

Revisão Bibliográfica
Mestrado Integrado em Medicina

**ESTENOSE AÓRTICA DEGENERATIVA: HISTÓRIA NATURAL E
PERFIL DE FACTORES DE RISCO**

Juliana Andreia da Silva Rocha

Orientadora

Dra. Filomena da Assunção Gomes de Oliveira

Porto 2010

Resumo

Introdução: A estenose aórtica (EA) degenerativa é a doença valvular cardíaca mais comum no mundo ocidental, especialmente nos indivíduos de idade avançada. Para compreender a doença valvular aórtica é necessário explorar os três eventos inter-relacionados responsáveis pelo desenvolvimento da calcificação valvular: (1) a patogénese valvular, (2) os factores genéticos e, por último, (3) a história natural e os factores de risco.

Objectivos: Descrição da história natural e factores de risco implicados no desenvolvimento e progressão da doença valvular aórtica degenerativa. Analisando os mecanismos fisiopatológicos, genéticos e as terapêuticas médicas propostas, até à data, para a alteração do curso da doença.

Material e Métodos: A literatura necessária para a elaboração desta revisão bibliográfica foi obtida através da base de dados electrónica PUBMED.

Desenvolvimento: A EA calcificada foi tradicionalmente considerada um processo passivo e degenerativo que ocorre com o envelhecimento. Hoje em dia, a doença valvular aórtica calcificada é o resultado de um processo activo, potencialmente modificável, com um espectro de doença que vai desde a esclerose aórtica à estenose aórtica severa e sintomática. Não é possível prever com exactidão a sua taxa de progressão num determinado doente. Sendo importante realizar um seguimento clínico regular que deve incluir a pesquisa dos factores relacionados com a progressão da doença. As pesquisas actuais acerca da patogénese da doença valvular calcificada sugerem múltiplos alvos potenciais que podem interromper o processo da doença. Os dois tratamentos mais estudados são, as estatinas e os inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

Conclusão: Sugere-se um novo paradigma para a doença valvular aórtica calcificada que deve ir além da aterosclerose e integrar os vários mecanismos que regulam a formação da lesão com o objectivo de descobrir terapêuticas médicas inovadoras que possam diminuir a evolução e a progressão da doença ao longo do tempo.

Palavras chave: estenose aórtica, degenerativa, calcificação, esclerose aórtica, história natural, factores de risco, progressão, tratamento médico, estatinas, inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

Introdução

A estenose aórtica (EA) degenerativa é a doença valvular cardíaca mais comum no mundo ocidental, especialmente nos indivíduos de idade avançada. ^[1,2] Constitui a terceira causa mais comum de patologia cardiovascular, após a hipertensão e a doença arterial coronária. ^[3,4,5]

A doença valvular aórtica degenerativa é reconhecida como um processo lentamente progressivo, que se inicia como esclerose aórtica (EsA), sem evidências de obstrução, e que progride subsequentemente para calcificação exuberante e estenose valvular severa. ^[6]

Estudos realizados documentaram que a doença valvular aórtica degenerativa (ou calcificada) está presente em 28% dos adultos com idade entre os 50 e os 75 anos. A EsA apresenta uma prevalência de 21-26% e a EA de 2-7 %. ^[7,8] A incidência da EsA com o avanço da idade é de 20% nos doentes com 65 a 75 anos, 35% entre os 75 a 85 anos e cerca de 57% nos doentes com mais de 85 anos, na EA é de 1-3%, 2-4% e 4% para os mesmos grupos etários. ^[8]

A esclerose valvular associa-se a um aumento de 50% no risco de eventos cardiovasculares (morte, enfarte do miocárdio e insuficiência cardíaca), após 5 anos e a EA aumenta esse risco em 80%. ^[9,10] Os doentes com graus de EA ligeira a moderada apresentam também taxas de mortalidade superiores à população geral. ^[11,12]

A EA severa sintomática é universalmente fatal se não tratada atempadamente. A cirurgia de substituição valvular consiste, actualmente, no único tratamento eficaz a longo prazo, estando recomendada nos doentes com doença valvular avançada. ^[13,14] Em circunstâncias favoráveis, as válvulas aórticas podem ser substituídas cirurgicamente com bons prognósticos a curto e a longo prazo, mesmo quando a estenose é acompanhada de disfunção ventricular esquerda. A taxa de mortalidade intra-hospitalar para este tipo de cirurgia é de 3 a 13%. ^[3] Contudo, a EA é uma doença prevalente na idade mais avançada e estes doentes frequentemente apresentam co-morbididades associadas, que podem condicionar uma evolução mais desfavorável no peri-operatório, aumentando substancialmente o risco de complicações cardiovasculares maior ou de morte. Os novos procedimentos percutâneos podem diminuir a morbilidade e mortalidade da substituição valvular. No entanto, a aplicabilidade destes procedimentos parece ser limitada à população mais idosa e com elevado risco cirúrgica. São necessários mais ensaios clínicos para avaliar a eficácia e os efeitos adversos desta terapêutica nestes doentes. ^[15]

Inicialmente a doença valvular aórtica era resultante de um processo degenerativo. ^[16,17] Actualmente, tendo em conta os estudos histopatológicos e epidemiológicos das últimas duas décadas, é entendida como um processo complexo e biologicamente activo, com muitas

semelhanças à aterosclerose, no qual ocorre disfunção endotelial, acumulação de lípidos, inflamação e calcificação.^[1]

Para compreender a doença valvular aórtica é necessário explorar os três eventos inter-relacionados responsáveis pelo desenvolvimento da calcificação valvular: (1) a patogénese valvular, (2) os factores genéticos e, por último, (3) a história natural e os factores de risco. A inter-relação destes eventos culmina na via final comum da doença e a sua compreensão é crucial para implementar, em tempo útil, melhores medidas preventivas e terapêuticas.

Objectivos

O objectivo principal desta revisão consiste na descrição e exposição da história natural e factores de risco implicados no desenvolvimento e progressão da doença valvular aórtica degenerativa ou calcificada. Analisando os mecanismos fisiopatológicos e genéticos subjacentes, assim como, as terapêuticas médicas propostas, até à data, para a alteração do curso da doença.

Material e Métodos

A literatura necessária para a elaboração desta revisão bibliográfica foi obtida através da base de dados electrónica PUBMED (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Com objectivo de encontrar o máximo de artigos científicos relacionados com o tema deste trabalho, as palavras-chave usadas na pesquisa foram: *aortic valve stenosis, degenerative, calcific, valvular heart disease, risk factors, natural history, etiology, aging, patobiology, epidemiology, medical treatment*.

Desenvolvimento

1. Patogénese

A EA calcificada foi tradicionalmente considerada um processo passivo e degenerativo que ocorre com o envelhecimento. Contudo, achados significativos demonstram que as alterações subjacentes resultam de um processo activo, semelhante à aterosclerose.^[18,19,20] As principais alterações histológicas da EA calcificada são a inflamação, *remodelling* da matriz extracelular, fibrose, espessamento valvular, angiogénese, e, ainda a calcificação.^[17,21,22,23] O stress mecânico juntamente com os factores de risco ateroscleróticos, resultam na disfunção endotelial seguida pela deposição de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), assim como de outros compostos que desencadeiam o processo inflamatório que, por si só, activa as células intersticiais valvulares a se diferenciarem em osteoblastos.^[24]

Tendo em conta estes achados, a doença valvular aórtica calcificada não é mais considerada uma consequência benigna do envelhecimento (figura I e II).

A válvula aórtica normal é composta por três camadas. A *ventricularis*, como o próprio nome indica, é a que fica em contacto com a câmara cardíaca, constituída por fibras ricas em elastina que estão dispostas numa direcção radial, perpendicular à margem dos folhetos. A *fibrosa*, que é a que se encontra em contacto com a aorta, composta principalmente por fibroblastos e fibras de colagénio dispostas de forma circunferencial, paralelas à margem dos folhetos. E, por último, a *esponjosa*, que é uma camada de tecido conjuntivo frouxo, na base dos folhetos, entre a *fibrosa* e a *ventricularis*, constituída por fibroblastos, células mesenquimatosas e uma matriz rica em mucopolissacáridos.^[25,26] Estas camadas fornecem uma flexibilidade e capacidade de resistência ao longo de anos de movimentos repetidos.^[6]

1.1 Células endoteliais

A superfície das cúspides valvulares é recoberta por células endoteliais, que têm um papel importante na manutenção de uma superfície não-trombogénica e ainda, na transdução de sinais mecânicos e bioquímicos.^[27]

Durante o desenvolvimento e a progressão da EA, verifica-se uma disfunção endotelial que é caracterizada por uma perda progressiva das células endoteliais, seguida por infiltração de células inflamatórias.^[28] Notavelmente, a camada de células endoteliais da válvula aórtica calcificada parece estar danificada especialmente na face aórtica, representando, assim, um importante factor desencadeante da doença valvular.^[29,30]

As células endoteliais maduras têm uma capacidade regenerativa limitada, que é dependente das células progenitoras endoteliais em circulação.^[31,32,33] Na doença aterosclerótica verifica-se uma redução do número e da função das células endoteliais progenitoras e, este facto, está relacionado com a disfunção endotelial e com eventos clínicos adversos.^[34,35,36] Isto sugere que a lesão endotelial, na ausência de reparo eficiente, promove a progressão da doença vascular ou valvular.

O estudo de Matsumoto et al,^[37] demonstra que as células endoteliais senescentes estão presentes na face aórtica das válvulas degenerativas e que o número e a capacidade de migração das células endoteliais progenitoras estão significativamente diminuídos nos doentes com EA em comparação com os do grupo controlo. Isto poderá indicar a existência de um mecanismo molecular subjacente que aumenta as células senescentes, a apoptose das células endoteliais progenitoras e, ainda, a redução do seu número nos doentes com EA. Estes dados sugerem que, tal como na aterosclerose, estes doentes exibem uma regeneração diminuída das células endoteliais valvulares.

A destruição da integridade das células endoteliais ocorre em áreas de fluxo anormal e turbulento, nomeadamente na face aórtica ^[37,38] e o stress hemodinâmico parece resultar num aumento da taxa de turnover das células endoteliais, ^[37,39] perda de telómeros ^[37,40] e áreas focais de células endoteliais senescentes. ^[37,41]

A diminuição da capacidade regenerativa pelas células endoteliais progenitoras parece ser responsável pela disfunção endotelial sistémica persistente, ^[42,43] pelos eventos adversos cardiovasculares em doentes com EA ^[9, 44] e pela rápida progressão da doença e, ainda, pela incapacidade de reparo eficaz da camada de células endoteliais na face aórtica. ^[45]

Por último, no estudo Matsumoto et al, ^[37] existem evidências de que os mecanismos que regulam o tempo de sobrevivência e morte celular parecem estar alterados nos doentes com EA.

Os dados apresentados indicam que os doentes com EA revelam sinais associados com o envelhecimento “biológico”. ^[46] Devido à presença de células endoteliais senescentes e aos níveis reduzidos de células endoteliais progenitoras, não é mais possível manter a camada de células endoteliais intactas, conduzindo, assim ao desenvolvimento da doença valvular aórtica calcificada.

1.2 Células intersticiais

Para a compreensão da patologia valvular é, ainda, essencial, conhecer os outros tipos de células envolvidas, nomeadamente as células intersticiais valvulares e os leucócitos (ver adiante). Nas três camadas existentes na válvula aórtica, são identificadas abundantes células tipo fibroblastos, positivas para os filamentos proteicos intermediários mesenquimais e vimentina, que constituem as células intersticiais mais comumente referidas. Uma subpopulação destas células é positiva para a actina alfa do músculo liso (AML α) e são referidas como miofibroblastos. ^[47]

As células positivas para AML α aumentam em número durante as alterações escleróticas e de calcificação. São consideradas como a forma “activa” das células tipo-fibroblastos. ^[17, 48] Apesar de estas serem centrais no conceito actual da EA calcificada, pouco ainda se conhece acerca da existência de diferentes subpopulações de células intersticiais valvulares.

1.3 Remodelling da matriz extracelular na EA

Várias proteínas da matriz extracelular, normalmente encontradas no osso, incluindo a osteocalcina, osteopontina, osteonectina, proteína morfogenética óssea (BMP), metaloproteinases da matriz-2 (MMP-2) e MMP-9, estão presentes em fenómenos de

calcificação cardiovascular, incluindo as válvulas aórticas calcificadas, no entanto, em geral, não se encontram no tecido cardiovascular normal. ^[26]

As metaloproteínases da matriz (MMPs) são as mais comumente associadas com a patogénese da EA calcificada. Estas são um grupo de endopeptidases dependentes do zinco (colagenases, gelatinases e estromalisinas) que são secretadas como pró-enzimas inactivas por vários tipos de células, nomeadamente, células intersticiais valvulares,^[49] monócitos-macrófagos, ^[50] linfócitos ^[50] e as células endoteliais. ^[51] As MMPs quando activadas, aumentam o espaço na matriz extracelular para a migração celular (por exemplo, células tumorais) e activam ou regulam as moléculas livres de sinalização (por exemplo, factor transformador do crescimento beta, TGF β). ^[53]

A inibição das MMPs é mediada principalmente pela ligação aos inibidores teciduais das metaloproteínases (TIMPs). O equilíbrio local entre a expressão das MMPs e dos TIMPs, parece influenciar a extensão do *remodelling* dos tecidos. ^[53]

Em particular, foi observado o aumento no MMP-1 em locais de aumento do TNF- α , o que sugere uma importante ligação entre o *remodelling* da matriz e a inflamação. ^[53,54,55] Para além disso, outras MMPs estão aumentadas em condições patológicas, como o MMP-3 e o MMP-9. ^[53,56] Relativamente ao MMP-2, os achados são contraditórios. ^[51,53,57,58,59,60] O comportamento dos inibidores do MMP-1 e MMP-2 (TIMPs) é ainda mais controverso: alguns estudos falharam em mostrar o aumento dos TIMPs ^[55] ou mostraram pequenos aumentos, ^[58] enquanto que outros documentaram aumentos significativos. ^[53,60] É possível que o balanço entre as MMPs e os seus inibidores nas válvulas aórticas estenosadas, seja dependente das fases de progressão da doença, nas quais, a prevalência do *remodelling* pode variar ao longo do tempo. Para além disso, outras enzimas com acções líticas nas fibras elásticas são muito mais representativas nas válvulas aórticas calcificadas em relação ao normal, nomeadamente as catepsinas G, S, K e V. ^[61,62] A associação entre a catepsina G e o TGF- β 1 nos mastócitos, sugere o papel importante da inflamação na activação deste processo. ^[61]

Outra proteína extracelular, a tenascina C, ocorre nas válvulas aórticas estenóticas em associação com o MMP-2. ^[63] A tenascina C é uma glicoproteína da matriz extracelular implicada na proliferação, migração, diferenciação e apoptose dos osteoblastos. ^[64] A sua expressão parece estar relacionada com o grau da patologia valvular, extensão da calcificação, angiogénese e fibrose. ^[63]

1.4 Biomineralização/Calcificação

Durante várias décadas a EA calcificada foi associada a doenças caracterizadas por perturbações no metabolismo do cálcio, como a insuficiência renal crónica e hemodiálise. [65,66].

Estudos evidenciaram que a calcificação cardiovascular é composta por depósitos de hidroxiapatite, colagénio, osteopontina e outras proteínas minor da matriz óssea. [22,67,68] Estas alterações foram confirmadas histologicamente nas válvulas aórticas calcificadas, assim como a presença de células tipo-osteoblastos. [22,69]

A isoforma óssea da fosfatase alcalina e várias proteínas da matriz associadas com o osso foram as primeiras proteínas a ser pesquisadas na EA calcificada, em comparação às válvulas aórticas nativas. Estas proteínas encontram-se aumentadas e são secretadas pelas células intersticiais valvulares, monócitos-macrófagos e talvez linfócitos T. [24] Ao contrário das proteínas fibrilares da matriz extracelular, como o colagénio, que apresentam um papel estrutural, estas proteínas actuam como reguladores da biomineralização (Tabela I).

Tabela I - Reguladores da biomineralização

Proteína	Descrição
Fosfatase Alcalina	Essencial para a formação de nódulos de calcificação. Expressão aumentada na doença valvular aórtica calcificada pelas células intersticiais.
Proteínas não-colagenosas da matriz	
BGP/osteocalcina	Quimioatrativa para monócitos e células do mesênquima.
MPG	Protege os tecidos não ósseos da calcificação.
SPARC/osteonectina	Glicoproteína. Inibe a angiogénese e as MMPs. Induz a apoptose.
Osteopontina	Glicoproteína ácida. Inibe a calcificação dos tecidos.
Sialoproteína óssea	Glicoproteína ácida. Importante na enucleação da hidroxiapatite.

BGP, bone matrix γ -carboxyglutamic acid protein; MPG, matrix γ -carboxyglutamic acid protein.

