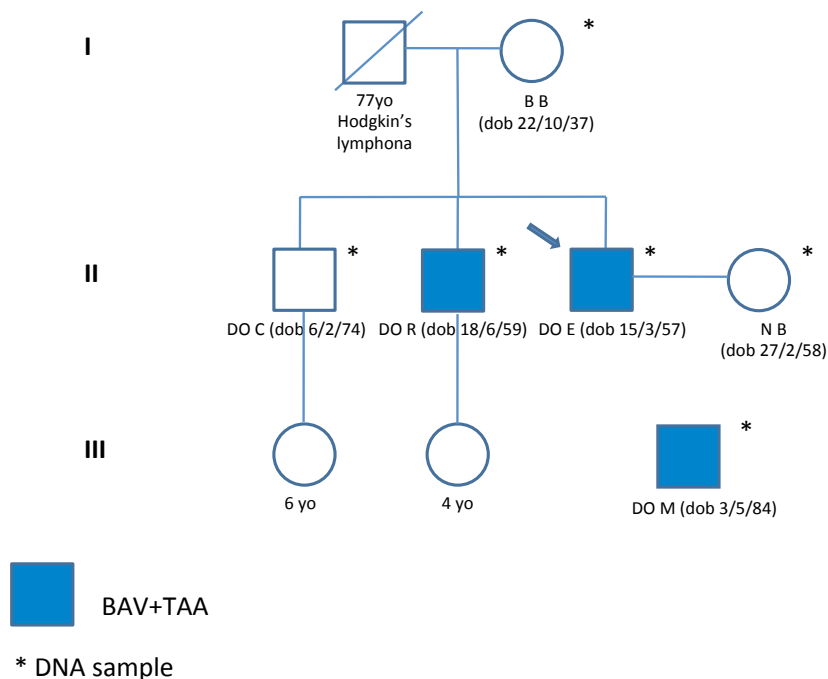


Figura 14. Albero genealogico della Famiglia 2.

Famiglia 3 (Figura 15). Il probando è un maschio di 69 anni con diagnosi di BAV all'età di 53 anni. A 62 anni è stato sottoposto ad intervento chirurgico con impianto di tubo valvolato, secondo la tecnica di Bentall modificata, per steno-insufficienza valvolare aortica e dilatazione dell'aorta ascendente (51 mm) e della radice aortica (43 mm). Il probando è stato inoltre sottoposto ad intervento di ernioplastica inguinale.

Il fratello (82 anni) è stato sottoposto all'età di 75 anni ad intervento di Bentall per BAV e TAA (aorta ascendente 52 mm; radice aortica 45 mm). Anche lui ha riferito in anamnesi un intervento per ernia inguinale. I nipoti del probando AT e AR (vedi figura albero genealogico) presentavano una radice aortica con un diametro ai limiti superiori della norma (36 mm); AT presentava inoltre un quadro ecocardiografico suggestivo per cardiomiopatia del ventricolo destro con ipocinesia della parete anteriore del ventricolo destro e disarrangiamento delle trabecole.

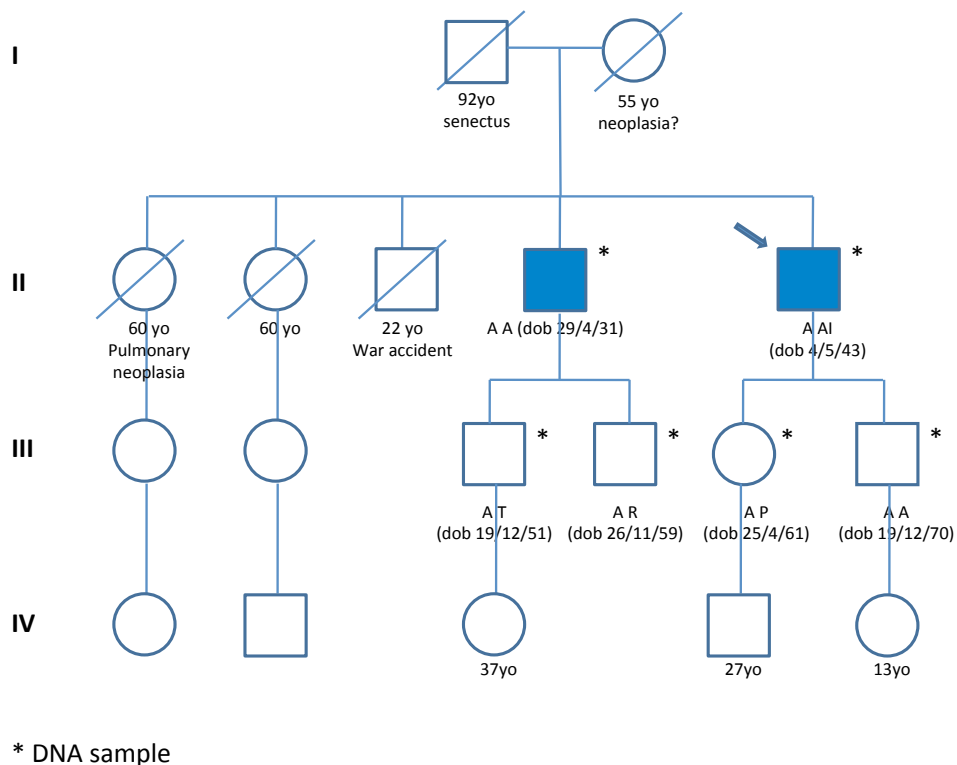


Figura 15. Albero genealogico della Famiglia 3.

