

Estenosis Aórtica Calcificada y Proteínas de la Superfamilia del Colágeno



Universidad de Valladolid

Autor: Enrique Pérez Riesgo

Tutora: Dra. M^ª Carmen García
Rodríguez

IBGM. Universidad de Valladolid

Máster en Investigación

Biomédica

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Válvula aórtica y estenosis aórtica.	1
1.2	Estenosis Aórtica Calcificada.....	2
1.2.1	Factores de riesgo y etiología de la estenosis aórtica.	2
1.2.2	Patogenia de la estenosis aórtica.....	3
1.3	Proteínas de la superfamilia del colágeno: colágeno XIII.	7
1.3.1	Superfamilia del colágeno.	7
1.3.2	Estructura, localización y función del colágeno XIII.	7
1.3.3	Colágeno XIII y estenosis aórtica.	8
2	Objetivos.....	8
3	Materiales.....	8
3.1	Cultivo celular.	8
3.2	Preparación de Plásmidos y transfección transitoria.	8
3.3	Lisado celular.	9
3.4	Western Blot.	9
3.5	Anticuerpos:.....	10
4	Métodos.....	10
4.1	Cultivo y recuento Celular.....	10
4.2	Preparación y amplificación de los plásmidos.....	11
4.2.1	Transformación de bacterias.....	11
4.3	Métodos de Transfección Transitoria.....	12
4.3.1	Transfección con Lipofectamina.....	12
4.3.2	Transfección con Turbofectin.....	12
4.4	Eficiencia de la transfección transitoria.....	12
4.5	Obtención de Sobrenadantes y Lisados celulares.	12
4.6	Western Blot.....	13
4.6.1	Preparación de las muestras.....	13
4.6.2	Electroforesis y Transferencia.....	13
4.6.3	Bloqueo.....	13
4.6.4	Incubación con Anticuerpo primario y secundario.	13
4.6.5	Detección de las proteínas.....	13
4.7	Análisis de Datos.....	13

4.7.1	Estimación de la eficiencia de la Transfección.....	13
4.7.2	Diseño Estadístico de Experimentos.	14
5	Resultados.....	16
5.1	Sobreexpresión de colágeno XIII en células AVIC mediante transfección transitoria.	16
5.1.1	Puesta a punto de los métodos de Transfección transitoria en AVIC.	16
5.2	Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de proteínas pro-inflamatorias.....	21
5.2.1	Sobreexpresión de colágeno XIII fusionado a EGFP.....	21
5.2.2	Sobreexpresión de colágeno XIII sin fusionar a EGFP.....	25
6	Discusión.....	27
7	Conclusiones.....	29
8	Bibliografía.....	29
	ANEXO I: Abreviaturas.....	I

1 Introducción.

1.1 Válvula aórtica y estenosis aórtica.

Las válvulas cardiacas juegan un importante papel, pues evitan el flujo retrógrado de la sangre, haciendo que éste sea unidireccional [1,2]. La válvula aórtica se sitúa en el corazón, entre la aurícula izquierda y la arteria aorta. De forma semilunar, está formada por tres valvas muy finas y flexibles (menos de 1 mm de grosor), conectadas entre sí por un anillo fibroso (Figura 1a). Existen individuos con defectos congénitos que sólo tienen dos valvas, por lo que se denomina válvula aórtica bicúspide. Al igual que las otras válvulas cardiacas, la válvula aórtica se cierra cuando un gradiente de presión en sentido retrógrado la impulsa hacia atrás (Fase de llenado, Diástole (Figura 1)), y se abre cuando un gradiente de presión en sentido anterógrado envía la sangre hacia delante (Fase de eyección, Sístole (Figura 1)). Debido a la elevada presión de las arterias al final de la sístole, las válvulas sigmoideas se cierran más bruscamente y la velocidad de salida de la sangre a su través es mayor [1,3, 4].