Foi verificado o aumento da expressão genética de osteopontina, sialoproteína óssea e Runx2/Cbfa1 (factor de transcrição específico dos osteoblastos para a formação de osso) nas válvulas aórticas calcificadas em comparação com as válvulas do grupo de controlo, obtidas de

transplantes cardíacos. Foi, ainda, demonstrada a expressão de proteínas morfogenéticas 2 e 4 (BMP2/4), que apresentam uma importante função osteogénica, em áreas das válvulas onde a ossificação foi identificada.^[70] Após um curto período de exposição das células intersticiais da válvula aórtica humana à PMO-2 ocorre a indução da expressão do Runx2 e osteopontina. A via ERK1/2 modula a expressão da osteopontina induzida pela PMO-2 e a via Smad1 tem um papel importante na regulação da expressão de ambas.^[26]

O fenótipo pró-osteogénico das células intersticiais da válvula aórtica foi também associado a altos níveis de receptores tipo-Toll (TLR) 2 e 4. Após a estimulação com agonistas TLR2 e TLR4, as células intersticiais da válvula aórtica expressam níveis aumentados de mediadores pró-inflamatórios e pró-osteogénicos (BMP2) e maior número de alterações fenotípicas osteogénicas (actividade da fosfatase alcalina, formação de nódulos calcificados), em comparação com as células intersticiais da válvula pulmonar.^[71]

A fetuína A é também um regulador da biomineralização, que se encontra em circulação. Consiste numa glicoproteína sérica major sintetizada no fígado que pertence à família dos inibidores da protease da cisteína. É um importante inibidor da calcificação tecidual e a sua delecção em modelos animais resulta, em calcificação vascular e valvular.^[72] Para além disso, verificam-se concentrações elevadas da fetuína A nas válvulas calcificadas em comparação com as nativas, traduzindo possivelmente uma tentativa de impedir a progressão da calcificação.^[73]

Os dados actuais indicam que o processo de calcificação da válvula aórtica é um evento multi-factorial activo, mediado por um mecanismo de diferenciação osteoblástico, no qual inúmeras vias convergem para aumentar a progressão da doença.^[74]

Para testar a hipótese osteoblástica, é importante demonstrar as vias de sinalização. E as mais envolvidas são a do Wnt, sistemas da angiotensina e cinina ou o sistema OPG/RANKL/RANK. Estas vias actuam nas células intersticiais valvulares e destas uma subpopulação desenvolve um fenótipo osteoblástico. Esta diferenciação é muitas vezes detectada pelo aumento da fosfatase alcalina, proteínas da matriz como a osteopontina ou osteocalcina e o Runx2/Cbfa1.^[24]

A rede recentemente identificada de citocinas que envolve o receptor activador do factor-kB nuclear (RANK), o seu ligando (RANKL) e o receptor solúvel osteoprotegerina (OPG), tem um importante papel na biologia do esqueleto, sistema imune e vascular. O RANKL, um membro da superfamília TNF α , é uma proteína transmembranar presente na superfície dos osteoblastos, células estromais, células T e células endoteliais. O RANKL interage com a proteína transmembranar RANK nos precursores ou nos osteoclastos já maduros, células T e células endoteliais, e causa a sua diferenciação ou activação via NF-kB. Esta interacção pode ser bloqueada pela OPG solúvel, que previne efectivamente a diferenciação dos osteoclastos.

^[75] É reconhecido actualmente o papel deste sistema OPG/RANKL/RANK no metabolismo ósseo e na calcificação cardiovascular. Neste último, os mecanismos precisam de ser mais extensamente avaliados. Nas válvulas nativas e calcificadas, o RANK/RANKL e o OPG são inversamente sintetizados. ^[76,77] O RANK e o RANKL são quase indetectáveis em válvulas normais, enquanto que nas válvulas com estenose encontram-se aumentados. ^[76,77] O OPG está tipicamente presente em grandes quantidades nas válvulas normais mas significativamente reduzido nas válvulas calcificadas. ^[76] A administração de RANKL, em cultura de células intersticiais valvulares, induz um fenótipo tipo-osteoblastos e favorece a formação de osso, isto é, aumenta a formação de nódulos, actividade da fosfatase alcalina e aumenta a síntese de elementos da matriz óssea. ^[76] Em modelos animais, o défice de OPG resulta em calcificação dos vasos de médio e grande calibre, ^[78] indicando que a OPG protege os vasos da calcificação. Contudo, a OPG inibe a reabsorção do osso esquelético ao interferir com a osteoclastogénese. ^[75] A sua acção parece ser contextualmente diferente. Enquanto que a OPG pode evitar o início da calcificação aórtica, não a pode reverter. ^[79] Sendo assim, as evidências actuais suportam a hipótese de que o aumento na razão RANKL/RANK e a redução na concentração de OPG favorecem a calcificação na EA calcificada.

1.5 Angiogénese, factores de crescimento

As válvulas aórticas normais são avasculares, e o fornecimento de oxigénio ocorre por mecanismos de difusão a partir do fluxo de sangue que atravessa a válvula. No entanto, na EA calcificada é observada formação de vasos sanguíneos ou angiogénese (F11, F25, F26). [23,28,80]

O número de vasos pode diminuir com a progressão da estenose e calcificação mas os dados actuais são inconclusivos. ^[28,80] Os factores angiogénicos encontrados nas válvulas cardíacas são o factor de crescimento endotelial A (VEGF-A), ^[28] o seu receptor VEGFR-1/2 e o Tie-2 (receptores tirosina-cinases que se ligam a angiopoietinas). ^[80] Estes factores são sintetizados pelas células estromais e leucócitos. Os factores anti-angiogénicos encontrados são a condromodulina-I, ^[81] endostatina ^[80] e o SPARC. ^[82] A cultura de células endoteliais de válvulas calcificadas apresentam um aumento da actividade angiogénica. ^[80]

A identificação imunohistoquímica dos marcadores de células endoteliais (CD31, CD34, factor de von-Willibrand e Tie-2) e ainda, das moléculas de adesão celular (CEACAM-1) revela uma intensa vascularização das cúspides estenóticas. ^[82]

Entre os factores angiogénicos, o VEGF-A, desempenha um papel importante tanto em condições fisiológicas como patológicas, dada a sua capacidade biológica única em induzir a migração e a proliferação das células endoteliais, aumenta a permeabilidade vascular e modula a trombogenicidade. ^[80] Para além disso, o VEGF-A é um potente indutor da expressão de

metaloproteinases que degradam a matriz, e estas enzimas parecem desempenhar um papel permissivo essencial na migração induzida pelo VEGF *in vivo*.^[54]

Na patogénese da EA degenerativa, a lesão do endotélio é uma etapa inicial importante para o espessamento valvular, que resulta da deposição anormal da matriz extracelular e impede o fornecimento de oxigénio por difusão. A tensão de oxigénio diminuída provoca a expressão do gene VEGF-A *in vivo* e em *in vitro*.^[80,83,84] De forma semelhante, a produção de Flt-1 e Flk-1, aumenta em resposta à hipóxia, contudo, este aumento é inferior e baseado em mecanismos diferentes em relação ao VEGF-A.^[85] Assim, em válvulas aórticas lesadas, a produção do VEGF-A e dos seus receptores como resultado da tensão de oxigénio diminuída, pode conduzir ao aumento da angiogénese nos tecidos. Esta pode ser posteriormente aumentada pela secreção de outros factores angiogénicos (C31).

A angiogénese está relacionada com a inflamação crónica, que envolve proliferação, migração e recrutamento de células inflamatórias. Os macrófagos/monócitos, por exemplo, são induzidos a libertar grandes quantidades de factores angiogénicos sobre condições hipóxicas (prostaglandina E, interleucina-6 e interleucina-1).^[86,87] O VEGF-A por si só pode, reciprocamente, contribuir para a expressão de células inflamatórias pela resposta quimiotáctica dos monócitos, através do receptor Flt-1, e também é conhecido como promotor da activação da migração dos monócitos/macrófagos.^[88,89,90]

A angiogénese é também essencial para o crescimento longitudinal do osso e os factores angiogénicos como o VEGF-A, são requeridos para a formação do osso endocondral e na condensação de fracturas. A presença de neo-angiogénese em todas as válvulas com ossificação, é consistente com a hipótese de que este processo facilite a formação de osso endocondral nas válvulas calcificadas.^[91]

Deste modo, a neo-vascularização pode ser um mecanismo importante no remodelling da válvula aórtica e eventual formação de calcificação.

1.6 Mecânica do fluxo

As alterações na mecânica do fluxo que ocorrem progressivamente no local da EA podem, por si só, contribuir para a progressão da doença, amplificando as alterações biológicas que estão subjacentes à evolução da estenose. À medida que a velocidade do fluxo aumenta através da válvula aórtica, o stress de cisalhamento instala-se e ocorre um fluxo turbulento. Isto pode activar as células endoteliais a libertarem factores que alteram a função de barreira e aumentam a coagulação, a adesão de leucócitos e a proliferação dos miofibroblastos.^[92]

Apesar de estas alterações existirem como mecanismos protectores, acabam por resultar em lesão tecidual, função de órgão alterada e resposta fibroproliferativa anormal.^[93]

Especificamente, os doentes com válvulas bicúspides, ao estarem sujeitos a maior stress mecânico, tendem a apresentar as alterações patológicas cerca de 20 anos mais cedo em comparação com as válvulas tricúspides. ^[94,95]

Estas forças de cisalhamento podem afectar diferentes vias relacionadas com a progressão da EA, nomeadamente, ciclo celular, libertação de prostaciclina e óxido nítrico, stress oxidativo, acumulação de lipoproteínas, inflamação, migração e, por último, diferenciação de células musculares lisas vasculares e neoangiogénese. ^[93]

1.7 Hemostase

A EA foi durante muito tempo associada a alterações hemorrágicas. Em 1958, Heyde descreveu a associação entre episódios de hemorragia gastrointestinal frequente e EA (síndrome de *Heyde*). ^[96] Mais tarde, foi demonstrado que a hemorragia em contexto de EA estava relacionada com a doença de von Willebrand tipo 2A, caracterizada pela diminuição dos multímeros do factor de von Willebrand devido à acção da ADAMTS-13, uma metaloproteinase da matriz que actua no factor de von Willebrand, preferencialmente sob condições de alto stress de cisalhamento na parede, neste caso consequência da estenose valvular. ^[97,98] Este fenómeno conduz, em alguns casos a episódios de hemorragia significativos, como as hemorragias gastrointestinais recorrentes algumas vezes associada à angiodisplasia. De notar que os episódios de hemorragia podem por vezes ser controlados apenas pela substituição da válvula aórtica, quando os multímeros do factor de von Willebrand voltam aos níveis normais. ^[93]

Esta perturbação dos multímeros do factor de von Willebrand afecta também a função plaquetária com redução na contagem de plaquetas, tempo de hemorragia prolongado e alteração da agregação plaquetária. ^[97,99,100]

As evidências acerca do comportamento do factor de von Willebrand antes e depois da cirurgia de substituição aórtica, sugerem que as anormalidades relacionadas com esta molécula, não são causadores de doença valvular aórtica, mas sim uma consequência.

As plaquetas desempenham um papel importante na patogénese da aterosclerose e a sua reactividade parece estar aumentada nos doentes com EA. ^[102] In vitro, as regiões calcificadas das válvulas aórticas aumentam a agregação das plaquetas. ^[103] Foi sugerido que as plaquetas podem estar envolvidas no desenvolvimento da EA e microtrombos organizados foram demonstrados nas válvulas aórticas com estenose. ^[102] As plaquetas activadas estimulam a migração das células de músculo liso vasculares e exercem efeitos pró-inflamatórios. ^[104] Os efeitos benéficos do tratamento com aspirina estão bem estabelecidos, particularmente como prevenção secundária em doentes com doença vascular (BB94).

Permanece por determinar se a aspirina pode também prevenir o desenvolvimento ou reduzir a progressão da doença valvular aórtica.

A associação entre a esclerose aórtica e a resistência das plaquetas ao óxido nítrico (ON) é intrigante. [16] É possível que mecanismos sistémicos ou genéticos subjacentes à resistência das plaquetas ao ON (por exemplo, sequestro do ON por radicais superóxido), estejam associados com o aumento das espécies reactivas de oxigénio ao nível dos folhetos da válvula aórtica. Para além disso, o ON das plaquetas funciona como um inibidor da agregação, e a resistência ao ON implica um estado pró-trombótico nos doentes com doença valvular aórtica calcificada. [105]

Os doentes afectados pela doença aórtica têm uma activação mais marcada da coagulação e da fibrinólise, identificando-se níveis aumentados da protrombina, complexo trombina-antitrombina e de d-dímeros em relação aos controlos. [106]

Em sumário, o conhecimento actual sobre o papel da coagulação, fibrinólise e marcadores de activação de plaquetas sugere que estas vias possam estar envolvidas na progressão da doença valvular aórtica, contudo são necessária mais evidências científicas para comprovar tais associações.

1.8 Stress oxidativo

Foi documentado que nas válvulas aórticas estenosadas, existe um aumento do stress oxidativo, demonstrado pelos níveis aumentados de superóxido e peróxido de hidrogénio nas regiões calcificadas e peri-calcificadas da válvula, em comparação com o grupo de controlo. [107,108] Em paralelo, com o aumento das espécies reactivas de oxigénio, existe ainda uma redução na expressão e actividade das enzimas anti-oxidantes, como catalase e oxidase do NADPH (Nox2 e Nox4). [107]

O stress oxidativo parece desempenhar um papel central no processo de calcificação valvular. As espécies reactivas de oxigénio aumentam a transcrição das vias da Wnt/ β -catenina, Runx2/Cbfa1 e Msx2 que promovem o *remodelling* osteocondrogénico e transformação dos miofibroblastos no sentido de um fenótipo osteoblástico. Miller et al [107] sugerem que o principal mecanismo subjacente à produção das espécies reactivas de oxigénio poderá ser específico dos tecidos, e que a nível valvular resultará do desacoplamento da actividade da sintase do NO.

1.9 Sistema da renina-angiotensina e da calicreína-cinina

A angiotensina II (AngII) tem vários efeitos adversos no coração, mediados, principalmente, pelo receptor tipo 1 da AngII. Existe um aumento de evidências, em estudos in

vitro, de que os sistemas da renina-angiotensina (SRA) e da calicreína-cinina (SCC) regulam a homeostasia da matriz extracelular nas válvulas cardíacas. ^[109]

Nas válvulas calcificadas podem ser demonstradas três enzimas capazes de formar a AngII: ECA, catepsina G e quimase. ^[110] São todas localmente produzidas pelos macrófagos-monócitos (ECA) ou pelos mastócitos (catepsina G e quimase). ^[24] A fonte principal da ECA é extracelular e co-localizada com as apolipoproteínas B, um componente das partículas LDL, o que sugere que a enzima pode ser transportada para a lesão através de partículas de colesterol LDL. ^[24]

As três enzimas podem inactivar o agente anti-fibrótico bradicinina (BK), que consiste numa cinina produzida pela acção da calicreína sobre a sua pró-forma. ^[107]

Foi demonstrado, ainda, que as células intersticiais das válvulas normais e da EA calcificada contêm receptores para a AngII (AT1) e BK (1 e 2). A densidade destes receptores na superfície da célula é maior na válvula com EA em comparação com as células normais. ^[109]

Estes achados sugerem que o SRA e o SCC são importantes no tecido valvular aórtico e na EA calcificada, podendo existir um balanço entre eles que condiciona um estado mais pró-fibrótico.

Serão necessárias investigações futuras para definir de forma mais precisa o papel potencial do sistema renina-angiotensina na patogénese da doença valvular calcificada.

1.10 Infecção

A hipótese de que um agente infeccioso, a *Chlamydia pneumoniae*, esteja relacionado com a progressão da EA, foi proposta por vários autores ao longo dos anos, no entanto com muitas contradições. ^[111,112,113] Estudos que avaliaram a relação da esclerose e estenose aórtica com a *Chlamydia*, não mostraram respostas definitivas. ^[113,115,116] Tendo em conta, o possível papel de outros agentes infecciosos, Bratos-Perez et al ^[117] demonstram recentemente que uma percentagem significativa de válvulas aórticas severamente estenosadas, obtidas de cirurgias (48/75, 64%), mostraram a presença de nanobactérias que podem representar novas entidades patogénicas, cuja presença já foi identificada na doença carotídea, nos aneurismas da aorta abdominal, nos vasos e nas válvulas calcificadas.

Todavia, são necessárias mais evidências para uma demonstração clara do papel destes agentes na doença aórtica calcificada.