Famiglia 4 (Figura 16). Il probando è un maschio di 39 anni, con diagnosi di BAV, sottoposto ad intervento di Reimplantation all'età di 32 anni per severa dilatazione dell'aorta ascendente (57 mm). Sei anni più tardi, a causa di un'endocardite infettiva determinante insufficienza valvolare aortica severa, è stato sottoposto ad intervento di Bentall.

La sorella (37 anni) ha subito un intervento di Bentall all'età di 35 anni per BAV e TAA (radice aortica 49 mm; aorta ascendente 38 mm).

Il padre è deceduto per morte improvvisa (probabile dissezione aortica) all'età di 61 anni. Precedentemente era stato sottoposto ad intervento di sostituzione valvolare aortica per insufficienza severa, in valvola aortica tricuspide .

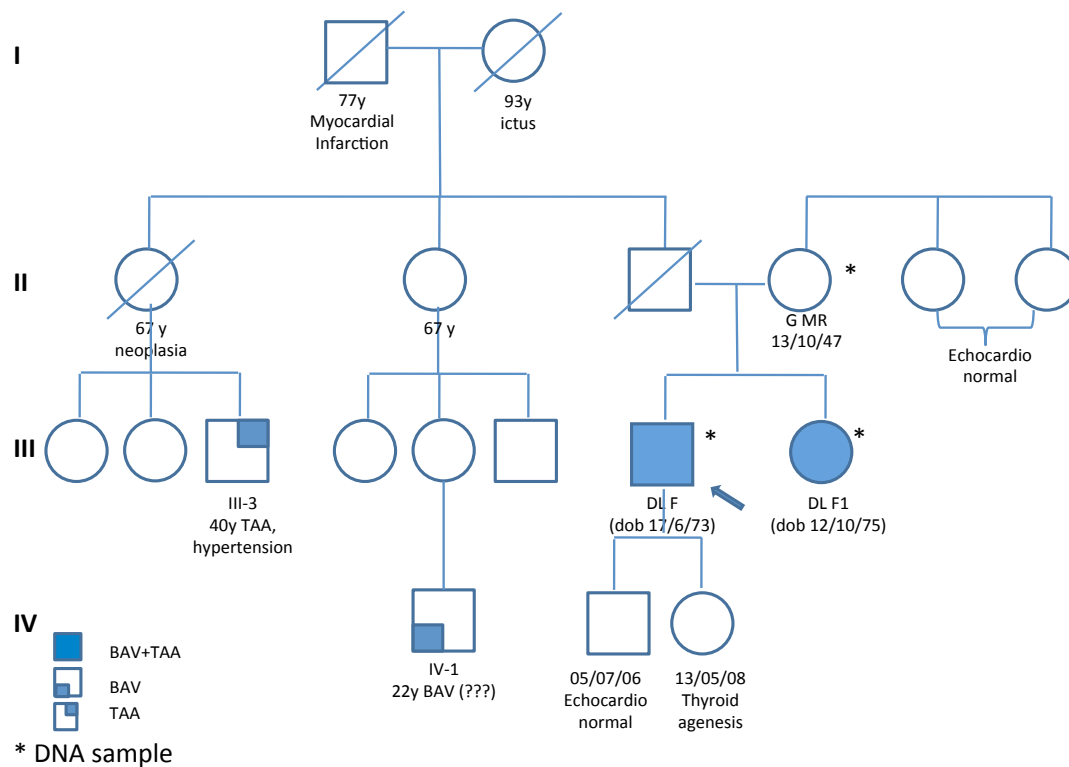


Figura 16. Albero genealogico della Famiglia 4.

Famiglia 5 (Figura 17). Il probando è un maschio di 58 anni con diagnosi di BAV all'età di 30 anni, e sottoposto ad intervento di Bentall per steno-insufficienza valvolare e dilatazione aortica (radice 44 mm; aorta ascendente 48 mm) all'età di 45 anni. In anamnesi anche riscontro di cisti epatiche e renali bilaterali.

Il fratello maggiore presenta BAV con radice aortica di 39 mm ed aorta ascendente di 34 mm.

Le due sorelle hanno valvola aortica tricuspide e diametri aortici nella norma.

L'altro fratello è deceduto a 61 anni in seguito a trapianto di cuore e rene per malattia policistica e cardiomiopatia dilatativa. All'età di 49 anni era stato sottoposto a sostituzione valvolare aortica per BAV. In anamnesi riscontro anche di fegato policistico.