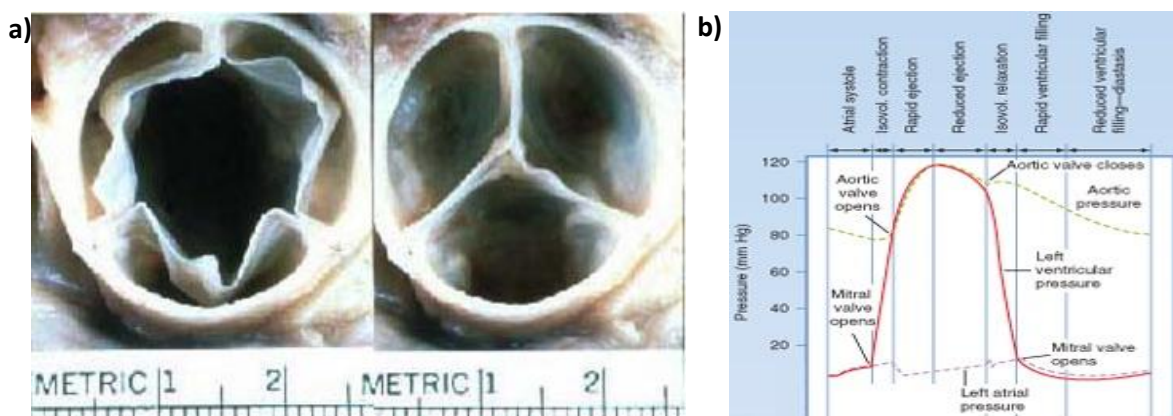


Figura 1. Válvula aórtica y Ciclo Cardíaco. (a) Fotografía de la válvula aórtica en posición abierta (Izquierda) y cerrada (Derecha) (b) Ciclo cardíaco: La válvula aórtica permanece cerrada durante las Fases de contracción isovolumétrica, relajación isovolumétrica y de llenado (Diástole). Durante la fase de contracción isovolumétrica, comienzo de la sístole ventricular, que comienza con el cierre de las válvulas auriculoventriculares, la Presión Ventricular (Ventrículo izquierdo) aumenta como consecuencia de la contracción de la pared ventricular, a volumen constante y, cuando la Presión Ventricular supere la Presión Aórtica se abrirá la válvula aórtica vaciándose el ventrículo izquierdo (Fase de eyección), aumentando la presión hasta un punto máximo en el que comienza a descender. Tras la fase de relajación isovolumétrica, donde la Presión del Ventrículo comienza a descender por debajo de la Presión Aórtica, comienza la Fase de Llenado, en la que la válvula aórtica se vuelve a cerrar para así repetir el ciclo cardíaco. Imágenes tomadas de (a) [4] (b) [1].

La válvula aórtica está formada por tres capas (Tabla I, Figura II)[2-6]:

Tabla I. Capas de la válvula aórtica, localización y composición.

Capa	Localización	Composición	Observaciones
Fibrosa	Orientada hacia la aorta	Fibroblastos, fibras de colágeno compactas y fibras de elastina en baja proporción	Forma el centro de cada valva
Esponjosa	Capa central	Fibroblastos, células mesenquimales y una matriz rica en mucopolisacáridos y glicosaminoglucanos	Amortigua el cierre de la válvula y le confiere elasticidad y plasticidad
Ventricular	Orientada hacia el ventrículo	Fibras de elastina y fibras de colágeno (en menor proporción)	El lado de la superficie ventricular de cada valva tiene un revestimiento endotelial

En la válvula aórtica se pueden distinguir, principalmente, dos tipos celulares: Células endoteliales y células intersticiales (Figura II)[2, 3, 4, 7-9].

Las células endoteliales forman una monocapa que recubre la capa fibrosa en contacto con la aorta. Por debajo se sitúa la membrana basal, bajo la cual se encuentra la matriz extracelular, compuesta, principalmente, por colágeno, elastina y

glicosaminoglucanos, lo que le confiere su característica flexibilidad que le permite soportar el estrés hemodinámico al que se ve sometido. La resistencia de la válvula procede, en gran medida, del colágeno de la capa fibrosa (Figura II. Amarillo).