3.11 Inflamação

As válvulas aórticas normais não apresentam células inflamatórias, com o avanço da idade podem aumentar o número de macrófagos dispersos e mastócitos mas numa situação normal, não existem linfócitos.^[24] Em contraste, nas válvulas calcificadas existem células semelhantes a monócitos-macrófagos e linfócitos T. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos e encontram-se na fronteira da calcificação, a secretar proteínas da matriz, nomeadamente, osteopontina, osteonectina, osteocalcina e BMP 2 e 4.^[102] Enquanto que, os linfócitos T estão nas vizinhanças dos macrófagos – mas não tão próximos dos limites da calcificação – o que é consistente com o seu papel regulador.^[118] No entanto, a sua função exacta permanece, ainda, incerta.

Há mais de uma década que se reconhece que as lesões iniciais na válvula aórtica são caracterizadas por infiltração de células inflamatórias mas a contribuição da inflamação e dos seus mediadores tornou-se recentemente mais detalhada. Nomeadamente, o complexo C5b-9 foi identificado com aumento da expressão dos receptores de C3a e C5a.^[119] As válvulas com estenose mostram, ainda, um aumento na expressão da interleucina-1 β que está associada ao aumento de metaloproteinases da matriz;^[54] do factor de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1), que induz a apoptose e mineralização das células intersticiais da válvula aórtica;^[120] do factor de necrose tumoral α da matriz extracelular (TNF α) (C91) e das moléculas de adesão endotelial (molécula de adesão intercelular-1, ICAM-1; moléculas de adesão vascular-1, VCAM-1; proteína de adesão vascular-1; eotaxina 3 e da monoquina induzida pelo interferon- γ).^[55] O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória e está associada ao aumento na morbilidade e mortalidade vascular. *In vitro*, estimula a transdiferenciação dos miofibroblastos valvulares num fenótipo osteoblástico e forma nódulos calcificados. Estimula também a expressão da MMP-1.^[121] Esta variedade de mediadores inflamatórios sugere fortemente a contribuição da inflamação no curso da doença valvular aórtica.

As válvulas aórticas normais têm uma expressão substancial de receptores Toll 2 e 4, que são conhecidos por desempenharem um papel importante na expressão de citocinas pró-inflamatórias em várias populações celulares, especialmente nas células intersticiais.^[122] Estudos *in vitro* ^[122] mostraram a existência de receptores Toll funcionantes nas células intersticiais aórticas, cuja estimulação pelos peptídeoglicanos ou lipopolissacarídeos, pode causar a activação da via NF- κ B com consequente produção e libertação de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, interleucina-6, IL-8, ICAM-1 e de factores relacionados com a osteogénese, BMP-2 e o Runx2/Cbfa1, suportando uma ligação causal entre a inflamação e a osteogénese na válvula aórtica.

Os níveis séricos elevados das moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular-1, molécula de adesão vascular-1 e E-selectina) foram também detectados em doentes com EA

severa e sem doença coronária, presumivelmente reflectindo um aumento da expressão relacionado com a inflamação do endotélio valvular lesionado. ^[123]

1.12 Aterosclerose

O desenvolvimento e a progressão da EA calcificada resultam de um processo atero-inflamatório activo que é constituído por componentes inflamatórios locais e deposição de lipoproteínas plasmáticas nas lesões. Este processo partilha algumas características com aterosclerose, no entanto existem diferenças importantes. ^[2]

As lesões iniciais na doença valvular aórtica incluem a ruptura da membrana basal, acumulação subendotelial de lípidos intracelulares e lipoproteínas, infiltração de macrófagos (células-espuma) e linfócitos T juntamente com a activação local e sistémica da inflamação, de forma semelhante à aterosclerose. Por outro lado, a calcificação é mais acentuada na doença valvular aórtica do que na aterosclerose e o espessamento de fibrocalcificação é responsável pelas manifestações clínicas da doença.

Metabolismo lipídico

Entre os factores de risco tradicionais para aterosclerose, as anormalidades no metabolismo lipídico foram frequentemente associados com a doença valvular aórtica calcificada. Em 1994, Otto et al, descreveram a possibilidade de ligação entre o metabolismo lipídico e a doença valvular aórtica calcificada, ao demonstrar a presença de grandes quantidades de lípidos intra e extracelulares nas válvulas afectadas em relação às normais. ^[17] A apolipoproteína B, (a) e E estão presentes na vizinhança destas áreas ricas em lípidos, sugerindo que os lípidos têm origem nas lipoproteínas do plasma. ^[124]

Desde então, a hiperlipidemia foi fortemente investigada como um mecanismo subjacente à progressão da EA e vários estudos suportam uma associação significativa entre o metabolismo lipídico e a doença valvular aórtica. Foi recentemente demonstrado que os esteróis vegetais e precursores de colesterol acumulam-se nas válvulas aórticas calcificadas numa relação directa com as respectivas concentrações séricas. ^[125] Isto demonstra claramente que os lípidos em circulação são capazes de se acumular no interstício dos folhetos da válvula aórtica e, assim, exercer efeitos locais.

Além de que, as válvulas aórticas calcificadas contêm níveis aumentados de receptores de lipoproteínas de baixa densidade relacionados com a proteína-5 (LRP5), um membro da família de receptores da superfície que estão envolvidos em diversos processos biológicos, incluindo o metabolismo lipídico. O LRP5 tem um papel importante na activação do crescimento de osso esquelético e na diferenciação dos miofibroblastos do mesênquima da

válvula em osteoblastos, fornecendo, assim uma outra ligação entre o metabolismo lipídico e a calcificação aórtica. ^[126]

As LDL (LDLox) oxidadas, com propriedades pró-inflamatórias e pró-proliferativas, foram também identificadas. As válvulas com alto conteúdo de LDLox são mais escleróticas, mostram uma maior infiltração de leucócitos e contêm mais TNF α . ^[127]

Doença valvular calcificada Versus Aterosclerose

Apesar das semelhanças entre as características histológicas e factores clínicos (ver adiante), existem também algumas discrepâncias. Por exemplo, enquanto que as células musculares lisas estão envolvidas, de forma proeminente, na aterosclerose, na doença valvular aórtica não existem células musculares típicas. Verificam-se outros tipos de células, nomeadamente os fibroblastos e os miofibroblastos. ^[6] Para além disso, a calcificação pode estar presente nas placas ateroscleróticas, no entanto esta é uma característica essencial na doença valvular aórtica, particularmente nos estadios mais avançados da doença e instala-se precocemente.

Por último, a expressão clínica da EA é dependente da calcificação progressiva dos folhetos valvulares que condiciona um aumento gradual na espessura e obstrução significativa do fluxo. ^[6] Enquanto, que nos doentes com aterosclerose coronária, os eventos agudos estão relacionados com a ruptura da placa, trombose e oclusão vascular associadas. ^[6] Assim, as estratégias terapêuticas de estabilização da placa e antitrombóticas são actualmente a farmacoterapia da aterosclerose. Por outro lado, estas abordagens terapêuticas não serão tão benéficas na doença valvular calcificada.

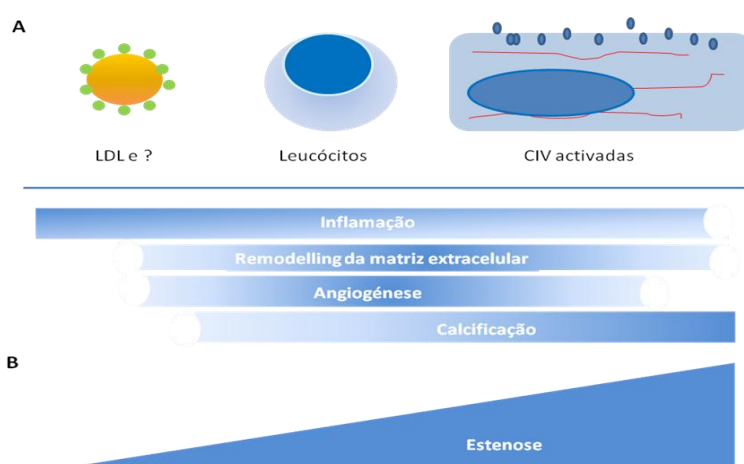


Figura I – Princípios básicos da patogénese da doença valvular aórtica calcificada.

(A) Acima da linha encontram-se os elementos chave da doença. A alteração das forças mecânicas na válvula aórtica conduz à infiltração de agentes desencadeadores da inflamação, como as LDL (incluindo as oxidadas) assim como outros factores ainda desconhecidos. Isto resulta num estado de inflamação

2. Factores Genéticos

Vários estudos genómicos avaliaram a possível associação entre a EA calcificada e factores genéticos, em particular, os envolvidos na aterosclerose e metabolismo ósseo.

Relativamente à aterosclerose, existem evidências de uma possível ligação entre o metabolismo lipídico e a progressão da doença valvular. ^[128] Alguns estudos avaliaram a prevalência de variantes alélicas da apolipoproteína E (apopE), A (apoA), e B (apoB) em doentes com EA. ^[129,130] Verificando-se um aumento da prevalência da variante alélica X+/X+ da apolipoproteína B e uma frequência de alelos da apoA semelhante entre os doentes com EA e grupo de controlo. ^[129] É ainda desconhecido se as variantes alélicas da apoE diferem entre os doentes. Alguns estudos documentam uma prevalência maior da apoE2 e da apoE4 na EA, no entanto, outros contradizem estes achados. ^[129,130,131] No geral, permanece ainda por responder à questão se a frequência das variantes alélicas destas lipoproteínas é diferente na EA em relação à população geral.

O papel da inflamação foi também investigado. Alguns polimorfismos do promotor do gene da interleucina-10, designados -1082, -819, -592, estão também associados com a extensão do conteúdo em cálcio das válvulas estenóticas extraídas durante intervenções cirúrgicas. ^[132]

Os geneticistas encontraram ainda uma associação entre os genes envolvidos na calcificação, nomeadamente, VDR (vitamin D receptor) e CTGF (connective tissue growth factor), e os doentes com EA. ^[133]

A genética relacionada com o metabolismo ósseo foi estudada através da avaliação dos polimorfismos do receptor da vitamina D (Bsm1 B/b), que predizem a densidade ou a massa mineral óssea. ^[1,134] Doentes com EA mostram elevadas frequências do alelo B, que está associado a redução da absorção de cálcio, perda mais rápida de osso com o avanço da idade e ainda, a altos níveis de paratormona, sugerindo que o perfil de metabolismo ósseo favorece a mobilização do cálcio do osso, o que pode promover a calcificação da válvula aórtica.

Para além disso, foi recentemente demonstrado que a mutação *nonsense* no gene NOTCH1, está associada com defeitos precoces e tardios na deposição do cálcio, causando progressão da doença valvular. ^[135] É conhecido que o gene NOTCH1 desempenha um papel importante na hemato-oncogénese, na sinalização das células progenitoras e na diferenciação celular durante a organogénese. Pode, ainda, actuar como um repressor da actividade transcripcional da proteína RunX2, importante na actividade osteoblástica, e a sua inibição pode causar a deposição de cálcio na válvula aórtica. ^[135]

Evidências preliminares sugeriram, ainda, o papel dos polimorfismos *PvuII* do receptor alfa do estrogénio no processo de calcificação da válvula, possivelmente ligados à prevalência

da calcificação da válvula aórtica nas mulheres pós-menopausa, nomeadamente naquelas com aumento dos níveis de colesterol. ^[136]

Finalmente, alguns genes reguladores do ciclo celular podem contribuir para a progressão da doença aórtica calcificada. Foi demonstrado que a expressão dos genes p21^{WAF1/CIP1} (inibidor da proteína cinase dependente da ciclina p21) e 14-3-3 σ , está reduzida nas válvulas aórticas calcificadas. ^[137]

Foi ainda sugerida uma predisposição familiar em alguns “clusters” de doentes com EA calcificada. ^[138]

Os estudos até à data sugerem que apenas os polimorfismos envolvidos no metabolismo ósseo parecem ter um papel mais evidente na progressão da doença valvular. ^[133] Permanece por clarificar a função desempenhada pelos polimorfismos relacionados com o metabolismo lipídico e regulação do ciclo celular.

3. História Natural e Factores de Risco

3.1. Etiologia

A instalação da doença valvular aórtica calcificada está associada a determinados factores clínicos que, quando presentes, aumentam o risco dos doentes para o desenvolvimento esta patologia.

Condições anatómicas

Os doentes com válvulas bicúspides estão expostos a um maior risco de eventos cardíacos relacionados com o desenvolvimento da EA. A válvula bicúspide ocorre quatro vezes mais nos homens e geralmente estes doentes apresentam EA severa antes dos 50 anos de idade. ^[139] Nesta situação, apesar de ocorrerem alterações histopatológicas semelhantes, os sintomas ocorrem cerca de 20 anos antes em comparação com a válvula tricúspide, devido ao stress mecânico aumentado ao nível dos folhetos e ao fluxo turbulento atribuídos à arquitectura anormal da válvula aórtica. ^[45] As anormalidades teciduais verificadas nestes doentes estendem-se para além da válvula aórtica. Apresentam uma maior incidência de aneurisma da aorta, com um risco de dissecção nove vezes superior à população geral. ^[140] Contudo, a ocorrência de dissecção permanece aumentada mesmo após a cirurgia de substituição valvular. Esta evidência conduziu à hipótese de que a presença de uma válvula aórtica bicúspide pode reflectir um distúrbio sistémico do tecido conjuntivo subjacente. ^[139]

Condições Clínicas

Doentes com insuficiência renal crónica e em diálise, constituem uma população com alto risco de eventos cardiovasculares e calcificação valvular. Num grupo de doentes em diálise peritoneal, a presença simultânea de calcificação valvular e vascular (arterial) está associada com um aumento no risco de mortalidade cardiovascular de 73% em comparação com a ausência de calcificação. ^[141]

Factores de Risco Cardiovascular

Alguns estudos referem que os factores de risco para o desenvolvimento da doença valvular aórtica calcificada são semelhantes àqueles descritos para a aterosclerose vascular, nomeadamente, idade avançada, sexo masculino, estatura, níveis séricos elevados de colesterol LDL e Lp(a), diabetes, tabagismo e hipertensão. ^[2,16,142,143]

O estudo prospectivo KORA/MONICA ^[7] seguiu 953 indivíduos com idades entre 25-74 anos) durante 10 anos. Ao comparar aqueles com alterações estruturais na válvula com os que não tinham essas alterações, verificou-se uma maior prevalência de hipertensão arterial, obesidade, diabetes, hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares. A idade foi significativamente relacionada com a doença valvular (OR 2.0, IC 95% [1.7-2.3], risco adicional por década, $p < 0.001$). Este estudo revelou, ainda, que os níveis de colesterol (colesterol total, LDL e razão LDL/HDL) (OR 1.2 [1.1-1.3] para o aumento de 20 mg/dl, $P < 0.001$) e o tabagismo estão significativamente relacionados com a doença valvular aórtica degenerativa.

Estudos prévios mostraram, ainda, que a presença da doença valvular aórtica calcificada está associada à diabetes e síndrome metabólica. ^[16,144] Para além disso, o número de componentes do síndrome metabólico correlaciona-se com a prevalência da calcificação aórtica. ^[143]

A obesidade parece ser um preditor independente de estenose (BB42) e calcificação da válvula aórtica (BB30, BB31, BB32). ^[114,143,145,146]

Dados recentes do estudo MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis), indicaram que a razão entre o colesterol total/HDL está associada a um aumento do risco de doença valvular aórtica calcificada nos doentes entre os 45-84 anos de idade, enquanto que o LDL está associado a um aumento do risco apenas nos doentes com idade inferior a 65 anos. ^[144]

A dislipidemia é um importante factor de risco para a doença valvular aórtica. *In vitro*, o colesterol oxidado estimula a calcificação da válvula aórtica. ^[147] E em modelos animais, a hipercolesterolemia experimental induz a calcificação, esclerose e EA. ^[148] Em humanos, a

calcificação da válvula aórtica parece ocorrer preferencialmente em locais de acumulação lipídica. ^[124] Para além disso, o colesterol LDL é oxidado na válvula aórtica e, este, por sua vez poderá estimular também a calcificação. ^[149] Estudos epidemiológicos demonstraram que os níveis séricos aumentados de colesterol total e LDL (LDL-C) aumentam o risco de EsA, calcificação e EA. ^[16,143,145,146,150,151,152]

O sexo masculino parece estar também mais frequentemente associado com a EsA, calcificação e EA. ^[16,114,153,145,146]

Inflamação

Alguns estudos sugerem que a doença valvular aórtica calcificada pode estar associada ao processo de inflamação sistémica, devido à documentação de níveis aumentados de marcadores de inflamação como a homocisteína, proteína C reactiva e a disfunção endotelial. ^[102,154,155,156,157]

Contudo, dados mais recentes são contraditórios relativamente a esta associação entre os marcadores de inflamação e a doença valvular aórtica calcificada. Num ensaio clínico, de 381 doentes, vários marcadores de inflamação, incluindo hemograma e fibrinogénio, não foram associados à esclerose aórtica. ^[114] Assim, apesar dos dados histológicos demonstrarem uma lesão endotelial com alterações inflamatórias locais, *remodelling* dos folhetos e ainda, a evidência dos riscos adversos associados à esclerose aórtica, a confirmação da existência de uma ligação com um estado inflamatório sistémico ainda não foi provado.