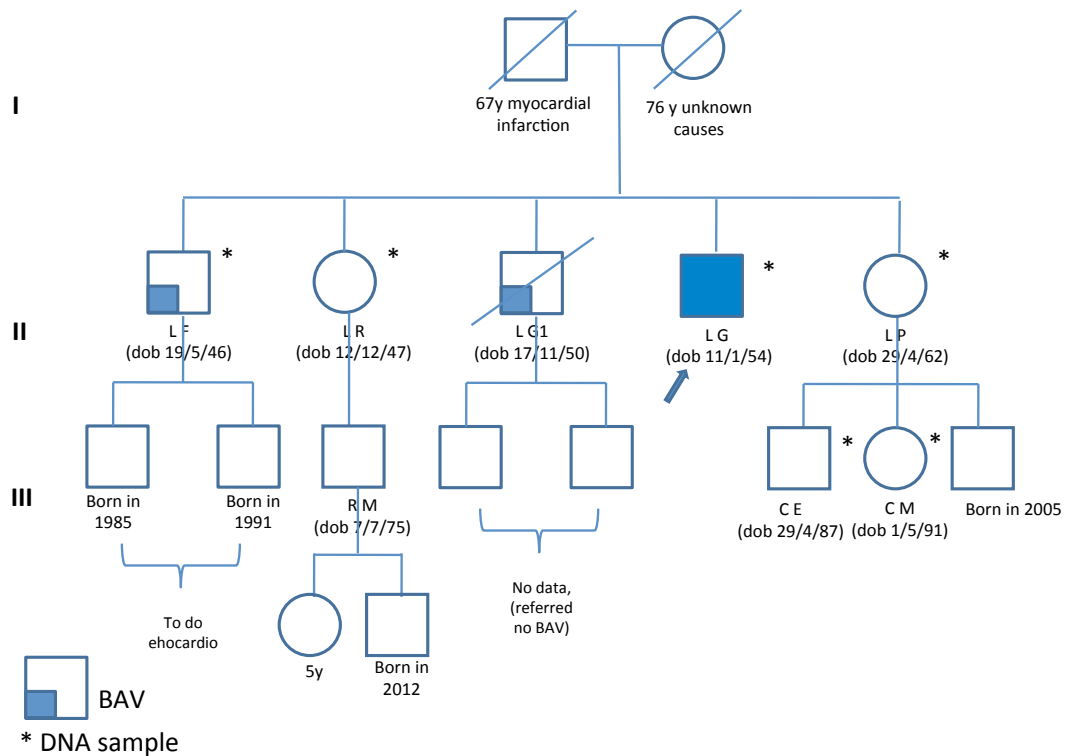


Figura 17. Albero genealogico della Famiglia 5.

3.3.3 Analisi ACTA2

Dopo il sequenziamento di tutti i 20 esoni e giunzioni di splicing di ACTA2 nei 20 probandi, non è stata individuata alcuna mutazione.

3.3.4 Analisi genetica delle forme familiari

Dopo aver completato l'analisi molecolare del gene ACTA2 nei 20 probandi, che non ha rilevato alcuna alterazione, si è proceduto con lo studio dei casi familiari di BAV+/- TAA.

Nella Famiglia 1 è stato effettuato uno studio di linkage genome-wide (SNP-Array) che ha mostrato due regioni cromosomiche con LOD score significativo sul cromosoma 14 (20Mb, in cui sono localizzati 534 geni) e sul cromosoma 21 (13,5Mb, con 201 geni). Tramite analisi dei geni candidati nelle regioni identificate con lo SNP-array in base alla loro funzione, sono stati selezionati i seguenti geni: SERPINA4, SYNE3, e CRIP2 sul cromosoma 14 e MIR155 sul cromosoma 21. Tuttavia, sequenziamento con metodo Sanger non ha rilevato mutazioni patogenetiche nei geni CRIP2 e MIR155 del probando. Si è pertanto deciso di procedere con exome sequencing, del probando e suo padre; l'analisi dei dati è in corso.

Nelle Famiglie 2 e 3 è stata eseguita exome sequencing; attualmente l'analisi dei dati di questi test è ancora in corso.

Nella Famiglia 4 il sequenziamento del genoma dei due fratelli affetti da BAV e TAA (III-6 e III-7) ha permesso di identificare una variante c. C3361T che causa un cambio amminoacidico R1121W [RefSeq NM_001040113 (NM_001040114)]. Tale variante missenso non è stata riportata come polimorfismo (dbSNP, 1000genome, in EVS 1/6496) né come mutazione patogenetica (HGMD, LOVD); è predetta damaging da Polyphen e Sift, e non è stata ereditata dalla madre sana. Dall'esperienza di un Laboratorio Belga (Prof. Loeys, Anversa) che usa un pannello di geni aortici che include MYH11

da alcuni anni, si è visto che in generale varianti in MYH11 sono relativamente frequentemente osservate, e che MYH11 sembra poter tollerare un certo range di variazione prima di essere danneggiato in modo tale da causare predisposizione alla formazione dell'aneurisma aortico.