Las células intersticiales de válvula aórtica (AVIC) se encuentran inmersas en la matriz extracelular. Constituyen una población heterogénea cuyo fenotipo *in vivo*, por lo general, es de miofibroblasto o de fibroblasto, por lo que poseen capacidad contráctil, siendo los responsables de la remodelación de la matriz extracelular y de la producción de factores de crecimiento, citocinas y quemocinas (Figura II).

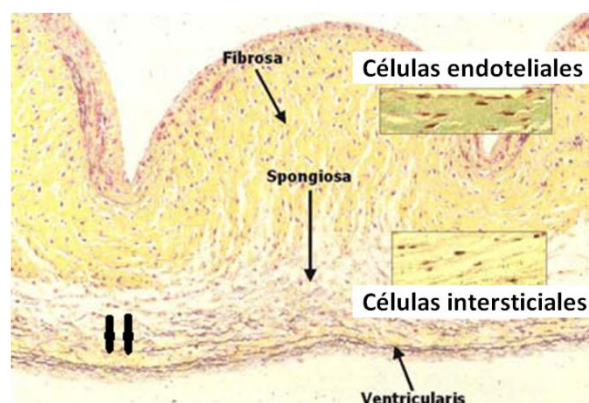


Figura II. Micrografía de sección transversal de una cúspide. Capa Fibrosa (F), Capa esponjosa (S), Capa ventricular (V). Fibras de colágeno de la capa ventricular (Flecha doble). Imagen tomada de [4].

El hecho de que las válvulas aórtica y mitral soporten mayores presiones que las válvulas tricúspide y pulmonar, provoca recambio frecuente de su matriz extracelular, sugiriendo la posibilidad de que dicha remodelación esté regulada a nivel local mediante una señalización mecánica [2].

1.2 Estenosis Aórtica Calcificada.

1.2.1 Factores de riesgo y etiología de la estenosis aórtica.

La estenosis aórtica es una valvulopatía consistente en un estrechamiento de la válvula aórtica debido a un engrosamiento y calcificación de la misma (Figura III). Esta valvulopatía permanece asintomática en las etapas más tempranas, haciéndose evidente cuando el área valvular aórtica disminuye hasta los 1,5-1 cm², siendo 3-4 cm² el área normal, aunque algunos pacientes pueden permanecer asintomáticos con áreas valvulares menores a 1 cm² [10]. Este estrechamiento genera cierta resistencia al flujo normal de la sangre a su través, lo que genera reflujo sanguíneo y un gradiente de presión que provoca un estrés mecánico, potenciándose así la fibrosis y la calcificación, mayor cuanto más avanzada esté la enfermedad [2,5,8,9]. Esta situación puede provocar la hipertrofia y la dilatación del ventrículo izquierdo, dando lugar a un engrosamiento de las paredes [10]. Las fases iniciales de la calcificación de la válvula aórtica incluyen un leve engrosamiento de la cúspide que no llega a afectar a las propiedades mecánicas de la válvula, como sucede en la *Esclerosis Aórtica Degenerativa tipo Mönckberg* [11,12].

Los factores de riesgo de la estenosis aórtica son similares a los de la aterosclerosis, e incluyen la edad, el género masculino, el tabaquismo, la diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipoparatiroidismo, fallo renal crónico, decremento de la densidad ósea e hipertensión arterial sistémica [2,5,8,9,13-16].

Durante mucho tiempo se la consideró una enfermedad degenerativa y pasiva asociada exclusivamente a la edad. Sin embargo, recientes estudios evidencian que es un proceso activamente regulado que involucra inflamación, remodelación de la matriz extracelular e incluso diferenciación osteoblástica [5, 9, 14, 15, 17]. La etiología más común de estenosis aórtica es la calcificación de la válvula aórtica, con una prevalencia del 50-70 % (Figura III).