3.2 Patofisiologia

Nos doentes com EA, a obstrução ao fluxo de saída do VE instala-se progressivamente ao longo de anos. ^[1]

O débito cardíaco (DC) é mantido devido à hipertrofia do VE, que pode conter um gradiente de pressão transvalvular significativo durante muitos anos, sem evidências de dilatação do VE ou desenvolvimento de sintomas.

À medida que a obstrução valvular progride, a sobrecarga crónica de pressão resulta, tipicamente, na hipertrofia concêntrica do VE, com aumento da espessura da parede e cavidade ventricular de dimensão preservada. O aumento na espessura da parede do VE permite a normalização do stress na parede (pós-carga) e, deste modo, a função contráctil é mantida com preservação da função ventricular esquerda e do débito cardíaco. ^[158]

Há diferenças na resposta do VE a este aumento de pressão. A existência de um grau de hipertrofia excessivo ou inapropriado é particularmente comum nos doentes idosos, especialmente nas mulheres. ^[159]

No estudo KORA/MONICA, ^[7] a doença valvular aórtica degenerativa foi um factor preditor de hipertrofia ventricular concêntrica, independentemente da idade, presença de hipertensão e peso corporal (OR 1.6, P=0.046). Foi também demonstrado que mesmo a doença valvular ligeira está associada a diminuição da área valvular e consecutivo aumento no gradiente de pressão transvalvular.

Se estes achados forem confirmados em estudos futuros, as alterações na geometria do ventrículo esquerdo parecem acompanhar a doença valvular aórtica calcificada, e não reflectem simplesmente, a resposta ventricular à elevação crónica da pós-carga. ^[160]

A massa muscular hipertrofiada do VE, o aumento da pressão sistólica e o prolongamento da ejeção, elevam o consumo de oxigénio pelo miocárdio. O aumento da pressão na parede do VE e o encurtamento da diástole, comprometem o fluxo coronário, conduzindo a um desequilíbrio entre o fornecimento e as necessidades de oxigénio. ^[161] A perfusão do miocárdio está também comprometida pela diminuição relativa na densidade do número de capilares em relação ao aumento da massa muscular. Esta sub-perfusão pode ser responsável pelo desenvolvimento de isquemia do subendocárdio, especialmente quando as demandas de oxigénio estão aumentadas ou o período diastólico é reduzido (por taquicardia, anemia, infecção gravidez, entre outros). ^[162]

Com o aumento da massa de células miocárdicas e fibrose intersticial surge a disfunção diastólica. ^[163] Apesar da hipertrofia ventricular constituir o mecanismo adaptativo principal ao aumento da pressão imposto pela EA, constitui também uma consequência patofisiológica adversa devido à diminuição da *compliance* diastólica. ^[160] Deste modo, ocorre um aumento na pressão de enchimento do VE. A disfunção diastólica poderá ser revertida com a regressão da hipertrofia após o alívio cirúrgico da estenose. ^[163]

A diástole é dividida no relaxamento activo e enchimento passivo. Durante o relaxamento activo, o cálcio é bombeado para o retículo sarcoplasmático, provocando uma diminuição da interacção contráctil entre a actina e a miosina. Na hipertrofia concêntrica, este processo é impedido, prejudicando a fase de enchimento passivo. ^[164] Para além disso, com o aumento na espessura do ventrículo, é necessário uma pressão de distensão maior para alcançar o mesmo volume diastólico. ^[158] Este aumento da pressão diastólica resulta em congestão pulmonar e dispneia. Este e outros sintomas de insuficiência cardíaca (IC) prevêm uma evolução mais grave dos doentes com EA.

A contracção auricular tem um papel importante para o enchimento do VE na EA, ao aumentar a pressão diastólica final, sem causar elevação concomitante da pressão média da aurícula esquerda. Isto previne o aumento das pressões venosas pulmonares e desse modo, a congestão. Ao mesmo tempo, mantém a pressão diastólica final a um nível necessário para que ocorra uma contracção eficaz do VE hipertrofiado. A perda da contracção auricular, como ocorre na fibrilhação auricular ou na dissociação aurículo-ventricular, poderá resultar numa rápida deterioração clínica dos doentes com EA severa. ^[159]

A resistência vascular sistémica contribui também para a pós-carga total do VE nos doentes com EA. A hipertensão concomitante aumenta a carga total do ventrículo e pode alterar a avaliação da severidade da EA. ^[165]

A hipertensão pulmonar ligeira está presente em cerca de 1/3 dos adultos com EA devido à elevação da pressão diastólica final. A hipertensão pulmonar mais severa ocorre em 15% dos doentes com EA.

A resistência à prática de exercício está alterada nos adultos com EA moderada a severa e, mesmo os doentes assintomáticos apresentam intolerância ao esforço. Esta condição deve-se à resposta inadequada do débito cardíaco ao esforço.

3.3 Evolução da Doença

3.3.1 Fases da Doença

A história natural da EA foi inicialmente vista como um processo de calcificação valvular que seria uma consequência inevitável do envelhecimento e que só teria significado clínico após o início dos sintomas. ^[166] Hoje em dia, a doença valvular aórtica calcificada é o resultado de um processo activo, potencialmente modificável, com um espectro de doença que vai desde a esclerose aórtica à estenose aórtica severa e sintomática.

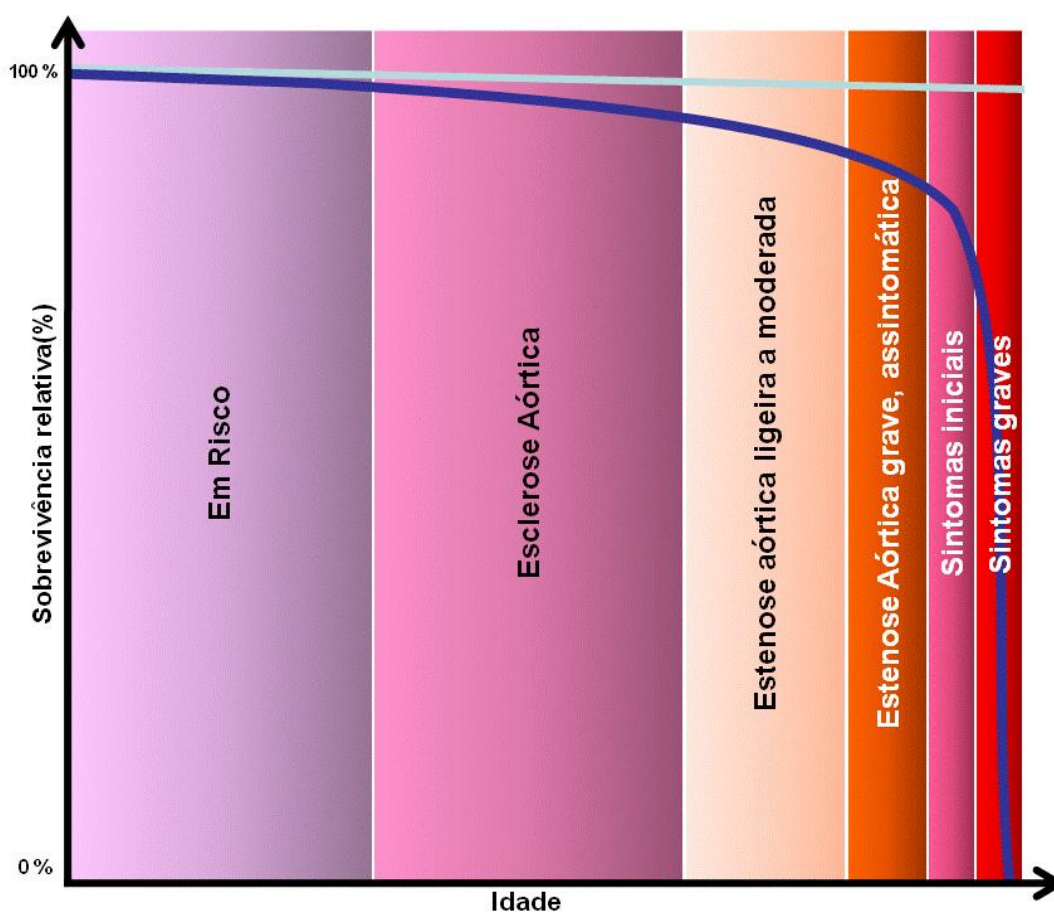


Figura III – Conceito actual da história natural da doença valvular aórtica calcificada; ilustra o espectro da doença desde doentes “em risco” até aos doentes com estenose aórtica severa e sintomática avançada. Desde a detecção da esclerose aórtica, existe um aumento do risco de eventos cardiovasculares, como ilustrado pelo desvio da curva de sobrevivência (linha vermelha) em relação à sobrevivência esperada para a idade (linha azul). No início dos sintomas, mesmo que ligeiros, a sobrevivência desvia-se ainda mais do esperado, com um declínio dramático na sobrevivência na estenose aórtica sintomática severa. A cirurgia de substituição valvular após o início dos primeiros sintomas previne os eventos adversos tardios.

A EsA é definida como o espessamento focal com aumento da ecogenicidade da superfície aórtica com velocidades anterógradas <2.5 m/s. ^[13,14]

A EA severa é geralmente caracterizada por (1) velocidade do fluxo >4 m/seg, (2) gradiente de pressão sistólica transvalvular que excede os 40 mm Hg na presença de um DC normal, ou (3) uma área valvular aórtica (AVA) (calculada por equação de continuidade) inferior a 1.0 cm^2 num adulto com estatura média (isto é, $<0.6 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ de área de superfície corporal - $\leq \frac{1}{4}$ da área aórtica normal de 3.0 a 4.0 cm^2). Uma AVA de 1.0 a 1.5 cm^2 é considerada estenose moderada, no entanto se estiver entre 1.5 a 2.0 cm^2 é designada de estenose apenas ligeira (Tabela II). ^[13,14]

Tabela II – Classificação do Grau da Estenose Aórtica

	Esclerose aórtica	Ligeira	Moderada	Severa
Velocidade máxima do fluxo (m/s)	≤ 2.5	2.6-2.9	3.0-4.0	>4.0
Gradiente transvalvular médio (mm Hg)	...	$<20^b$ (30^a)	20-40 ^b (30 -50 ^a)	$>40^b$ ($>50^a$)
Área valvular aórtica (cm^2)	...	>1.5	1.0-1.5	<1.0
Área valvular aórtica indexada (cm^2/m^2)		>0.85	0.60-0.85	<0.6
Razão da velocidade		>0.50	0.25-0.50	<0.25

As diferenças prévias nos valores da AVA foram eliminadas mas existe ainda incertezas acerca do gradiente médio, na Europa os 50 mmHg e nos EUA é considerado os 40 mmHg.

Esta classificação apenas fornece uma base de referência, uma vez que, cada uma destas medições é uma variável contínua. Para além disso, o início dos sintomas não ocorre a partir de um determinado valor numérico, os doentes podem ter parâmetros que não correspondem todos à mesma categoria e não tem em conta a possibilidade de insuficiência aórtica co-existente ou disfunção do VE. Ainda, todos estes parâmetros variam com as alterações fisiológicas, como os estados de alto e baixo débitos cardíacos e alterações na pressão sanguínea ou frequência cardíaca.

3.3.2 Gravidade da doença

Esclerose aórtica

Vários estudos clínicos e experimentais demonstraram que a EsA representa um fenómeno activo relacionado de forma significativa com os factores de risco para a aterosclerose, morbilidade e mortalidade cardiovascular. ^[167] A associação entre a EsA e os eventos cardiovasculares adversos persiste mesmo após o ajuste para a idade, sexo, doença cardiovascular conhecida e factores de risco cardiovasculares.

No estudo de hipertensão LIFE, a presença de EsA foi associada a uma duplicação dos eventos cardiovasculares, naqueles com e sem doença arterial coronária. ^[168] No estudo ARIC, que englobou 2279 adultos afro-americanos, o preditor mais importante de enfarte do miocárdio e morte cardiovascular foi a EsA, outros menos importantes foram a pressão arterial, tabagismo e marcadores de inflamação sistémica. ^[169]

No estudo Cardiovascular Health Study, ^[16] a taxa de eventos cardiovasculares, nomeadamente o risco relativo para morte cardiovascular, enfarte agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva, é significativamente maior nos indivíduos com EsA (66%, 46% e 33%, respectivamente). Este excesso de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, não pode ser exclusivamente atribuído à progressão para EA severa, uma vez que existiam poucos casos de doença valvular significativa. O mecanismo exacto a partir do qual a EsA causa estes eventos adversos não é completamente compreendido. A lesão valvular, provavelmente não é a causa primária, uma vez que a hemodinâmica valvular está normal ou aproximadamente normal e para além disso, o tempo que decorre entre a EsA e os eventos é curto relativamente ao esperado, tendo em conta a taxa de progressão hemodinâmica. Ainda, a embolização de placas ou trombos valvulares para as artérias coronárias também é pouco provável, uma vez que não existem estudos a sugerir que as lesões valvulares na EsA sejam instáveis ou associadas à formação de trombos. Possíveis explicações para o aumento do risco cardiovascular associado à esclerose aórtica incluem a disfunção endotelial, polimorfismos genéticos ou outro factor indeterminado.

Vários estudos avaliaram a evolução de doentes com EsA para EA.

Faggiano et al, ^[170] seguiram 400 indivíduos com mais de 50 anos com espessamento/calcificação e velocidade transvalvular máxima ≤ 2 m/s (esclerose valvular sem estenose). Os doentes que foram seguidos por mais de 5 anos (total de 100), a estenose ligeira ocorreu em 44%, a moderada em 14% e a severa em 8%.

Num estudo de mais de 2000 doentes com esclerose aórtica, a ocorrência de EA após um período de 8 anos foi de 16%, dos quais 10.5% desenvolveram EA ligeira (velocidade do jacto 2 a 3 m/s), moderada em 3% (velocidade do jacto 3 a 4 m/s) e severa em 2.5% (velocidade do jacto >4 m/s). ^[171]

Deste modo, apesar da esclerose aórtica ser prevalente nos indivíduos com idade avançada, apenas uma pequena percentagem (<10%) evoluirá para uma EA significativa em cerca de 7 anos.

Estenose aórtica assintomática

O prognóstico clínico dos doentes com EA severa assintomática é difícil de determinar. Sabe-se que se trata de uma doença progressiva e os doentes com EA severa têm uma probabilidade de desenvolver sintomas após um curso da doença de 3 a 5 anos. ^[172]

Em alguns estudos, cerca de 30% dos doentes assintomáticos desenvolve sintomas (angina, insuficiência cardíaca, síncope) dentro de 2 anos após o diagnóstico. ^[173,174]

Estudos retrospectivos descrevem alguns casos de morte cardíaca súbita em adultos aparentemente assintomáticos com EA severa. Contudo, estudos prospectivos mais recentes sugerem que a morte cardíaca súbita em doentes assintomáticos é muito pouco comum, com um risco estimado inferior a 1% ao ano. ^[14,172]

Estenose aórtica sintomática

A EA severa permanece assintomática durante muitos anos e o risco de morte é inferior a 1% por ano. Com a progressão da estenose, surgem os sintomas, tipicamente durante o esforço, nomeadamente, a angina (35% dos doentes), síncope (15% dos doentes) ou dispneia e/ou insuficiência cardíaca (50% dos doentes). ^[159]

Após o desenvolvimento dos sintomas, a mortalidade aumenta abruptamente e a sobrevivência mediana é de 4.5 anos nos doentes com angina, 2.6 anos naqueles com síncope e 1 ano para os que apresentam insuficiência cardíaca. ^[175] A sobrevivência está particularmente diminuída, sendo 20% aos 3 anos, na presença de sintomas de classe III ou IV da NYHA e redução da função do ventrículo esquerdo. No entanto a mortalidade não é linear e é cerca de 10% nos primeiros 6 meses após o início dos sintomas. ^[176]

Nos doentes com EA severa e sintomática, o prognóstico é pior naqueles com disfunção do VE e com redução do débito cardíaco e gradiente transvalvular. O risco de morte súbita é elevada nos doentes com EA severa e sintomática, logo estes doentes devem ser desde logo referenciados para a intervenção cirúrgica. Os doentes que não são submetidos a

uma intervenção cirúrgica atempada, são comuns hospitalizações frequentes por angina e descompensação da insuficiência cardíaca. ^[175]

Dada a variabilidade associada à severidade hemodinâmica no momento do início dos sintomas e uma vez que muitos doentes falham no reconhecimento da sua sintomatologia devido à progressão insidiosa da doença, têm sido avaliadas medidas que possam indicar o grau de comprometimento hemodinâmico, como os níveis de péptido natriurético tipo B (PNB), a prova de esforço, ecocardiograma de stress farmacológico e a impedância valvulo-arterial.