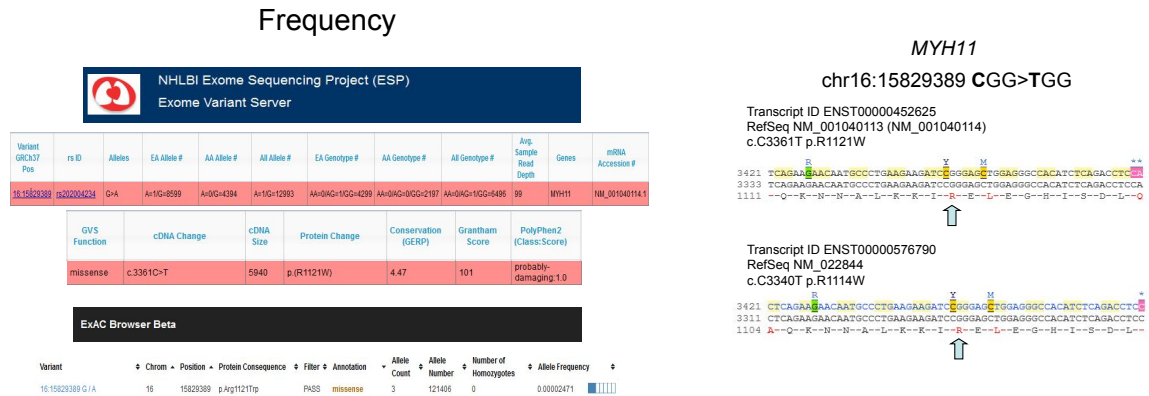


Figura 18. Mutazione del gene MYH11 presente nei due fratelli affetti da BAV e TAA.

Si prosegue con lo studio di segregazione familiare della variante identificata, in particolare nel cugino affetto da BAV e nello zio che presenta dilatazione aortica. Nel caso di riscontri positivi, verranno effettuati studi funzionali per valutare l'effetto della variante sulla proteina MYH11.

Nella Famiglia 5, considerando la presenza negli affetti di sia BAV+/-TAA che cisti renali +/- epatici, in prima battuta è stato effettuato un Array-CGH per identificare un' eventuale Copy Number Variant associata al quadro familiare. Tale indagine non ha rilevato alcuna microdelezione o microduplicazione. Successivamente, sono stati sequenziati nel probando i geni FOXC2, FOXF1, FOXL1 e MTHFSD, geni candidati per quadri con TAA e cisti renali, in base ad osservazioni in altre famiglie. Non sono state identificate varianti patogenetiche. E' attualmente in valutazione l'eventuale avvio di WES.

3.4 DISCUSSIONE

La valvola aortica bicuspidale (BAV) è la più comune cardiopatia congenita, la cui storia naturale è caratterizzata dalla comparsa di rilevanti complicanze valvolari (stenosi, insufficienza, endocardite) e vascolari, riguardanti l'aorta toracica (dilatazione, aneurisma, dissezione) e, più raramente, vasi intracranici ed epiaortici. Inoltre la BAV è associata frequentemente alla coartazione aortica (CoA): nel 25-75% dei pazienti con CoA è identificabile una BAV⁶²⁻⁶⁶. La diagnosi di BAV in un paziente con CoA è cruciale poiché la sua presenza conferisce un aumento sostanziale del rischio di complicanze aortiche, inclusa la dissezione.

E' stato ampiamente dimostrato che i pazienti con BAV presentano un'aorta ascendente più dilatata rispetto ai pazienti con valvola aortica tricuspide e che tale dilatazione compaia più precocemente, pur in assenza di alterazioni funzionali significative della valvola aortica^{1-6,21-23,25,30-32}.

La nostra esperienza complessiva nel trattamento chirurgico della valvulopatia aortica bicuspidale associata o meno a patologia aortica è di oltre 600 pazienti. In tale coorte di pazienti, l'indicazione principale all'intervento cardiocirurgico è stata l'insufficienza valvolare aortica associata ad aneurisma dell'aorta ascendente, riscontrato nel 29.8% dei pazienti, confermando l'associazione delle due patologie e mostrando come molto spesso una patologia a carico dell'aorta ascendente porti a valvulopatia per alterazione dell'unità anatomico-funzionale che insieme costituiscono. Nei pazienti senza indicazione alla sostituzione dell'aorta ascendente, la stenosi valvolare aortica è stata invece la causa più frequentemente riscontrata.

Uno studio epidemiologico eseguito in una regione americana ha recentemente descritto che, nei portatori di BAV, il rischio di formazione di TAA è del 26% a 25 anni, con un'incidenza di TAA (84.9/10 000 anni-paziente) significativamente superiore a quella della popolazione generale (1.04/10 000 anni-persona, $p < 0.001$)⁶⁷. In quello stesso studio, predittore indipendente di formazione di TAA risultava essere la presenza di SA insieme al diametro

aortico ≥ 40 mm⁴⁶. Il ruolo della SA come predittore di più rapida progressione delle dimensioni aortiche e di incidenza di complicanze è stato dimostrato anche in pazienti con TAA non operato³².