Así, existe una correlación de la edad con la frecuencia de aparición de calcificación de la válvula aórtica, pues afecta a un 2% de la población mayor de 65 años, a un 3% de la población mayor de 75 años y a un 4% de la población de 85 años. Sin embargo, aunque menos frecuente, la estenosis aórtica también puede ser causada por afección congénita (como es el caso de válvulas bicúspides), con una prevalencia del 6-40 %, o por afecciones reumáticas (infeccioso-inflamatorio), con una prevalencia del 2-11 %, que se ha reducido en las últimas décadas debido a una disminución en las fiebres reumáticas en los países desarrollados (Figura III).

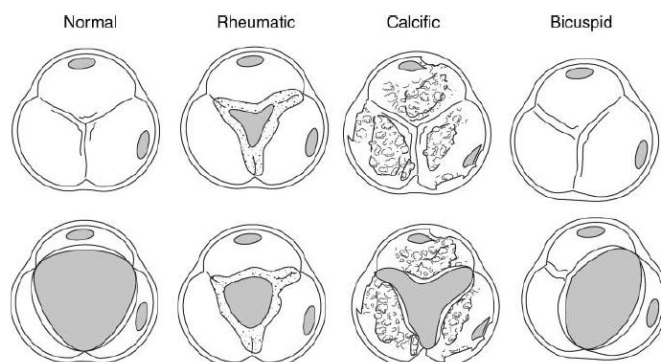


Figura III. Estenosis aórtica y Etiología. De izquierda a derecha, morfología de la válvula aórtica normal, válvula estenótica de etiología reumática, estenótica calcificada y bicúspide. Imagen tomada de [18].

Cuando el paciente no tiene síntomas de gravedad, el tratamiento médico se basa en restringir progresivamente la actividad física acorde avanza la enfermedad. El tratamiento actual ante esta enfermedad es el tratamiento quirúrgico, mediante cirugía de remplazo de la válvula aórtica, pudiendo ser éstas prótesis mecánicas uni o bivalvas, o válvulas prostéticas biológicas [10,13]. Sin embargo, en pacientes de muy avanzada edad, donde pueden darse complicaciones quirúrgicas, se plantean otras alternativas no quirúrgicas, como la valvulotomía con balón o el remplazo valvular aórtico transcatóter (vía femoral o transapical) [19,20].

Dadas las similitudes fisiopatológicas entre la estenosis aórtica y la aterosclerosis, una de las primeras estrategias farmacológicas para combatir la enfermedad fue el empleo de estatinas, y también se probaron inhibidores de la cascada de señalización Renina/Angiotensina, Bifosfonatos y bloqueadores de la Aldosterona, siendo los resultados desalentadores en todos los casos [13,21-26].

1.2.2 Patogenia de la estenosis aórtica.

De etiología sistémica, en esta enfermedad cursan fenómenos de inflamación local crónica, calcificación activa, remodelación de la Matriz Extracelular y participación de metaloproteínas de la misma, así como la activación del sistema Renina/Angiotensina, la participación de mediadores de las vías pro-osteogénicas y la acumulación de lípidos [8].

En los estadios iniciales de la enfermedad se da una disfunción endotelial de la válvula aórtica generada por las grandes presiones que ésta soporta, causa de la irregularidad del flujo sanguíneo, predisponiéndola a sufrir una lesión tisular y, por ende, a un proceso inflamatorio. Además, se va a producir una activación de las células intersticiales debido a la acumulación de lípidos en disposición paralela a las fibras de colágeno, a las bacterias Gram Negativas, como la *C. pneumoniae*, y al incremento de citoquinas [5,14,15,27]. La alteración de la capa endotelial deja sin protección a la matriz extracelular.