A EA severa causa um aumento no stress da parede do ventrículo que, ao longo do tempo, conduz à hipertrofia e fibrose. Os níveis de PNB tendem a aumentar proporcionalmente ao stress da parede ventricular. Apesar dos doentes com aumento da pressão diastólica se poderem manifestar através de sinais e sintomas compatíveis com insuficiência cardíaca, uma proporção destes doentes pode ser assintomática, embora apresentem um perfil hemodinâmico idêntico. A elevação do PNB pode ser útil na identificação de patologia ventricular mais subtil nos doentes assintomáticos. ^[177,178]

O valor prognóstico do PNB também foi demonstrado em doentes com EA de baixo fluxo e baixo gradiente. ^[179] Os níveis de PNB são mais altos nos doentes com EA verdadeira em comparação com aqueles com pseudo-estenose.

Doentes com níveis reduzidos (<550 pg/mL) têm melhor prognóstico do que aqueles com PNB elevado. No entanto, ainda não estão disponíveis níveis de cut-off suficientemente capazes de serem implementados na prática clínica. ^[158] Para além disso, a presença de doença renal, hipertensão pulmonar e obesidade interferem com o valor preditivo do PNB.

Não existe ainda um consenso acerca do valor prognóstico da prova de esforço nos doentes com EA. A prova de esforço pode identificar os doentes com capacidade limitada ao esforço e revelar sintomas naqueles que são aparentemente assintomáticos.

Uma meta-análise recente avaliou o valor prognóstico da prova de esforço relativamente ao aparecimento de eventos adversos, como angina, dispneia, IC aguda, morte súbita, ou seja, sintomas que requerem cirurgia, na qual foram incluídos dados de 7 estudos (491 doentes com EA severa assintomática). ^[180] Nenhum dos doentes manifestou qualquer complicação durante ou após o teste. Não se verificaram mortes súbitas naqueles com teste normal, após 1 ano de follow-up, enquanto que os doentes com prova alterada, 5% apresentaram morte cardíaca súbita. Um total de 52 de 253 doentes (21%) com teste normal, manifestaram eventos cardíacos adversos, em comparação com os 156 de 238 (66%) com teste anormal (odds ratio 0.12, IC 95% 0.07-0.21, p<0.001). Estes resultados sugerem que a prova de esforço é segura

em doentes assintomáticos com EA severa e que um teste normal indica um menor risco de eventos cardíacos adversos em comparação com o alterado. Em nenhum doente com prova de esforço normal ocorreu morte cardíaca súbita.

Durante o teste de um doente assintomático com EA severa, a ocorrência de sintomas, a diminuição da tolerância ao exercício ou uma resposta da pressão arterial ineficaz (aumento <20 mmHg), devem colocar em consideração a cirurgia.^[13] Por outro lado, se o mesmo ocorrer num doente com EA ligeira, outras causas devem ser avaliadas, nomeadamente a isquemia do miocárdio decorrente de doença arterial coronária.

Piérard e Iancellotti,^[181] sugerem, ainda, que o aparecimento de sintomas durante o exercício é mais preditivo de eventos cardíacos do que as alterações na pressão arterial ou no segmento ST.

O ecocardiograma de stress farmacológico com dobutamina, também tem sido proposto para a estratificação do risco na EA severa assintomática.^[182] Apesar de ter sido verificado que o aumento no gradiente de pressão transvalvular esteja relacionado com o prognóstico e forneça informações que vão além da prova de esforço usual, são necessários mais dados de forma a validar estes achados e recomendar o seu uso na prática clínica.

A impedância valvulo-arterial (Zva) e o seu respectivo aumento, tem sido estudado como marcador do excesso da carga hemodinâmica global sob o ventrículo esquerdo e parece auxiliar na identificação dos doentes com pior prognóstico. Sugere-se que para além dos índices padrão para avaliar a severidade da estenose, geometria e função do ventrículo, o Zva possa ser útil para melhorar a estratificação do risco e a decisão clínica em doentes com EA severa.^[183]

A pressão de encravamento da artéria pulmonar, a razão entre a velocidade do fluxo diastólico através da válvula mitral e a sua região anular (E/e') (avaliada através do ecocardiograma com doppler podendo detectar o aumento da pressão de enchimento do VE em repouso) e, por último, o volume da AE em repouso parecem estar fortemente relacionados com a capacidade ao exercício e fornecem uma informação adicional à AVA na avaliação do estado sintomático de doentes com EA severa. Estes parâmetros podem fornecer informações importantes acerca do prognóstico, uma vez que, também reflectem as consequências hemodinâmicas da EA.^[184]

3.3.3 Progressão e Factores de Risco

Evolução

A taxa de progressão hemodinâmica foi estimada numa variedade de estudos invasivos e não invasivos, estando descrito um aumento anual de 0.3 m/seg na velocidade máxima do jacto, de 7 mmHg no gradiente de pressão e uma redução na área valvular de 0.1 cm²/ano. [45,185] Contudo, existe uma marcada variabilidade individual entre os doentes com doença valvular aórtica estabelecida.

Não é possível prever com exactidão a taxa de progressão num determinado doente. Sendo assim, é importante realizar um seguimento clínico regular naqueles com EA ligeira a moderada assintomática, o qual deve incluir a pesquisa dos factores relacionados com a progressão da doença.

Preditores de Progressão

As directrizes da Sociedade Europeia de Cardiologia identificam como factores de progressão a calcificação valvular moderada a severa e o aumento da velocidade de pico de 0.3m/s/ano, em comparação com as da Associação Americana de Cardiologia, que inclui a idade, calcificação valvular severa e doença coronária. [13,14]

Hemodinâmicos

O preditor mais importante da progressão para os sintomas foi a velocidade do fluxo aórtico. A sobrevivência livre de sintomas é de 84% aos 2 anos quando a velocidade do fluxo é inferior a 3 m/seg em comparação com os 21% naqueles com uma velocidade superior a 4 m/seg. [173]

Num estudo recente que envolveu 117 doentes com EA muito severa (velocidade máxima 5.37±0.35 m/s; área valvular 0.63±0.12 cm²) e assintomática seguidos durante uma média de 41 meses, verificou-se que a sobrevivência livre de eventos foi de 64%, 36%, 25%, 12% e 3% aos 1, 2, 3, 4 e 6 anos, respectivamente. [186] Doentes com uma velocidade máxima ≥ 5.5 m/s apresentam uma grande probabilidade (52%) de iniciarem sintomatologia severa. A velocidade máxima foi o único parâmetro que se associou de forma independente com o prognóstico. E para além disso documentaram que os doentes com EA muito severa têm um pior prognóstico com alta taxa de eventos e risco de rápida deterioração funcional.

Grau de Calcificação

Em adultos com EA severa (velocidade >4 m/seg) a sobrevivência livre de eventos aos 5 anos é de 75±9% naqueles com calcificação ligeira em comparação com 20±5% nos que apresentam calcificação moderada a severa. ^[11]

O papel da calcificação já foi estudado utilizando uma variedade de modalidades de imagem, incluindo ecocardiograma e tomografia computadorizada. O grau de calcificação da válvula aórtica poderá ser avaliado por ecocardiograma, segundo a seguinte classificação: (grau 1) sem calcificação, (grau 2) calcificação ligeira com a presença de spots isolados, (grau 3) calcificação moderada com a presença spots múltiplos e grandes, (grau 4) calcificação severa com espessamento e atingimento de todas as cúspides. ^[45]

Num pequeno estudo foi comparado o papel do score de calcificação através de tomografia computadorizada com os parâmetros ecocardiográficos, péptido natriurético tipo B e proteína C reactiva. Encontrando-se uma forte associação do score de calcificação com o desenvolvimento dos sintomas e prognóstico. ^[187]

A calcificação da válvula aórtica correlaciona-se com o grau de EA e consiste num preditor independente da progressão da doença e do desenvolvimento de sintomas que implicam cirurgia. Para além disso, em doentes com EA ligeira, moderada ou severa, o grau de calcificação constitui um factor de risco independente de morbilidade e mortalidade vascular. ^[45,188,189,190]

Num estudo recente, não foi verificada essa forte associação, o que poderá ser explicado pela dificuldade em quantificar este parâmetro de forma reprodutível e pelo facto de a calcificação reflectir uma anormalidade anatómica que pode ser discordante do impacto hemodinâmico que tem na obstrução da válvula. ^[191]

Clínicos

Foi documentado que os doentes com idade superior a 80 anos e EA ligeira a moderada apresentam uma taxa de progressão duas vezes superior aos doentes com menos 20 anos de idade. ^[45,192] Apesar de se tratar de um pequeno estudo, é provável que a progressão da EA a partir da década de 80 seja diferente em relação à dos doentes mais jovens.

Alguns estudos demonstram que os doentes do sexo masculino com EA estabelecida têm um maior risco de progressão da doença e de mortalidade pós-cirúrgica. ^[193,194,195] No entanto, a maioria não o identifica como um factor preditivo de progressão para EA. ^[142,196,197,198]

A maioria dos estudos demonstraram, ainda, que o tabagismo está associado com um aumento do risco na progressão da estenose aórtica, mas um outro estudo não verificou a mesma associação. ^[142,193,197,198,199]

Vários estudos verificaram uma associação significativa entre a hipercolesterolemia, diabetes mellitus e a progressão da EA. ^[16,142,193,195,200] No entanto, outros não comprovaram o papel relativo à hipertensão e à diabetes mellitus na progressão da EA. ^[142,196,197,198]

No estudo prospectivo KORA/MONICA, ^[7] a hipertensão e a obesidade não têm uma relação a longo prazo com as alterações na estrutura valvular. Foi ainda verificado que apenas os indivíduos com altos valores de colesterol total no início do estudo (>268 mg/dl) apresentaram um risco significativo de progressão da doença (OR 2.6 [1.5-4.4], P=0.001 vs aqueles com níveis inferiores ($\leq$ 197 mg/dl)). O número de doentes com diabetes foi pequeno e portanto os resultados foram inconclusivos.

A presença do síndrome metabólico foi também um factor de risco de aceleração da progressão da EA e consiste também num preditor de mortalidade cirúrgica. ^[195]

A dislipidemia parece estar envolvida na progressão da EA. Alguns estudos sugerem que os níveis séricos aumentados de colesterol total e LDL, e os níveis reduzidos de colesterol HDL estão associados a um risco aumentado de progressão. ^[193,198] Em doentes com calcificação da válvula aórtica, os níveis séricos elevados do colesterol LDL, constituíram um factor de risco para a acumulação adicional de cálcio na estrutura valvular. ^[151] As partículas LDL de baixa densidade parecem ser especialmente aterogénicas e estão associadas a um aumento no risco de progressão da EA. ^[127] Contudo, um número considerável de estudos, não confirma uma associação entre a dislipidemia e a progressão da EA. ^[142,196,197,201]

Pohle et al documentaram que os indivíduos com hipercolesterolemia (LDL > 130 mg/dl) têm uma maior progressão da calcificação valvular ao longo do tempo com um aumento anual médio do cálcio de 43% versus um aumento de 9% nos controlos (p<0.001). ^[202] Para além do LDL, todo o perfil lipídico parece desempenhar um papel importante na doença valvular aórtica, como os níveis elevados de colesterol total, baixos de HDL e aumento da razão colesterol total/HDL estão também independentemente associados com as altas taxas de progressão. ^[199]

Em suma, a maior parte destes estudos são baseados em análises retrospectivas e os seus resultados não são concordantes. No entanto, preditores clínicos mais bem estabelecidos são a idade avançada (>80 anos), hipertensão, tabagismo, dislipidemia e, ainda, os doentes com doença arterial coronária concomitante. ^[203]

4. Terapêuticas médicas

As pesquisas actuais acerca da patogénese da doença valvular calcificada sugerem múltiplos alvos potenciais que podem interromper o processo da doença (tabela III). ^[204] Uma terapêutica eficaz deve prevenir a progressão da doença e manter o crescimento e reparação do tecido normal intactos.

Tabela III – Mecanismos de acção dos principais tratamentos médicos propostos para a alteração da progressão da doença valvular aórtica calcificada.

Agente	Mecanismos
Estatinas	↓ LDL ↓ Inflamação ↓ TGF-Beta ↓ TNF-Alfa ↓ MMP ↓ PMO-2 ↓ Prenilação de proteínas
Intervenções nas HDL/Apo A1	↑ HDL ↓ LDL ↓ Inflamação ↓ NF-kB ↓ MCP-1
Inibição do sistema renina angiotensina	↓ Inflamação ↓ Stress oxidativo ↓ Proteoglicanos ↑ Fibrinólise
Bifosfonatos	↓ Inflamação ↓ IL-1 ↓ IL-6 ↓ TNF-alfa ↓ MMP ↓ Prenilação das proteínas ↓ Reabsorção óssea ↓ Cálcio/PO4 ↓ LDL ↑ HDL
Fármacos antiproliferativos ^a	↓ Proliferação células musculares lisas/miofibroblastos

^a Rapamicina, paclitaxel

Apo apolipoproteína, PMO-2 proteína morfogenética óssea 2, HDL lipoproteína de elevada densidade, IL interleucina, LDL lipoproteína de baixa densidade, MCP-1 proteína quimioatractora de monócitos 1, MMP metaloproteinase da matriz, NF-kB factor nuclear kB, TGF-beta factor transformador do crescimento beta, TNF-alfa factor de necrose tumoral alfa.

A maioria das terapêuticas sugeridas foram simplesmente extrapoladas a partir daquelas que já se encontram instituídas para doença aterosclerótica.

Os dois tratamentos mais estudados através de ensaios clínicos ou experimentais são, os inibidores da hidroximetilglutaril (HMG)-CoA redutase (estatinas) e os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA). O esclarecimento acerca da eficácia destas terapêuticas poderá elucidar acerca do papel da hipercolesterolemia e da hipertensão e da própria angiotensina como factores importantes na progressão da doença.

4.1 Estatinas

Até hoje foram realizados vários estudos retrospectivos e prospectivos com o objectivo de avaliar o papel das estatinas na redução da progressão da doença, no entanto com resultados contraditórios (tabela IV e V).

Nos estudos retrospectivos, as estatinas foram, na maior parte dos casos, prescritas pelos médicos assistentes tendo em conta as indicações convencionais. Apesar de todos os estudos revelarem uma diminuição consistente na progressão da doença naqueles doentes que eram tratados com estatinas, não se verificou a mesma consistência dos resultados relativamente à associação com os níveis de colesterol, dos quais alguns mostraram essa correlação ^[199,202,205] enquanto que outros não. ^[196,197,206,207] Esta inconsistência sugere a possibilidade de que as estatinas desempenham outros benefícios para além da redução no colesterol. Esses efeitos podem incluir a melhoria na disfunção endotelial, acções anti-trombóticas, estabilização das placas, efeitos anti-oxidantes, redução do processo inflamatórios e ainda outros não identificados. ^[208]

No estudo RAAVE, 121 doentes com EA moderada a severa foram tratados com ou sem rosuvastatina de acordo com as guidelines do National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III. ^[203] Nos doentes com aumento dos níveis de colesterol LDL, as estatinas reduziram a progressão dos parâmetros ecocardiográficos da EA em comparação com os doentes com níveis normais que não receberam rosuvastatina. Em contraste com estes resultados, dois estudos randomizados falharam em demonstrar o benefício clínico em doentes com EA e tratados com estatinas.

O estudo SALTIRE efectuou a alocação de 155 doentes com EA calcificada em dois grupos: atorvastina (80 mg/dia) ou placebo. Não foi visto nenhum benefício na progressão ecocardiográfica da EA ou na calcificação da válvula aórtica na TC. ^[230]

Estudo (ano)	Número total de doentes (% a tomar estatinas)	Média de follow-up	Método de avaliação	Resultados	P
Aronow et al (2001) [193]	180 (34%)	>2 anos	Ecocardiograma	Uso de estatinas: predictor da diminuição no gradiente transvalvular através de um modelo de multivariância	0.001
Novaro et al (2001) [223]	174 (33%)	21 meses	Ecocardiograma	Sem estatinas: AVA diminui 0.11 ± 0.18 cm ² /ano; Com estatinas: AVA diminui 0.06 ± 0.16 cm ² /ano	0.03
Pohle et al (2001) [202]	104 (52%)	15 meses	TC	Sem estatinas: média da alteração na CVA 28%/ano; Com estatinas: média da alteração na CVA 21.5%/ano	NS
Belamy et al (2002) [197]	156 (24%)	3.7±2.3 anos	Ecocardiograma	Sem estatinas: AVA diminui $7 \pm 13\%$ /ano; Com estatinas: AVA diminui $3 \pm 10\%$ /ano	0.04
Shavelle et al (2002) [207]	65 (43%)	2.5±1.6 anos	TC	Sem estatinas: média da alteração na CVA 32%/ano; Com estatinas: média da alteração na CVA 12.1%/ano	0.006
Rosenhek et al (2004) [196]	211 (39%)	2.0±1.5 anos	ecocardiograma	Sem estatinas: velocidade do jacto aumentou 0.39 ± 0.42 m/s por ano; Com estatinas: velocidade do jacto aumentou 0.10 ± 0.41 m/s por ano	<0.0001

Tabela IV – Tratamento com estatinas na estenose aórtica: estudos retrospectivos

O estudo mais recente SEAS randomizou 1873 doentes com EA ligeira a moderada com 40 mg de simvastatina mais 10 mg de ezetimibe ou placebo. ^[210] Apesar das reduções significativas nos níveis de colesterol LDL, não se verificou nenhum benefício nos eventos relacionados com a doença valvular ou com a progressão da EA, apesar do tratamento com estatinas ter reduzido significativamente a incidência de eventos cardiovasculares isquémicos.