L'aortopatia descritta in sottogruppi di soggetti affetti da BAV viene ricondotta a molteplici alterazioni istopatologiche a livello della tonaca media aortica. Studi condotti sulla parete aortica rimossa all'intervento chirurgico di sostituzione dell'aorta ascendente in soggetti con BAV rispetto a quelli con valvola aortica tricuspidale hanno variamente dimostrato un'aumentata frequenza di apoptosi delle cellule muscolari lisce, un livello di frammentazione e atrofia elastica più elevato ed alterazioni nella concentrazione tissutale di metalloproteinasi e dei loro inibitori endogeni³³⁻³⁷. Tali quadri istopatologici a livello della tonaca sono aspecifici, essendo riscontrabili, anche se di entità variabile, in malattie ereditarie del tessuto connettivo quali la sindrome di Marfan.

La decisione di intervenire sull'aorta ascendente in pazienti con BAV (senza indicazioni all'intervento di sostituzione valvolare aortica) dovrebbe prendere in considerazione molteplici valutazioni, come le dimensioni, la loro progressione, l'obliterazione della giunzione sino-tubulare, la coesistenza di CoA, la presenza di storia familiare di AAT o di eventi aortici acuti. Attualmente, per pazienti con VAB senza indicazione primaria all'intervento di sostituzione valvolare aortica, l'indicazione all'intervento per TAA viene posto per valori $>5.0/5.5$ cm, o per valori inferiori quando sia inequivocabile la documentazione di una crescita rapida delle dimensioni aortiche (>0.5 cm/anno) o in presenza di sindrome di Turner^{68,69}. Qualora sia indicato l'intervento di sostituzione valvolare, la sostituzione dell'aorta ascendente è altamente consigliata in presenza di dilatazione dell'aorta ascendente con diametro >4.5 cm.

Varie ipotesi riguardanti la dilatazione aortica sono state proposte, potrebbe rappresentare l'espressione precoce di una "aortopatia intrinseca" o potrebbe essere secondaria ad un anomalo stress emodinamico, anche in assenza di disfunzione valvolare. Recentemente alcuni eleganti studi sulla funzione aortica, condotti sia in vitro che in vivo, hanno ricondotto l'attenzione sulla eziopatogenesi emodinamica dell'aortopatia associata alla BAV⁷⁰⁻⁷².

Vari motivi inducono a ritenere che l'aorta dei pazienti con BAV sia intrinsecamente anomala: 1) frequente dilatazione associata del tronco della polmonare⁴⁴; 2) aumento di incidenza di aneurismi cerebrali in pazienti con B3AV1; 3) aggregazione in familiari di pazienti con TAA+BAV. Inoltre, in BAV normofunzionanti e dilatazione aortica non aneurismatica è stata dimostrata un'aumentata rigidità della radice aortica (Figura 13) e che la rigidità è un predittore indipendente dello stato di BAV. Comunque la teoria genetica ed emodinamica potrebbero non essere mutuamente esclusive. In presenza di un contesto genetico-molecolare non ben definito, fattori emodinamici, potenzialmente accentuabili dalla sovrapposizione di patologia degenerativa delle cuspidi, probabilmente influenzati da ulteriori fattori (ad es. lo stress ossidativo), possono concorrere efficacemente a determinare la velocità di progressione della patologia aortica in alcuni pazienti con BAV.

Nel presente studio abbiamo ipotizzato un possibile ruolo genetico alla base dell'associazione di BAV e TAA, in particolare mutazioni del gene ACTA2 con conseguenti alterazioni di alfa actina. Abbiamo valutato 20 pazienti portatori di valvulopatia aortica bicuspidata associata a dilatazione dell'aorta ascendente che sono stati sottoposti a chirurgia riparativa. L'analisi molecolare del gene ACTA2 attraverso il PCR sequenziamento non ha evidenziato alcuna mutazione del gene indagato. L'assenza di mutazioni rinvenute, sia nelle forme sporadiche che nelle forme familiari, ci ha portato a ritenere che questo specifico gene non sia responsabile delle alterazioni dell'aorta toracica associate alla valvola aortica bicuspidata e che le mutazioni di ACTA2 non sembrano contribuire in modo significativo al fenotipo BAV+TAA. I rari casi di aneurismi dell'aorta toracica e valvola aortica bicuspidata, in cui è stata descritta una mutazione del gene ACTA2, sono pertanto occasionali e le mutazioni del gene ACTA2 intervengono nella genesi della dilatazione dell'aorta toracica indipendentemente dallo sviluppo di una valvola aortica bicuspidata. Il fenotipo, recentemente denominato Aortopatia da BAV, è stato riscontrato nel 25% famiglie, in accordo con i dati riportati in letteratura^{1,2}. Esami clinici accurati non hanno mostrato tratti dismorfici distintivi tra i pazienti arruolati. Ciò suggerisce che il meccanismo genetico alla base della BAV+TAA agisce sia durante l'embriogenesi cardiaca che dopo la nascita a livello della parete