Uno de los procesos claves en la enfermedad es la posterior remodelación de la matriz extracelular que conduce a la fibrosis. En su estado avanzado se produce además angiogénesis, pues el engrosamiento de la válvula impide que las necesidades del tejido puedan ser satisfechas por difusión, entrando en situación de hipoxia y, por ende,

expresándose el *Factor de Crecimiento de los Vasos* (VEGF), pudiendo jugar un importante papel en la remodelación de la válvula aórtica y la calcificación al facilitar el paso de mediadores implicados en ambos procesos [8,28]. También tiene lugar la acumulación de depósitos de calcio, dando lugar a procesos osteogénicos [2,5,8,14-17]. La lesión inicial de calcificación de la válvula aórtica parece involucrar un proceso activo similar al de la aterosclerosis, incluyendo la deposición de lípidos, infiltración de macrófagos y la producción de osteopontina y otras proteínas [5,8,10,15-17].

1.2.2.1 Inflamación y estenosis aórtica.

Tanto la capa fibrosa en contacto con la aorta, como la superficie de la capa valvular, están recubiertas por una monocapa de células endoteliales [2-9]. La pérdida de la función normal del endotelio, como ocurre en procesos inflamatorios, conlleva a una pérdida de la permeabilidad selectiva, efectos que pueden ser debidos a la hipercolesterolemia, diabetes, tabaco, que son factores de riesgo comunes tanto para la aterosclerosis como para la estenosis aórtica [2,5,8,9,14,15]. A continuación se describen aspectos generales del proceso inflamatorio

- 1) **Inflamación:** La respuesta inflamatoria surge con el fin defensivo de aislar y destruir el agente dañino, así como reparar el tejido y órgano dañado [29]. Además de los cuatro parámetros clásicos que describen la inflamación, que son el *Rubor*, *Calor*, *Tumefacción* y *Dolor*, también ocurre la *pérdida o disminución tisular* y la *infiltración de leucocitos* [5,29,30]. Así, un aumento en el Ca^{2+} citoplasmático en las células endoteliales activa la síntesis de NO, provocando una vasodilatación de los vasos sanguíneos que produce un aumento del flujo sanguíneo (*Rubor*) y, por ende, un aumento del consumo de oxígeno que conlleva a un aumento de la temperatura en ese punto (*Calor*) [1,9,30-32]. Se aumenta la extravasación del plasma y el paso de inmunoglobulinas, produciendo la hinchazón de la zona afectada (*Tumefacción* y *Dolor*) [9,30-32]. El daño tisular va a promover que las células endoteliales sobreexpresen citoquinas y receptores a ciertas citoquinas, así como la expresión en la superficie de la membrana plasmática de moléculas de adhesión, como ICAM-1, las cuales regulan la infiltración de diferentes células inmunes hacia el foco inflamatorio, que son atraídas por factores quimiotácticos, como la *Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1* (MCP-1) [5,8,9,30-32] (Figura IV).
- 2) **Mediadores de la inflamación** [9,30]:
 - **Mediadores lipídicos:** Pro-inflamatorios como metabolitos del ácido araquidónico (Como las prostaglandinas, en cuya síntesis interviene la Ciclooxygenasa 2 (COX2)), y antiinflamatorios como resolvina y protectinas.
 - **Aminas vasoactivas**, como histamina y serotonina.
 - **Citoquinas** proinflamatorias (IL-6, TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10, TGF- β).
 - **NO y Especies Reactivas del Oxígeno** (ROS).
 - **Moléculas de adhesión** como ICAM-1 y VCAM-1.
 - **Receptores:** Entre los receptores implicados en inflamación destacan los tipo toll (TLRs), pues su activación promueve cascadas pro-inflamatorias. Los TLRs pertenecen al grupo de *Receptores de Reconocimiento de Patrones* (PRRs), pues reconocen tanto *Patrones Moleculares Asociados a Patógenos* (PAMPs), que son motivos altamente conservados en los patógenos dado que son necesarios para la virulencia o supervivencia de los mismos, como *Patrones Moleculares Asociados a Daño Tisular* (DAMPs), que son patrones moleculares endógenos liberados por el propio huésped y que están relacionados con el daño o muerte tisular, procedentes de lesiones tisulares, necrosis, apoptosis, daño de la matriz extracelular o de lipoproteínas oxidadas [27,30].