Contudo, mesmo após o SEAS, continuam a acumular-se achados relativamente à aplicação das estatinas na EA. Em modelos animais apolipoproteína E-/- alimentados com dieta rica em colesterol, a atorvastatina reduziu o número de macrófagos e a osteogénese. ^[211]

Miller et al demonstraram que, em modelos animais com níveis séricos de LDL baixos e doença valvular aórtica precoce, as estatinas reduzem a progressão da doença. ^[212] Outros estudos clínicos observacionais reforçaram a associação dos níveis aumentados de lípidos com a EA. ^[144, 213, 214]

Todos os estudos randomizados realizados até à data não incluíram a população de doentes nos quais as estatinas podem ser mais eficazes. Portanto, podem falhar em mostrar os potenciais benefícios das estatinas nas fases mais avançadas da doença.

As estatinas são uma classe de fármacos com efeitos potencialmente benéficos na redução da progressão da doença, no entanto, estes ainda não foram demonstrados. É também possível que o timing seja o factor mais crítico para uma eficácia óptima destes fármacos e os seus efeitos máximos são obtidos nos estadios mais precoces, nomeadamente, na fase de esclerose aórtica.

Os vários estudos realizados nesta área omitem os níveis de colesterol HDL nas suas análises. Um tratamento com alvo não só a redução do LDL mas também o aumento do HDL poderá ter um papel significativo na progressão da EA. ^[199] No entanto, isto precisa ser confirmado por estudos randomizados extensos.

Estudo	N	Tipo de estudo	Características dos doentes	Intervenção	End point	Conclusões
Cowell et al SALTIRE [201]	155	Ensaio clínico randomizado	EA calcificada com velocidade do jacto > 2.5 m/s	Atorvastatina (80 mg) vs placebo diariamente	Primário: alteração na velocidade do jacto no ecocardiograma e no score de calcificação na TC. Secundário: clínicos, regurgitação da válvula aórtica, morte de qualquer causa, hospitalização por qualquer causa e por causas cardiovasculares	Atorvastatina não reduziu significativamente a progressão da EA ou a taxa de end points clínicos major.
Moura et al RAAVE [209]	121	Estudo prospectivo sem ocultamento	EA assintomática moderada a severa	Rosuvastatina (20 mg) vs placebo de acordo com o LDL basal	Primário: progressão da EA e melhoria do colesterol LDL. Secundário: Melhoria dos marcadores inflamatórios	A rosuvastatina reduziu significativamente a progressão da EA e reduziu os níveis sericos de LDL. Os marcadores inflamatórios foram também reduzidos com a rosuvastatina.
Rossebo et al SEAS [210]	1873	Estudo clínico randomizado	EA assintomático ligeira a moderada	Simvastatina (40 mg) mais ezetimibe (10 mg) vs placebo diariamente	Primário: conjunto de eventos cardiovasculares major. Secundário: eventos relacionados com a EA e eventos CV isquémicos.	Simvastatina e ezetimibe não reduziram o conjunto de eventos relacionados com a EA mas reduziram os eventos cardiovasculares isquémicos. Não foi demonstrado nenhum efeito na progressão ecocardiográfica da EA.

Tabela V - Tratamento com estatinas na estenose aórtica: estudos prospectivos

4.2 Anti-hipertensores

Uma vez que a EA ocorre tipicamente em doentes idosos, a rigidez da vasculatura geralmente causa hipertensão sistémica e na presença de obstrução, a pós-carga do ventrículo aumenta para o dobro. Não existe ainda nenhuma recomendação específica relativa ao tratamento de doentes com EA e hipertensos, mas muitas vezes os diuréticos não oferecem um controlo suficiente e os beta-bloqueadores causam o perigo associado à redução do inotropismo num ventrículo já sobrecarregado. Sendo assim, os vasodilatadores geralmente utilizados são os inibidores da enzima conversora da angiotensina. Quando usados, estes fármacos devem ser iniciados em baixas doses e titulados lentamente. ^[160]

De forma semelhante às estatinas, os inibidores da enzima de conversão da angiotensina foram sugeridos como potenciais redutores da progressão da EA calcificada, no entanto esta suposição ainda não foi confirmada por estudos prospectivos.

Existem, ainda, poucos estudos acerca da avaliação do potencial benefício dos IECAS na prevenção da progressão da EA. Isto reflecte, em parte a preocupação teórica de que a combinação da vasodilatação arterial com uma obstrução valvular fixa possa resultar numa queda do débito cardíaco em adultos com EA. Contudo, a experiência clínica e pequenos estudos indicam que, de facto, os IECAS são bem tolerados nos doentes com EA. ^[196]

Num estudo retrospectivo, verificou-se que os IECAS estavam associados a taxas inferiores de calcificação valvular. ^[215] Contudo, num outro estudo retrospectivo, não foi encontrada diferença na progressão naqueles doentes tratados com IECAS. ^[196] Estudos prospectivos acerca do tratamento com IECAS para a prevenção da EA ainda não foram publicados. Assim como ocorreu com as estatinas, os resultados clínicos conflituosos com a inibição do SRA parecem ser secundários ao início tardio da terapêutica e também devido à curta duração do follow-up. ^[204]

Para além disso, os IECAS podem melhorar a evolução clínica dos doentes com EA independentemente dos efeitos no tecido valvular. Outros tecidos afectados incluem, o miocárdio ventricular, com melhorias na função endotelial ao atenuar o efeito do sistema renina-angiotensina-aldosterona e o simpático. Estes efeitos podem prevenir o *remodelling* ventricular, diminuir a hipertrofia miocárdio e consequentemente ocorrer melhorias na função diastólica. ^[13] Os efeitos dos IECAS na função endotelial e aterosclerose pode também diminuir o impacto da doença coronária concomitante.

Deste modo, estes fármacos têm a capacidade de melhorar o prognóstico dos doentes com EA através de mecanismos que não estão relacionados com a calcificação valvular.

4.3 Modulação do metabolismo ósseo

Os bifosfonatos são primariamente usados no tratamento da osteoporose para prevenir a reabsorção de osso mediada pelos osteoclastos ao se ligarem à hidroxiapatite. Os potentes bifosfonatos com nitrogénio inibem a sintase farnesil-pirofosfato, uma enzima da via da biossíntese do colesterol/mevalonato, distal à redutase 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), o local de acção da estatina.^[216]

Os bifosfonatos com nitrogénio partilham vários efeitos com as estatinas ao reduzirem os níveis séricos de LDL em aproximadamente 5%, aumentarem o colesterol HDL em 10% a 18% e reduzem a inflamação.^[216,217]

Assim, esta terapêutica pode fornecer uma nova e única forma de redução da calcificação da válvula aórtica, para além dos seus efeitos semelhantes às estatinas. Achados clínicos que suportam esta teoria estão a começar a emergir.

Uma análise do estudo MESA sugere que o uso dos bifosfonatos com nitrogénio está associado a um menor risco de calcificação da válvula aórtica em mulheres com idade avançada. Contudo, verificou-se um aumento deste risco nas mulheres com idade inferior a 65 anos.^[218]

Num outro estudo, o tratamento para a osteoporose, maioritariamente bifosfonatos, foi fortemente associado com a redução da progressão da EA.^[219]

São necessárias mais evidências para determinar se os potenciais benefícios na válvula aórtica estão relacionados com os mecanismos semelhantes às estatinas ou secundários aos efeitos no metabolismo ósseo. Nesta última situação, outros inibidores da reabsorção óssea como a calcitonina e os moduladores dos receptores de estrogénio poderão também ser úteis no tratamento da calcificação da válvula aórtica.

É também importante determinar se o aumento do risco de calcificação da válvula aórtica nos utilizadores mais jovens de bifosfonatos com nitrogénio na coorte MESA reflecte, aumento do risco cardiovascular associado com a osteoporose, efeito tóxico destes fármacos ou se, é um epifenómeno.

3.4 Fármacos anti-proliferativos

Os fármacos anti-proliferativos, como a rapamicina e o paclitaxel, revolucionaram o campo da cardiologia intervencionista como tratamento da reestenose após o stent coronário. Estes agentes actuam através da inibição da proliferação e migração das células de músculo liso vascular, passos críticos na reestenose coronária. ^[220,221]

Apesar de as válvulas cardíacas humanas não conterem células de músculo liso, os miofibroblastos valvulares partilham várias propriedades com as células musculares lisas vasculares. Por exemplo, ambos os tipos celulares se transdiferenciam em células tipo osteoblastos que conduzem à calcificação. Para além disso, os miofibroblastos expressam alfa-actina, vimentina e desmina assim como as células musculares lisas. Assim, poder-se-á pensar que estes dois tipos celulares reagem de forma semelhante aos agentes anti-proliferativos. ^[204]

Uma vez que a administração sistémica destes fármacos é muitas vezes complicada por numerosos efeitos adversos, um estudo recente avaliou o potencial da distribuição local do paclitaxel na válvula aórtica de modelos animais usando um balão de valvuloplastia e constatou que as concentrações do fármaco dentro da válvula alcançaram os níveis terapêuticos.

Estes resultados preliminares são intrigantes mas serão necessários mais estudos para avaliar e clarificar o uso dos agentes antiproliferativos na abordagem da doença valvular aórtica fibrocalcificada.

Conclusões

A relação entre a genética, biologia celular e factores de risco ambientais fornece a chave para a compreensão dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da doença valvular aórtica calcificada.

Não está, ainda, completamente esclarecido o papel dos factores genéticos no desenvolvimento e progressão da doença. Para tal, é necessário testar outros genes como os envolvidos na deposição subendotelial e retenção das lipoproteínas aterogénicas, inflamação crónica, sistema renina-angiotensina, *remodelling*, fibrose e neovascularização, assim como os envolvidos nas vias de sinalização celular específicas que regulam o óxido nítrico e a calcificação ectópica. É possível que os genes envolvidos na formação precoce da lesão sejam diferentes daqueles envolvidos

no processo de calcificação mais tardio. Basicamente, todo o trabalho genético na EA permanece, ainda, em estado embrionário.

Relativamente à patogénese, os principais mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da doença valvular aórtica calcificada são a acumulação lipídica, inflamação, diferenciação osteoblástica com remodelling da matriz extracelular, angiogénese e por último, a calcificação. A compreensão aprofundada destes mecanismos poderá demonstrar alvos moleculares específicos que, no futuro, podem conduzir ao aparecimento de terapêuticas inovadoras.

Apesar das semelhanças entre a doença aterosclerótica e a EA, as evidências recentes demonstram que estas constituem entidades fisiopatológicas diferentes. Ambas envolvem um processo multi-factorial, no entanto, a via final comum é distinta. A aterosclerose culmina no desenvolvimento da instabilidade da placa com trombose e oclusão vascular, enquanto que na EA, a evolução da doença conduz à calcificação severa da válvula com obstrução significativa do fluxo.

As principais condições associadas à instalação da doença valvular aórtica calcificada são a presença de válvulas aórticas bicúspides e os factores de risco ateroscleróticos. Os parâmetros associados ao estado inflamatório, como a hiperhomocisteinemia e a PCR, parecem estar também associados com o desenvolvimento desta patologia.

A história natural da doença valvular aórtica calcificada envolve várias fases. Em primeiro lugar surgem os doentes que apresentam condições clínicas ou anatómicas que aumentam o risco para o desenvolvimento da doença. Posteriormente, a instalação da calcificação valvular resulta no aparecimento da EsA, que apesar de não limitar o fluxo de saída do VE, está associada a implicações prognósticas importantes, ao aumentar a morbilidade e mortalidade cardiovascular. À medida que a obstrução ao fluxo se instala, ocorre a estenose valvular com diferentes graus de severidade e diminuição progressiva da sobrevivência dos doentes em relação à população geral, havendo uma queda abrupta aquando do aparecimento dos sintomas. A calcificação valvular progressiva e irreversível está na base deste processo evolutivo.

O impacto dos factores de risco cardiovasculares na progressão da EA calcificada ainda não está esclarecido uma vez que os estudos nesta área, revelam resultados contraditórios. No entanto, o clínico deverá estar à alerta para determinados factores que favorecem a progressão acelerada da doença, tais como, a calcificação

da válvula aórtica moderada a severa, taxa anual de velocidade máxima do fluxo >0.3 m/s, idade superior a 80 anos, hipertensão, tabagismo e dislipidemia.

O paradigma aterosclerótico falhou ao não identificar terapêuticas médicas eficazes na redução ou prevenção da progressão da doença. As estatinas e os inibidores da enzima conversora da angiotensina têm sido as opções terapêuticas mais investigadas, no entanto com resultados desapontadores. Estes fármacos são amplamente usados, apresentam efeitos benéficos estabelecidos e são geralmente bem tolerados.

Os resultados contraditórios dos ensaios clínicos podem ser, em parte, devido à inclusão de doentes com calcificação avançada ou, então, pelo facto de não incluírem todos os alvos moleculares identificados na patogénese da doença.

Assim, o tratamento com estatinas e inibidores da ECA poderá mostrar-se benéfico na redução da progressão da EA calcificada se forem administrados numa fase precoce da doença.

Deste modo, será importante identificar o tempo óptimo para a introdução da terapêutica médica no curso da doença. Os estudos histológicos sugerem que diferentes eventos ocorrem a nível tecidual à medida que a doença progride. As lesões precoces mostram um predomínio de infiltração lipídica e inflamação, enquanto que a doença mais avançada é caracterizada por calcificação extensa e formação de osso, não existindo dúvidas de que existe uma sequência de eventos associados com a progressão da doença. Assim, um tratamento que vá impedir a instalação de todo este processo subjacente à doença valvular calcificada, poderá mostrar-se mais eficaz. Devendo ser direccionado a adultos com esclerose aórtica, de forma a prevenir a progressão para estenose e eventos cardiovasculares adversos.

Chegou o momento de um novo paradigma para a doença valvular aórtica calcificada que deve ir além da aterosclerose e integrar os vários mecanismos que regulam a formação da lesão, nomeadamente, a transformação dos miofibroblastos e a progressão da calcificação, com o objectivo de descobrir terapêuticas médicas inovadoras que possam diminuir a evolução e a progressão da doença ao longo do tempo.

Referências

- 1 - Parolari A, Loardi C, Mussoni L et al. (2009) Nonrheumatic calcific aortic stenosis : an overview from basic science to pharmacological prevention. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 35:493-504.
- 2 - Rajamannan NM e Otto CM (2004) Targeted therapy to prevent progression of calcific aortic stenosis, *Circulation* 110:1180–1182.
- 3 - Iung B, Baron G, Butchart EG, et al. (2003) A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: the Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 24:1231–43.
- 4 - Butany J, Collins MJ, Demellawy DE, et al. (2005) Morphological and clinical findings in 247 surgically excised native aortic valves. *Can J Cardiol* 21:747–55.
- 5 - Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, et al. (2006) Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 368:1005–11.
- 6 - Freeman RV, Otto CM. (2005) Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 111:3316–3326.
- 7 - Stritzke J, Linsel-Nitschke P, Markus MRP, Mayer B, Lieb W, Luchner A, Döring A, Koenig W, Keil U, Hense H-W, Schunkert H for the MONICA/KORA Investigators. (2009) Association between degenerative aortic valve disease and long-term exposure to cardiovascular risk factors: results of the longitudinal population-based KORA/MONICA survey. *Eur Heart J* 30:2044-2053.
- 8 - Lindroos M, Kupari M, Heikkilä J, Tilvis R (1993) Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol*. 21:1220 - 5.
- 9 - Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. (1999) Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med* 341: 142– 147.
- 10 - Otto CM, Burwash IG, Legget ME, Munt BI, Fujioka M, Healy NL, Kraft CD, Miyake-Hull CY, Schwaegler RG. (1997) Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation* 95: 2262– 2270.
- 11 – Rosenhek R, Klaar U, Schemper M, et al. (2004) Mild and moderate aortic stenosis. Natural history and risk stratification by echocardiography. *Eur Heart j* 25:199-205
- 12 - Aronow WS, Ahn C, Shiran J, Kronzon I. (1998) Comparison of frequency of new coronary events in older persons with mild, moderate, and severe valvular aortic stenosis with those without aortic stenosis. *Am J Cardiol* 81:647-9
- 13 - Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O’Gara PT, O’Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS; 2006 Writing Committee Members; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force. (2008) 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation*.15:e523-661.
- 14 - Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, Flachskampf F, Hall R, Iung B, Kasprzak J, Nataf P, Tornos P, Torracca L, Wenink A; Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology; ESC Committee for Practice Guidelines. (2007) Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007 28:230-68.
- 15 - Rosengart T K, Feldman T, Borger M A, Vassiliades T A Jr, Gillinov A M, Hoercher K J, Vahanian A, Bonow R O, O’Neill W. (2008) Percutaneous and minimally invasive valve procedures: a scientific statement from the American Heart Association, *Circulation* 117:1750–1767.
- 16 - Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. (1997) Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 29:630–4.