dell'aorta toracica prossimale. In questo processo non sembrano coinvolti né altri tessuti né le porzioni più distali dell'aorta toracica. Su 20 pazienti, è stata arruolata solo una femmina, ma questo dato è molto probabilmente dovuto alla piccola dimensione della popolazione in studio. Un terzo dei nostri pazienti non presentava fattori di rischio cardiovascolare ed un altro terzo ne aveva uno soltanto. Pertanto, nella patogenesi del TAA, i fattori di rischio cardiovascolare sembrano meno coinvolti nei pazienti con BAV rispetto a quelli con valvola aortica tricuspide. In accordo con i dati riportati in letteratura, i pazienti con BAV sono stati sottoposti a chirurgia aortica in età più giovane (47,2 anni) e con diametri aortici medi inferiori (49,7 mm) rispetto ai corrispondenti pazienti con valvola aortica tricuspide (referenze). In questi pazienti, selezionati e a basso rischio, un primo intervento chirurgico radicale (in elezione), è secondo noi consigliabile, per ridurre al minimo il rischio di complicanze aortiche successive (dissezione, rottura) e di reintervento aortico (riferimento ESC).

Limite principale di questo studio è la ridotta dimensione della popolazione presa in esame. I casi familiari individuati sono stati sottoposti ad ulteriori studi genetici ancora in parte non ultimati.

L'analisi dell'intera porzione codificante del genoma dei componenti delle 5 famiglie con BAV + TAA, pur essendo ancora parziale, non ha mostrato mutazioni patogenetiche. Nella famiglia 4 si è evidenziata una mutazione del gene MYH11 che non è stata considerata patogenetica. Mutazioni a carico di MYH11 sono alla base di alcune forme familiari di TAAD ma questo gene sembra poter tollerare un certo range di variazione prima di essere danneggiato in modo tale da causare predisposizione alla formazione dell'aneurisma aortico.

il sequenziamento di esoni o dell'intero genoma potranno aiutare a svelare il meccanismo genetico che è alla base della BAV associata a TAA.

Conclusioni

La valvola aortica bicuspidale, con la sua eterogeneità clinica, funzionale e prognostica, suggerisce un'eterogeneità genetica e biomolecolare. L'architettura genetica della BAV verosimilmente dovrebbe consistere in svariate differenti varianti genetiche (autosomica dominante con espressione variabile e penetranza incompleta, diverse cause monogeniche rare, complex trait) che interagiscono in maniera additiva nel determinare un aumento del rischio. Alcuni dati, così come i risultati del nostro studio suggeriscono inoltre che la BAV e l'aneurisma dell'aorta toracica siano manifestazioni indipendenti di difetti genetici diversi.

Bibliografia

1. Ward C. Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart* 2000;83:81-5.
2. Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2789-800.
3. Braverman AC. Aortic involvement in patients with a bicuspid aortic valve. *Heart* 2011;97:506-13
4. Cecconi M, Nistri S, Quarti A, et al. Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *J Cardiovasc Med* 2006;7:11-20.
5. Nistri S, Basso C, Marzari C, et al. Frequency of bicuspid aortic valve in young male conscripts by echocardiogram. *Am J Cardiol* 2005;96:718-21.
6. Bonow RO. Bicuspid aortic valves and dilated aortas: a critical review of the ACC/AHA practice guidelines recommendations. *Am J Cardiol* 2008;102:111-4.
7. Di Louis J. Acierno. *The history of cardiology* Hans-H. 124-143.
8. Lewis T, Grant RT. Observations relating to subacute infective endocarditis. *Heart* 1923;10:21–99.
9. Datta BN, Bhusnurmath B, Khattri HN, et al. Anatomically isolated aortic valve disease. Morphologic study of 100 cases at autopsy. *Jpn Heart J* 1988;29:661–670.
10. Pauperio HM, Azevedo AC, and Ferreira CS. The aortic valve with two leaflets- a study in 2,000 autopsies. *Cardiol Young*.1999;9:488-498.
11. Tutar E, Ekici F, Atalay S, and Nacar N. The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. *Am Heart J* 2005; 150:513– 515.
12. Fernandes SM, Sanders SP, Khairy P, et al. Morphology of bicuspid aortic valve in children and adolescents. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1648-51.
13. Sabet HY, Edwards WD, Tazelaar HD, et al. Congenitally bicuspid aortic valves: a surgical pathology study of 542 cases (1991 through