- 3) **Regulación del proceso de inflamación. Inflamación crónica:** La inflamación tiene que detenerse una vez se haya reparado el daño que la provocó, para así evitar entrar en una situación de inflamación crónica, lo que con el tiempo conllevaría a diversas patologías. Para ello existen diversos mecanismos, como la liberación de citoquinas antiinflamatorias y la producción de mediadores lipídicos antiinflamatorios [9,27,30,32]. En casos de inflamación crónica se produce un comportamiento anómalo de las células de la inmunidad innata que activan la respuesta inmune adaptativa [27,28,30,32], y una intensa expresión angiogénica, pues está ligada a la proliferación, migración y reclutamiento de las células inflamatorias al tejido dañado [14,28,30].

En los estadios iniciales de la estenosis aórtica ocurren procesos inflamatorios como los descritos y se liberan mediadores inflamatorios. Así, la válvula aórtica sana está desprovista de células inflamatorias, siendo la presencia de estas indicativa de procesos inflamatorios crónicos. Por otra parte, la liberación de citocinas por estas células inmunes, tales como TNF- α o la *Proteína Morfogénica Ósea 2* (BMP2), podrían activar a las células intersticiales y así transdiferenciarse hacia miofibroblastos, que contribuyen a la remodelación de la Matriz Extracelular (Figura IV). El TNF- α secretado por los macrófagos, ya sea mediante estimulación con *Lipoproteínas de Baja Densidad* (LDL), daño de la matriz extracelular o infección bacteriana, también regula la expresión y activación de Metaloproteinasas de la Matriz en las AVIC activadas, regulando así la remodelación de la matriz extracelular [37].

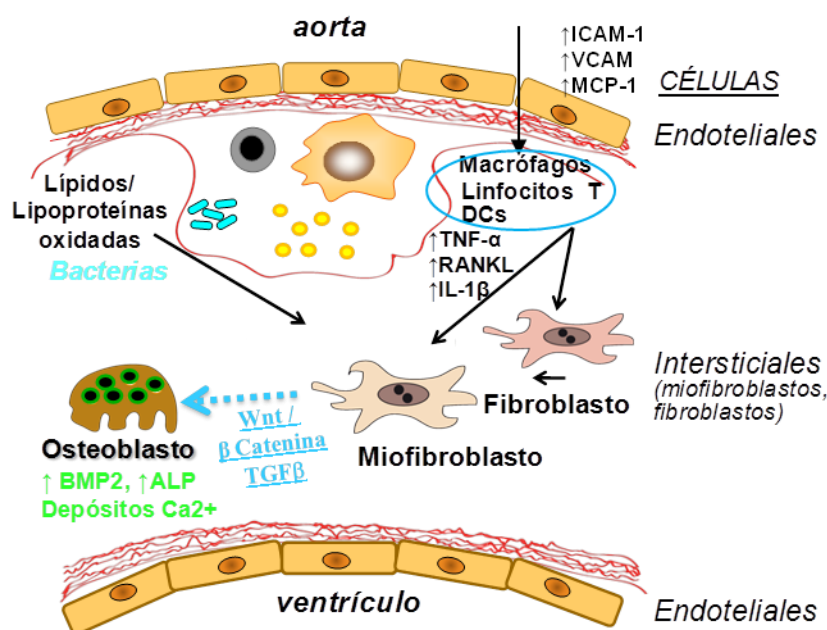


Figura IV. Mecanismos de la patología de la Estenosis aórtica. Basada en [8,16].

A este proceso inflamatorio contribuyen factores tales como el depósito y oxidación de las LDL, provocando el engrosamiento valvular, acumulación de masas irregulares fibrocalcificadas, interrupción de la membrana basal, desorganización de las fibras de colágeno e la infiltración de células inmunes (Figura IV), lo que va a generar fibrosis y osteogénesis activa en ese punto de la capa fibrosa valvular, momento en el que la enfermedad se hace detectable [2,3,5,6,8,9,14,15]. Esto se debe a que el LDL es atrapado y sufre oxidación, siendo entonces capaz de inducir la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) y quimiotácticas en células intersticiales, permitiendo la infiltración de células inmunes al foco inflamatorio [14]. De hecho, se ha encontrado que el LDL oxidado colocaliza con Linfocitos T infiltrados y con depósitos de calcio en las válvulas estenóticas [8].