- 17 - Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM e O'Brien KD (1994) Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis: histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 90:844–853.
- 18 - O'Brien KD. (2006) Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1721–1728.
- 19 - Goldbarg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. (2007) Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 50:1205–1213.
- 20 - Rajamannan NM. (2009) Calcific aortic stenosis: lessons learned from experimental and clinical studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:162–168.
- 21 - Olsson M, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, et al. (1994) Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* 23:1162–70.
- 22 - Mohler ER III, Gannon F, Reynolds C, et al. (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103:1522–8.
- 23 - Soini Y, Salo T, Satta J. (2003) Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol* 34:756–63.
- 24 - Akat K, Borggrefe M, Kaden JJ. (2003) Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart* 95:616-623.
- 25 - Schoen FJ, Levy RJ (1999) Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28–May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res*. 47:439 65.
- 26 - Yetkin E, Waltenberger J. (2009) Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 135(1):4-13.
- 27 - Davies PF, Passerini AG, Simmons CA.(2004) Aortic valve: turning over a new leaf(let) in endothelial phenotypic heterogeneity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1331-1333.
- 28 - Mazzone A, Epistolato MC, De Caterina R, Storti S, Vittorini S, Sbrana S, Gianetti J, Bevilacqua S, Glauber M, Biagini A, Tanganelli P.(2004) Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol* 43:1670-1676.
- 29 - Mirzaie M, Meyer T, Schwarz P, Lotfi S, Rastan A, Schondube F. (2002) Ultrastructural alterations in acquired aortic and mitral valve disease as revealed by scanning and transmission electron microscopical investigations. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 8:24-30.
- 30 - Goldbarg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V.(2007) Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 50:1205-1213.
- 31 - Dimmeler S, Zeiher AM. (2004) Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med* 82:671-677.
- 32 - Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ.(2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115:1285-1295.
- 33 - Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, Muller M, Schulz S, Kirchhoff N, Doerries C, Horvath T, Limbourg A, Limbourg F, Fliser D, Haller H, Drexler H, Landmesser U. (2007) Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 116:163-173.
- 34 - Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T.(2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600.
- 35 - Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007.
- 36 - Shantsila E, Watson T, Lip GY.(2007) Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol* 49:741-752.

- 37 - Matsumoto Y, Adams V, Walther C, Kleinecke C, Brugger P, Linke A, Walther T, Mohr FW, Schuler G. (2009) Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. *Eur Heart J* 30:346-55.
- 38 - Atkins GB, Jain MK. (2007) Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res* 100:1686-1695.
- 39 - Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. (1986) Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2114-2117.
- 40 - Chang E, Harley CB. (1995) Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11190-11194.
- 41 - Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. (2002) Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105:1541-1544.
- 42 - Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600.
- 43 - Chenevard R, Bechir M, Hurlimann D, Ruschitzka F, Turina J, Lüscher TF, Noll G. (2006) Persistent endothelial dysfunction in calcified aortic stenosis beyond valve replacement surgery. *Heart* 92:1862-1863.
- 44 - Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007.
- 45 - Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, Maurer G, Baumgartner H. (2000) Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med* 343:611-617.
- 46 - Samani NJ, van der Harst P. (2008) Biological ageing and cardiovascular disease. *Heart* 94:537-539.
- 47 - Mulholland DL, Gotlieb AI. (1996) Cell biology of valvular interstitial cells. *Can J Cardiol* 12:231-6.
- 48 - Olsson M, Rosenqvist M, Nilsson J. (1994) Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 24:1664-71.
- 49 - Fondard O, Detaint D, Iung B, et al. (2005) Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J* 26:1333-41.
- 50 - Edep ME, Shirani J, Wolf P, et al. (2000) Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol* 9:281-6.
- 51 - Soini Y, Satta J, Maatta M, et al. (2001) Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol* 194:225-31.
- 52 - Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221-33.
- 53 - Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. (2000) Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol* 9:281-6.
- 54 - Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, Sarikoc A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggrefe M. (2003) Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 170:205-11.
- 55 - Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, et al. (2005) Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* 14(2):80-7.
- 56 - Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biasette H, Jarraya M, Hvass U, Couetil JP, Henin D, Michel JB, Vahanian A, Jacob MP. (2005) Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J* 26:1333-41.
- 57 - Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler III ER, Schoen FJ, Levy RJ. (2001) Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol* 159:321-7.

- 58 - Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, Juvonen TS, Soini Y. (2003) Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg* 76:681–8.
- 59 – Kaden JJ, Vocke DC, Fischer CS, et al. (2004) Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in calcific aortic stenosis. *Z Kardiol* 93:124–30.
- 60 - Yeghiazaryan K, Skowasch D, Bauriedel G, Schild H, Golubnitschaja O. (2007) Could activated tissue remodeling be considered as early marker for progressive valve degeneration? Comparative analysis of checkpoint and ECM remodeling gene expression in native degenerating aortic valves and after bioprosthetic replacement. *Amino Acids* 32:109-14.
- 61 - Helske S, Syvaranta S, Kupari M, Lappalainen J, Laine M, Lommi J, Turto H, Mayranpaa M, Werkkala K, Kovanen PT, Lindstedt KA. Possible role for mast cell-derived cathepsin G in the adverse remodelling of stenotic aortic valves. *Eur Heart* 27:1495-504.
- 62 – Helske S, Syvaranta S, Lindstedt KA, Lappalainen J, Oorni K, Mayranpaa MI, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT. (2006) Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1791-8.
- 63 - Satta J, Melkko J, Pollanen R. (2002) Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression. *J Am Coll Cardiol* 39(1):96–101.
- 64 - Jones PL, Jones FS. (2000) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol* 2000;19:581–96.
- 65 - Maher ER, Young G, Smyth-Walsh B, Pugh S, Curtis JR. (1987) Aortic and mitral valve calcification in patients with end-stage renal disease. *Lancet* 2:875-7.
- 66 - McFalls EO, Archer SL. (1990) Rapid progression of aortic stenosis and secondary hyperparathyroidism. *Am Heart J* 120:206-8.
- 67 - O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. (1995) Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions [comment]. *Circulation*. 92:2163–2168.
- 68 - Mohler ER III, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. (1997) Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:547–552.
- 69 - Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. (2003) Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*. 107:2181–2184.
- 70 - Mohler 3rd ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103(11):1522–8.
- 71 - Yang X, Fullerton DA, Su X, Ao L, Cleveland Jr JC, Meng X. (2009) Proosteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2. *J Am Coll Cardiol* 53(6):491–500.
- 72 - Schafer C, Heiss A, Schwarz A, et al. (2003) The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 112:357–66.
- 73 - Kaden JJ, Reinohl JO, Blesch B, et al. (2007) Systemic and local levels of fetuin-A in calcific aortic valve stenosis. *Int J Mol Med* 20:193–7.
- 74 - Bozbas H, Yildirim A, Atar 1, et al. (2007) Effects of serum levels of novel atherosclerotic risk factors on aortic valve calcification. *J Heart Valve Dis* 16:387-93
- 75 - Teitelbaum SL, Ross FP. (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4:638–49.
- 76 - Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, et al. (2004) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 36:57–66.
- 77 - Osman L, Chester AH, Sarathchandra P, et al. (2007) A novel role of the sympathoadrenergic system in regulating valve calcification. *Circulation* 116:1282–7.

- 78 - Price PA, June HH, Buckley JR, et al. (2001) Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1610–6.
- 79 - Min H, Morony S, Sarosi I, et al. (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 192:463–74.
- 80 - Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, et al. (2004) Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res* 298:455–64.
- 81 - Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, et al. (2006) Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* 12:1151–9.
- 82 - Charest A, Pepin A, Shetty R, et al. (2006) Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart* 92:1844–9.
- 83 - Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269: 26988–95.
- 84 - Ferrara N. (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77:527–43.
- 85 - Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. (1996) Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94:1647–54.
- 86 - Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, et al. (1994) Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55:410–22.
- 87 - Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, et al. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 372:83–7.
- 88 - Clauss M, Weich H, Breier G, et al. (1996) The vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 mediates biological activities: implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 271:17629–34.
- 89 - Barleon B, Sozzani S, Zhou D, et al. (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336–43.
- 90 - Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. (1990) Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172:1535–45.
- 91 - Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5:623–8.
- 92 - Verrier ED, Boyle Jr EM. (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg* 62:915–22.
- 93 - Parolari A, Loardi C, Mussoni L et al. (2009) Nonrheumatic calcific aortic stenosis : an overview from basic science to pharmacological prevention. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 35:493–504.
- 94 - Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K. (1993) Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves. *Am J Cardiol.* 71: 322–327.
- 95 - Pachulski RT, Chan KL. (1993) Progression of aortic valve dysfunction in 51 adult patients with congenital bicuspid aortic valve: assessment and follow-up by Doppler echocardiography. *Br Heart J.* 69: 237–240.
- 96 - Morishima A, Marui A, Shimamoto T, Saji Y, Tambara K, Nishina T, Komeda M. (2007) Successful aortic valve replacement for Heyde syndrome with confirmed hematologic recovery. *Ann Thorac Surg* 83:287–8.
- 97 - Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, Zanobini M, Sala A, Steffan A, Ruggeri ZM. (2000) Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. *Circulation* 102:1290—5.

- 98 - Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A, Jude B. (2003) Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med* 349:343-9.
- 99 - Olsson M, Hultcrantz R, Schulman S, Wallgren E. (2002) Acquired platelet dysfunction may be an aetiologic factor in Heyde's syndrome—normalization of bleeding time after aortic valve replacement. *J Intern Med* 252:516-23.
- 100 - Goldsmith IR, Blann AD, Patel RL, Lip GY. (2001) Effect of aortic valve replacement on plasma soluble P-selectin, von Willebrand factor, and fibrinogen. *Am J Cardiol* 87:107-L110. A9.
- 101 - Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, et al. (2004) Bicuspid aortic valve is heritable. *J Am Coll Cardiol* 44:138-43
- 102 - Tziomalos K, Athyros V G, Karagiannis A, Mikhailidis D P. (2008) Established and emerging vascular risk factors and the development of aortic stenosis: an opportunity for prevention? *Expert Opin. Ther. Targets* 12(7):809-820.
- 103 - Chirkov YY, Mishra K, Chandv S, et al. (2006) Loss of aiui-aggregatory effects of aortic valve tissue in patients with aortic stenosis. *J Fleart Valve Dis* 15:28-33
- 104 - Massberg S, Vogt F, Dickfeld T, et al. (2003) Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res* 0:187-94
- 105 - Ngo DTM, Sverdlov AL, Willoughby SR, et al. (2009) Determinants of occurrence of aortic sclerosis in an aging population. *J Am Coll Cardiol Img* 2: 919–27.
- 106 - Iida M, Yamamoto M, Yamazaki M, Sawaguchi M, Honjo H, Kodama I, Kamiya K. (2008) Association of aortic valve sclerosis with thrombin generation in hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 22:781-7.
- 107 - Mehta PK, Griendling KK. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C82–97.
- 107 - Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Pena-Silva R, Heistad DD. (2008) Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 52:843—50.
- 108 - Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak Jr J, Pomerantzeff PM, Laurindo FR. (2008) Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:463—70.
- 109 - Helse S, Lindstedt KA, Laine M, et al. (2004) Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* 44:1859–66.
- 110 - Danser AH, Saris JJ, Schuijt MP, et al. (1999) Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovasc Res* 44:252–65.
- 111 - Watson C, Alp NJ. (2008) Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)* 114:509-31.
- 112 - Ieven MM, Hoymans VY. (2005) Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence. *J Clin Microbiol* 43:19—24.
- 113 - Porqueddu M, Spirito R, Parolari A, Zanobini M, Pompilio G, Polvani G, Alamanni F, Stangalini D, Tremoli E, Biglioli P. (2002) Lack of association between serum immunoreactivity and *Chlamydia pneumoniae* detection in the human aortic wall. *Circulation* 106:2647-8.
- 114 - Agmon Y, Khandheria BK, Jamil Tajik A, Seward JB, Sicks JD, Fought AJ, O'Fallon WM, Smith TF, Wiebers DO, Meissner I. (2004) Inflammation, infection, and aortic valve sclerosis; Insights from the Olmsted County (Minnesota) population. *Atherosclerosis* 174:337—42.
- 115 - Atar S, Tolstrup K, Cercek B, Siegel RJ. (2007) *Chlamydia pneumoniae* antibody titers and cardiac calcifications: a cross-sectional serological-echocardiographic correlative study. *Isr Med Assoc J* 9:517—20.

- 116 - Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Brueckmann M, Haase KK, Dempfle CE, Borggrefe M. (2003) Pathogenetic role of *Chlamydia pneumoniae* in calcific aortic stenosis: immunohistochemistry study and review of the literature. *J Heart Valve Dis* 12:447—53
- 117 - Bratos-Perez MA, Sanchez PL, Garcia de Cruz S, Villacorta E, Palacios IF, Fernandez-Fernandez JM, Di Stefano S, Orduna-Domingo A, Carrascal Y, Mota P, Martin-Luengo C, Bermejo J, San Roman JA, Rodriguez-Torres A, Fernandez-Aviles F. (2008) Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification. *Eur Heart J* 29:371-6.
- 118 - Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, et al. (1997) Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest* 99:996–1009.
- 119 - Helske S, Oksjoki R, Lindstedt KA, Lommi J, Turto H, Werkkala K, et al. (2008) Complement system is activated in stenotic aortic valves. *Atherosclerosis*. 196:190-200.
- 120 - Walsh CR, Larson MG, Kupka MJ, et al. (2004) Association of aortic valve calcium detected by electron beam computed tomography with echocardiographic aortic valve disease and with calcium deposits in the coronary arteries and thoracic aorta. *Am J Cardiol* 93:421-5
- 121 - Kaden JJ, Kilic R, Sarikoc A, et al. (2005) Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int J Mol Med* 16:669-72,
- 122 - Meng X, Ao L, Song Y, Babu A, Yang X, Wang M, Weyant MJ, Dinarello CA, Cleveland Jr JC, Fullerton DA. (2008) Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C29—35.
- 123 - Ghaisas NK, Foley JB, O'Brien DS. (2000) Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression. *J Am Coll Cardiol* 36: 2257–62.
- 124 - O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. (1996) Apolipoproteins B, (a) and E accumulate in the morphologically early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 16: 523–532.
- 125 - Helske S, Miettinen T, Gylling H, Mayranpaa M, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT. (2008) Accumulation of cholesterol precursors and plant sterols in human stenotic aortic valves. *J Lipid Res* 49:1511—8.
- 126 - Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM. (2006) Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol* 47:1707—12.
- 127 - Mohty D, Pibarot P, Despres JP, et al. (2008) Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:187–93.
- 128 - Wilmschurst PT, Stevenson RN, Griffiths H, Lord JR. (1997) A case-control investigation of the relation between hyperlipidaemia and calcific aortic valve stenosis. *Heart* 78:475-9.
- 129 - Avakian SD, Annicchino-Bizzacchi JM, Grinberg M, Ramires JA, Mansura AP. (2001) Apolipoproteins AI, B, and E polymorphisms in severe aortic valve stenosis. *Clin Genet* 60:381-4.
- 130 - Ortlepp JR, Pillich M, Mevissen V, Krantz C, Kimmel M, Autschbach R, Langebartels G, Erdmann J, Hoffmann R, Zerres K. (2006) APOE alleles are not associated with calcific aortic stenosis. *Heart* 92:1463-6.
- 131 - Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. (2003) Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation* 108:1804-8.
- 132 - Ortlepp JR, Schmitz F, Mevissen V, Weiss S, Huster J, Dronsowski R, Langebartels G, Autschbach R, Zerres K, Weber C, Hanrath P, Hoffmann R. The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. *Eur Heart J* 2004;25:514-22.