- 1996) and a literature review of 2,715 additional cases. *Mayo Clin Proc* 1999;74:14-26.
14. Russo CF, Cannata A, Lanfranconi M, et al. Is aortic wall degeneration related to bicuspid aortic valve anatomy in patients with valvular disease? *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2008;136:937-42.
 15. Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK, et al. Usefulness of bicuspid aortic valve phenotype to predict elastic properties of the ascending aorta. *Am Journal Cardiol* 2007;99:686-90.
 16. Schaefer BM, Lewin MB, Stout KK et al. The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape. *Heart* 2008;94:1634-38.
 17. Ciotti GR, Vlahos AP, and Silverman NH. Morphology and function of the bicuspid aortic valve with and without coarctation of the aorta in the young. *Am J Cardiol* 2006;98:1096-102.
 18. Fernandez B, Duran AC, Fernandez-Gallego T et al. Bicuspid aortic valves with different spatial orientation of the leaflets are distinct etiological entities. *Journal of the Am Coll Cardiol* 2009;54:2312-18.
 19. Morgan-Hughes GJ, Roobottom CA, Owens PE, et al. Dilatation of the aorta in pure, severe, bicuspid aortic valve stenosis. *Am Heart J* 2004;147:736-740.
 20. Nkomo VT, Sarano ME, Ammash NM et al. Bicuspid aortic valve associated with aortic dilatation: a community-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:351-6.
 21. Nistri S, Sorbo MB, Marin M, et al. Aortic root dilatation in young men with normally functioning bicuspid aortic valves. *Heart* 1999;82:19-22.
 22. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, et al. Features and predictors of ascending aortic dilatation in association with a congenital bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 2003;92:99-101.
 23. Ferencik M and Pape LA. Changes in size of ascending aorta and aortic valve function with time in patients with congenitally bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol* 2003;92:43-46.
 24. Abbott M. Coarctation of the aorta of adult type. *Am Heart J* 1928;3:574-628.

25. Edwards WD, Leaf DS, and Edwards JE. Dissecting aortic aneurysm associated with congenital bicuspid aortic valve. *Circulation* 1978;57:1022-25.
26. Roberts CS and Roberts WC. Dissection of the aorta associated with congenital malformation of the aortic valve. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:712-16.
27. Tzemos N, Therrien J, Yip J, et al. Outcomes in adult with bicuspid aortic valves. *JAMA* 2008;300:1317-25.
28. Mc Kusick VA. Association of congenital bicuspid aortic valve and Erdheim'scistic medial necrosis. *Lancet* 1972;1:1026-7.
29. De Sa M, Moshkovitz Y, Butany J et al. Histologic abnormalities of the ascending aorta and pulmonary trunk in patients with bicuspid aortic valve disease: clinical relevance to the Ross procedure. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1999;118:588-96.
30. Tadros TM, Klein MD, and Shapira OM. Ascending aortic dilatation associated with bicuspid aortic valve. Pathophysiology, molecular biology, and clinical implications. *Circulation* 2009;119: 880-90.
31. Niwa K, Perloff JK, Bhuta SM et al. Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease: light and electron microscopic analyses. *Circulation* 2001;103:393-400.
32. Davies RR, Kaple RK, Mandapati D, et al. Natural history of ascending aortic aneurysms in the setting of an unreplaced bicuspid aortic valve. *Ann Thorac Surg* 2007;83:1338-44.
33. Pisano C, Maresi E, Balistreri CR et al. Histological and genetic studies in patients with bicuspid aortic valve and ascending aorta complications. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011;14: 300-6.
34. Bonderman D, Gharehbaghi-Schnell E, Wollenek G, et al. Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation* 1999;99:2138-43.
35. Leone O, Biagini E, Pacini D, et al. The elusive link between aortic wall histology and echocardiographic anatomy in bicuspid aortic valve: implications for prophylactic surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012;41(2):322-7.

36. Boyum J, Fellingner EK, Schmoker JD et al. Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2004; 127:686-91.
37. Phillippi JA, Klyachko EA, Kenny JP, et al. Basal and oxidative stress-induced expression of metallothionein is decreased in ascending aortic aneurysms of bicuspid aortic valve patients. *Circulation* 2009;119:2498-506.
38. Beroukhim RS, Kruzick TL, Taylor AL, et al. Progression of aortic dilation in children with a functionally normal bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 2006;98:828 -30.4.
39. Gurvitz M, Chang RK, Drant S, et al. Frequency of aortic root dilation in children with a bicuspid aortic valve. *Am J Cardiol* 2004;94:1337- 40.
40. Roberts WC. The congenitally bicuspid aortic valve. A study of 85 autopsy cases. *Am J Cardiol* 1970;26:72–83.
41. Sievers HH and Schmidtke C. A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2007;133:1226-33
42. Osler W. The bicuspid condition of the aortic valve. *Trans Assoc Am Physicians* 1886;2:185–92. 2.
43. Fazel SS, Mallidi HR, Lee RS et al., The aortopathy of bicuspid aortic valve disease has distinctive patterns and usually involves the transverse aortic arch. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2008;135:901-e2.
44. Biddinger A, Rocklin M, Coselli J, Milewicz DM. Familial thoracic aortic dilatations and dissections: a case control study. *J Vasc Surg.* 1997 Mar;25(3):506-11.
45. Coady MA, Davies RR, Roberts M, Goldstein LJ, Rogalski MJ, Rizzo JA, Hammond GL, Kopf GS, Elefteriades JA. Familial patterns of thoracic aortic aneurysms. *Arch Surg.* 1999 Apr;134(4):361-7.
46. Albornoz G, Coady MA, Roberts M, Davies RR, Tranquilli M, Rizzo JA, Elefteriades JA. Familial thoracic aortic aneurysms and dissections--incidence, modes of inheritance, and phenotypic patterns. *Ann Thorac Surg.* 2006 Oct;82(4):1400-5.