- 133 - Bossé Y, Mathieu P, Pibarot P. (2008) Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 14:1327-36.
- 134 - Ortlepp JR, Hoffmann R, Ohme F, Lauscher J, Bleckmann F, Hanrath P. (2001) The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart* 85:635-8.
- 135 - Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. (2005) Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437:270-4
- 136 - Nordstrom P, Glader CA, Dahlen G, Birgander LS, Lorentzon R, Waldenstrom A, Lorentzon M. (2003) Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women. *J Intern Med* 254:140-6.
- 137 - Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Skowasch D, Schild H, Bauriedel G. (2006) p21WAF1/CIP1 and 14-3-3 sigma gene expression in degenerated aortic valves: a link between cell cycle checkpoints and calcification. *Amino Acids* 31:309-16.
- 138 - Probst V, Le Scouarnec S, Legendre A, et al. (2006) Familial aggregation of calcific aortic stenosis in the western part of France. *Circulation* 113:856.
- 139 - Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K. (1993) Rapidity of progression of aortic stenosis in patients with congenital bicuspid aortic valves, *Am J Cardiol* 71:322–327
- 140 - Borger MA, Preston M, Ivanov J, et al. (2004) Should the ascending aorta be replaced more frequently in patients with bicuspid aortic valve disease? *J Thorac Cardiovasc Surg* 128:677.
- 141 - Yee-Moon Wang A, Wang M, Woo J, Wai-Kei Lam C, Kam-Tao Li P, Lui SF, Sanderson JE. (2003) Cardiac Valve Calcification as an Important Predictor for All-Cause Mortality and Cardiovascular Mortality in Long-Term Peritoneal Dialysis Patients: A Prospective Study. *J Am Soc Nephrol* 14:159.
- 142 - Palta S, pai AM, Gill K, et al. (2000) New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. *Circulation* 101:2497.
- 143 - Peltier M, Trojette F, Enrique-Sarano M, et al. (2003) relation between cardiovascular risk factors and nonrheumatic severe calcific aortic stenosis among patients with a three-cuspid aortic valve. *An J Cardiol* 91:97.
- 144 - Owens DS, Katz R, Johnson E, Shavelle DM, Probstfield JL, Takasu J, Crouse JR, Carr JJ, Kronmal R, Budoff MJ, O'Brien KD.(2008) Interaction of age with lipoproteins as predictors of aortic valve calcification in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arch Intern Med* 168:1200-1207.
- 145 - Messika-Zeitoun D, Bielak LF, Peyser PA, et al. (2007) Aortic valve calcification: determinants and progression in the population. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 27:642-8.
- 146 - Wong ND, Sciammarella M, Arad Y, et al. (2003) Relation of thoracic aortic and aortic valve calcium to coronary artery calcium and risk assessment. *Am J Cardiol* 92:951 -5
- 147 - Mohler KR III, Chawla MK, Chang AW, et al. (1999) Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis* 8:254-60
- 148 - Weiss RM, Ohashi M, Miller J D, et al. (2006) Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation* 114:2065-9
- 149 - Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. (1999) Presence of oxidized low density lipoprotein in non rheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 19:1218-22
- 150 - Novaro GM, Katz R, Aviles Rj, et al. (2007) Clinical factors, but not C-reactive protein, predict progression of calcific aortic-valve disease: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 50:1992-8
- 151 - Pohle K, Otte M, Maffert R, et al. (2004) Association of cardiovascular risk factors to aortic valve calcification as quantified by electron beam computed tomography. *Mayo Clin Proc* 79:1242-6
- 152 - Boon A, Cheriex E, Loader J, Kessels F, (1997) Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve. *Heart* 78:472-4
- 153 - Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, et al. (2006) Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 36S:1005-11.

- 154 - Chandra HR, Goldstein JA, Choudhary N, O'Neill CS, George PB, Gangasani SR, Cronin L, Marcovitz PA, Hauser AM, O'Neill WW. (2004) Adverse outcome in aortic sclerosis is associated with coronary artery disease and inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 43: 169–175.
- 155 - Poggianti E, Venneri L, Chubuchny V, Jambrik Z, Baroncini LA, Picano E. (2003) Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 41: 136–141.
- 156 - Novaro GM, Aronow HD, Mayer-Sabik E, Griffin BP. (2004) Plasma homocysteine and calcific aortic valve disease. *Heart.* 90: 802–803
- 157 - Galante A, Pietroiusti A, Vellini M, Piccolo P, Possati G, De Bonis M, Grillo RL, Fontana C, Favalli C. (2001) C-reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 38: 1078–1082.
- 158 - Hess OM, Ritter M, Schneider J, Grimm J, Turina M e Krayenbuehl HP (1984) Diastolic stiffness and myocardial structure in aortic valve disease before and after valve replacement, *Circulation* 69:855–865
- 159 - Maganti K, Rigolin VH, Sarano ME, Bonow RO. (2010) Valvular heart disease: diagnosis and management. *Mayo Clin Proc.* 85(5):483-500.
- 160 - Carabello BA, Paulus WJ. (2009) Aortic stenosis. *Lancet* 373:956-966.
- 161 - Gould KL, Carabello BA. (2003) Why angina in aortic stenosis with normal coronary arteriograms? *Circulation* 107:3121.
- 162 - Rajappan K, RRimoldi OE, Dutka DP, et al. (2002) Mechanisms of coronary microcirculatory dysfunction in patients with aortic stenosis and angiographically normal coronary arteries. *Circulation* 105:470.
- 163 - Gaasch WH. (1994) Diagnosis and treatment of heart failure based on left ventricular systolic or diastolic dysfunction. *JAMA.* 271: 1276–80
- 164 - Zile MR e Brutsaert DL (2002) New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: part II—causal mechanisms and treatment, *Circulation* 105:1503–1508.
- 165 - Kadem L, Dumesnil JG, Rieu R, et al. (2005) Impact of systemic hypertension on the assesement of aortic stenosis. *Heart* 91:354.
- 166 - Otto CM. (2009) Calcific aortic valve disease: outflow obstruction is the end stage of a systemic disease process. *Eur Heart J.* 16:1940-2.
- 167 - Branch KR, O'Brien KD, Otto CM. (2002) Aortic valve sclerosis as a marker of active atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 4:111.
- 168 - Olsen MH, Wachtell K, Bella JN, Gerds E, Palmieri V, Nieminen MS, Dahlöf B, Ibsen H, Devereux RB. (2005) Aortic valve sclerosis relates to cardiovascular events in patients with hypertension (a LIFE substudy). *Am J Cardiol* 95:132-136.
- 169 - Taylor HA Jr, Clark BL, Garrison RJ, Andrew ME, Han H, Fox ER, Arnett DK, Samdarshi T, Jones DW. (2005) Relation of aortic valve sclerosis to risk of coronary heart disease in African-Americans. *Am J Cardiol* 95:401-404.
- 170 - Faggiano P, Antonini-Canterin F, Erlicher A, Romeo C, Cervesato E, Pavan D, Piazza R, Huang G, Nicolosi GL. (2003) Progression of aortic valve sclerosis to aortic stenosis. *Am J Cardiol* 91:99.
- 171 - Cosmi JE, Kort S, Tunick PA, Rosenzweig BP, Freedberg RS, Katz ES, Applebaum RM, Kronzon I. (2002) The risk of the development of aortic stenosis in patients with "benign" aortic valve thickening. *Arch Intern Med.* 162: 2345–2347
- 172 - Pellikka PA. Sarano MB. Nishimura RA. et al. (2005) Outcome of 222 adults with asymptomatic hemodynamically significant aortic stenosis during prolonged follow-up. *Circulation* 111(24):3290-3295.
- 173 - Otto CM. (2006) Valvular aortic stenosis: disease severity and timing of intervention. *J Am Coll Cardiol.* 11:2141-51.
- 174 - Dal-Bianco JP, Khandheria BK, Mookadam F, Gentile F, Sengupta PP. (2008) Management of asymptomatic severe aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 16:1279-92.

- 175 - Bouma BJ, van den Brink RBA, van der Meulen JHP et al. (1999) To operate or not elderly patients with aortic stenosis: the decision and its consequences. *Heart* 82:143–8.
- 176 - Chambers J, Das P. (2001) Exercise testing in aortic stenosis. *Heart* 86:361–2.
- 177 - Lim P, Monin JL, Monchi M, Garot J, Pasquet A, Hittinger L, Vanoverschelde JL, Carayon A, Guéret. (2004) Predictors of outcome in patients with severe aortic stenosis and normal left ventricular function: role of B-type natriuretic peptide. *Eur Heart J.* 22:2048-53.
- 178 – Weber M, Arnold R, Rau M, Elsaesser A, Brandt R, Mitrovic V, Hamm C. (2005) Relation of N-terminal pro B-type natriuretic peptide to progression of aortic valve disease. *Eur Heart J.* 10:1023-30.
- 179 - Bergler-Klein J, Mundigler G, Pibarot P, Burwash IG, Dumesnil JG, Blais C, Fuchs C, Mohty D, Beanlands RS, Hachicha Z, Walter-Publig N, Rader F, Baumgartner H. (2007) B-type natriuretic peptide in low-flow, low-gradient aortic stenosis: relationship to hemodynamics and clinical outcome: results from the Multicenter Truly or Pseudo-Severe Aortic Stenosis (TOPAS) study. *Circulation.* 22:2848-55.
- 180 - Rafique AM, Biner S, Ray I, Forrester JS, Tolstrup K, Siegel RJ. (2009) Meta-analysis of prognostic value of stress testing in patients with asymptomatic severe aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 7:972-7.
- 181 - Piérard L A, Lancellotti P. (2007) Stress testing in valve disease, *Heart* 93:766–772.
- 182 - Ennezat PV, Marechaux S, Lung B, Chauvel C, LeJemtel TH, Pibarot P. (2009) Exercise testing and exercise stress echocardiography in asymptomatic aortic valve stenosis. *Heart* 95:877-884.
- 183 - Hachicha Z, Dumesnil JG, Pibarot P. (2009) Usefulness of the valvuloarterial impedance to predict adverse outcome in asymptomatic aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 11:1003-11.
- 184 - Dalsgaard M, Kjaergaard J, Pecini R, Iversen KK, Kober L, Moller JE, Grande P, Clemmensen P, Hassager C. (2010) Predictors of exercise capacity and symptoms in severe aortic stenosis. *Eur J Echocardiogr.*
- 185 - Faggiano P, Aurigemma GP, Rusconi C, Gaasch WH. (1996) Progression of valvular aortic stenosis in adults: literature review and clinical implications. *Am Heart J.* 132: 408–17.
- 186 - Rosenhek R, Zilberszac R, Schemper M, Czerny M, Mundigler G, Graf S, Bergler-Klein J, Grimm M, Gabriel H, Maurer G. (2010) Natural history of very severe aortic stenosis. *Circulation* 121(1):151-6.
- 187 - Feuchtnner GM, Müller S, Grander W, Alber HF, Bartel T, Friedrich GJ, Reinthaler M, Pachinger O, zur Nedden D, Dichtl W. (2006) Aortic valve calcification as quantified with multislice computed tomography predicts short-term clinical outcome in patients with asymptomatic aortic stenosis. *J Heart Valve Dis* 4:494-8.
- 188 – Koos R, Kuhl HP, Muhlenbruch G, et al. (2006) Prevalence and clinical importance of aortic valve calcification detected incidentally on CT scans: comparison with echocardiography. *Radiology* 241:76-82
- 189 - Koos R, Mahnken AH, Sinha AM, et al. (2004) Aortic valve calcification as a marker for aortic stenosis severity: assessment on 16-MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 183:1813-8
- 190 - Kaden JJ, Freyer S, Weisser G, et al. (2002) Correlation of degree of aortic valve stenosis by Doppler echocardiogram to quantity of calcium in the valve by electron beam tomography. *Am J Cardiol* 90:554-7
- 191 - Monin JL, Lancellotti P, Monchi M, Lim P, Weiss E, Piérard L, Guéret P. (2009) Risk score for predicting outcome in patients with asymptomatic aortic stenosis. *Circulation* 1:69-75.
- 192 - Zigelman CZ, Edelstein PM. (2009) Aortic valve stenosis. *Anesthesiol Clin.* 3:519-32.
- 193 - Aronow WS, Ahn C, Kronzon L, Goldman ME. (2001) Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. *AmJ Cardiol* 88:693-5
- 194 - Bahler RC, Desser DR, Finkelhor RS, Brener SJ, Youssefi M. (1999) Factors leading to progression of valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol.* 84: 1044–1048
- 195 - Briand M, Leraieux I, Dumesnil JG, et al. (2006) Metabolic syndrome negatively influences disease progression and prognosis in aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 47:2229-36.

- 196 - Rosenhek R, Rader H Loho N, et al. (2004) Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation* 2004; 110:1291-5
- 197 - Bellamy MF, Pellikka PA, Klarich KW, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. (2002) Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in community. *J Am Coll Cardiol.* 40: 1731–1734
- 198 - Nassimiha D, Aronow WS, Ahn C, Goldman ME. (2001) Association of coronary risk factors with progression of valvular aortic stenosis in older persons. *AmJ Cardiol* 87:1313-4.
- 199 - Yilmaz MB, Guray U, Guray Y, Cihan G, Caldir V, Cay S, Kisacik HL, Korkmaz S. (2004) Lipid profile of patients with aortic stenosis might be predictive of rate of progression. *Am Heart J* 147:915—8.
- 200 - Deutscher S, Rockette HE, Krishnaswami.(1984) Diabetes and hypercholesterolemia among patients with calcific aortic stenosis. *J Chronic Dis* 37:407-415.
- 201 - Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. (2005) A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis, *N Engl J Med* 352:2389-97
- 202 - Pohle K, Maffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, et al. (2001) Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation.* 104:1927-32.
- 203 – Libby, P (2008) Valvular Heart Disease. In: Braunwald's – Heart Disease (8^a ed), pp1625-1632. Philadelphia:Saunders Elsevier.
- 204 - Elmariah S, Mohler ER 3rd. (2010) The Pathogenesis and treatment of the valvulopathy of aortic stenosis: Beyond the SEAS. *Curr Cardiol Rep* 2:125-32.
- 205 - Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, Goldman ME. (2001) Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. *Am J Cardiol.* 88: 693–695.
- 206 - Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. (2001) Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation.* 104: 2205–2209.
- 207 - Shavelle DM, Takasu J, Budoff MJ, Mao S, Zhao XQ, O'Brien KD. (2002) HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. *Lancet.* 359: 1125–1126
- 208 - Farmer JA. (2000) Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep.* 2: 208–217
- 209 - Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, et al. (2007) Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 49:554–561.
- 210 - Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, et al. (2008) Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 359:1343–1356.
- 211 - Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, et al. (2007) Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 116:2841–2850.
- 212 - Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, et al. (2009) Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice. *Circulation* 119:2693–2701.
- 213 - Antonini-Canterin F, Hirsu M, Popescu BA, et al. (2008) Stage-related effect of statin treatment on the progression of aortic valve sclerosis and stenosis. *Am J Cardiol* 102:738–742.
- 214 - Mohty D, Pibarot P, Despres JP, et al. (2009) Age-related differences in the pathogenesis of calcific aortic stenosis: the potential role of resistin. *Int J Cardiol.*
- 215 - O'Brien KD, Probstfield JL, Caulfield MT, Nasir K, Takasu J, Shavelle DM, et al. (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibitors and change in aortic valve calcium. *Arch Intern Med.* 165:858-62.
- 216 - Corrado A, Santoro N, Cantatore FP. (2007) Extra-skeletal effects of bisphosphonates. *Joint Bone Spine* 74:32–38.

- 217 - Adami S, Braga V, Guidi G, et al.(2000) Chronic intravenous aminobisphosphonate therapy increases high-density lipoprotein cholesterol and decreases low-density lipoprotein cholesterol. *J Bone Miner Res* 15:599–604.
- 218 - Elmariah S, O'Brien KD, Budoff MJ, et al.(2009) The relationship of bisphosphonate use to the prevalence of aortic valve calcification in women. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [abstract 1001–299]. *J Am Coll Cardiol* 53:A461.
- 219 - Skolnick AH, Osranek M, Formica P, Kronzon I. (2009) Osteoporosis treatment and progression of aortic stenosis. *Am J Cardiol* 104:122–124.
- 220 - Poon M, Badimon JJ, Fuster V. (2002) Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet* 359:619–622.
- 221 - Wessely R, Schomig A, Kastrati A. (2006) Sirolimus and Paclitaxel on polymer-based drug-eluting stents: similar but different. *J Am Coll Cardiol* 47:708–714
- 222 - Spargias K, Milewski K, Debinski M, et al. (2009) Drug delivery at the aortic valve tissues of healthy domestic pigs with a Paclitaxel-eluting valvuloplasty balloon. *J Interv Cardiol* 22:291–298.
- 223 - Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. (2001) Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation*. 104: 2205–2209.