47. Pannu H, Avidan N, Tran-Fadulu V, Milewicz DM. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: potential relevance to abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Nov;1085:242-55.
48. Carlson M, Silberbach M. Dissection of the aorta in Turner syndrome: two cases and review of 85 cases in the literature. *BMJ Case Rep* 2009;2009:cr0620091998.
49. Brenner JI, Kuehl K. Hypoplastic left heart syndrome and other left heart disease: evolution of understanding from population-based analysis to molecular biology and back again—a brief overview. *Cardiol Young* 2011;21 Suppl 2:23–7.
50. John AS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldmuntz E. Aortic root dilation in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 2009;149A:939–42.
51. Martin LJ, Ramachandran V, Cripe LH, et al. Evidence in favor of linkage to human chromosomal regions 18q, 5q and 13q for bicuspid aortic valve and associated cardiovascular malformations. *Hum Genet* 2007;121:275–84.
52. McBride KL, Pignatelli R, Lewin M. Inheritance analysis of congenital left ventricular outflow tract obstruction malformations: segregation, multiplex relative risk, and heritability. *Am J Med Genet A* 2005;134A:180–6.
53. Goh DL, Han LF, Judge DP, et al. Linkage of familial bicuspid aortic valve with aortic aneurysm to chromosome 15q. Presented at: Annual Meeting of the American Society of Human Genetics; October 2002; Baltimore, MD.
54. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGFbeta receptor. *N Engl J Med* 2006;355:788–98.
55. Nus M, Macgrogan D, Martinez-Poveda B, et al. Diet-induced aortic valve disease in mice haploinsufficient for the Notch pathway effector RBPJK/CSL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1580–8.

56. Schildmeyer, L.A. et al. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *FASEB J.* 2000;14: 2213–2220.
57. Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, et al. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet* 2007;39:1488–93.
58. Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, et al. MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Hum Mol Genet* 2007;16:2453–62.
59. Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, et al. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet* 2006;38:343–9.
60. Morisaki H, Akutsu K, Ogino H, et al. Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD). *Hum Mutat.* 2009 Oct;30(10):1406-11.
61. Disabella E, Grasso M, Gambarin FI, et al. Risk of dissection in thoracic aneurysms associated with mutations of smooth muscle alpha-actin 2 (ACTA2). *Heart.* 2011 Feb;97(4):321-6. Warnes CA. Bicuspid aortic valve and coarctation: two villains part of a diffuse problem. *Heart* 2003;89:965-6.
62. Aboulhosn J, Child JS. Left ventricular outflow obstruction: subaortic stenosis, bicuspid aortic valve, supraaortic stenosis, and coarctation of the aorta. *Circulation* 2006;114:2412-22.
63. von Kodolitsch Y, Aydin AM, Bernhardt AM, et al. Aortic aneurysms after correction of aortic coarctation: a systematic review. *Vasa* 2010;39:3-16.
64. Oliver JM, Alonso-Gonzalez R, Gonzalez AE, et al. Risk of aortic root or ascending aorta complications in patients with bicuspid aortic valve with and without coarctation of the aorta. *Am J Cardiol* 2009;104:1001-6.

65. Oliver JM, Gallego P, Gonzalez A, Aroca A, Bret M, Mesa JM. Risk factors for aortic complications in adults with coarctation of the aorta. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1641-7.
66. Michelena HI, Khanna AD, Mahoney D, et al. Incidence of aortic complications in patients with bicuspid aortic valves. *JAMA* 2011;306:1104-12.
67. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014 Nov 1;35(41):2873-926.
68. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jun 10;63(22):e57-185.
69. Conti CA, Della Corte A, Votta E, et al. Biomechanical implications of the congenital bicuspid aortic valve: a finite element study of aortic root function from in vivo data. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140:890-6.
70. Girdauskas E, Borger MA, Secknus MA, Girdauskas G, Kuntze T. Is aortopathy in bicuspid aortic valve disease a congenital defect or a result of abnormal hemodynamics? A critical reappraisal of a one-sided argument. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;39:809-14.
71. Hope MD, Hope TA, Meadows AK, et al. Bicuspid aortic valve: four-dimensional MR evaluation of ascending aortic systolic flow patterns. *Radiology* 2010;255:53-61.