En cuanto a receptores de la inmunidad innata que se han asociado recientemente a la patogenia de la estenosis aórtica, están los TLRs. En concreto, las células AVIC expresan todos los TLRs, siendo el TLR4 el más abundante, estando aumentada su expresión en las células AVIC estenóticas [33-36]. La estimulación *in vitro* de células AVIC activa los receptores TLR2, 3 y 4, aumentando así la expresión de mediadores pro-inflamatorios como IL-8, MCP-1, y angiogénicos como VEGF, e incluso marcadores pro-osteogénicos como BMP2. Por ejemplo, se ha observado que la activación de TLR3 de células AVIC controles por Poly I:C induce la producción de NF- κ B que induce las mismas citoquinas pro-inflamatorias que TLR4, así como la calcificación [34]. Otro ejemplo sería la activación de TLR4 por LDLs oxidadas [7,34]. Incluso, se han observado interacciones entre los receptores de esfingosina 1 fosfato, lípido bioactivo involucrado en la patofisiología vascular, y la señalización del TLR4, promoviendo una regulación positiva de las vías inflamatoria, angiogénica y osteogénica en células AVIC, que podría ser relevante en la estenosis aórtica [34].

1.2.2.2 Fibrosis y calcificación.

1.2.2.2.1 Remodelación de matriz extracelular (que conduce a fibrosis)

Una vez finalizadas las tareas de remodelación de la matriz extracelular, los miofibroblastos deberían entrar en apoptosis. Sin embargo, en la estenosis aórtica el ciclo celular de estas células no está regulado correctamente, por lo que estos miofibroblastos sintetizan continuamente matriz extracelular [5,7,8]. Además, las AVIC activadas y las células inflamatorias secretan varias metaloproteinasas de la matriz y catepsinas, que pueden destruir progresivamente la estructura de colágeno/elastina de la Matriz Extracelular [2]. Así, el incremento de miofibroblastos produce un aumento de la expresión de colágeno, degradación de elastina y acumulación de los componentes de la Matriz Extracelular, lo que conlleva a la diferenciación fibrótica y osteogénica, lo que implica fibrosis progresiva y rigidez de las valvas que conlleva a la estenosis [5,7].

1.2.2.2.2 Calcificación y osteogénesis.

Se sabe que las áreas de mayor estrés mecánico corresponden con las áreas de calcificación [5]. Ésta contribuye a la fibrosis, la rigidez y la obstrucción severa de la luz valvular [8]. Hay estudios que evidencian que la calcificación de la válvula aórtica podría seguir dos posibles mecanismos no excluyentes entre sí:

- i) Calcificación distrófica: Proceso pasivo por el cual, sobre núcleos de calcio preformados por restos apoptóticos y fragmentos celulares cuyo origen es el tejido fibrótico, se forman cristales de fosfato cálcico embebido en fibras de colágeno.
- ii) Diferenciación osteobástica: Proceso activo por el cual se forman y desarrollan núcleos de matriz mineralizada formado por fosfato cálcico, teniendo como resultado una transdiferenciación de los miofibroblastos hacia un fenotipo osteobástico.

Recientes evidencias apoyarían la participación de mecanismos moleculares, entre ellos a la inflamación, en el desarrollo de la calcificación. En válvulas cardíacas estenóticas se han detectado niveles elevados de mediadores pro-osteogénicos, tales como BMP2 [8,23]. La expresión de BMP2 se ve además aumentada por la presencia de agentes pro-inflamatorios como la endotoxina o Lipopolisacárido (LPS) y por LDL [36]. El aumento en los niveles del *Receptor de LDL relacionado con proteína 5* (Lrp5) e incrementos asociados en la acumulación nuclear de β -Catenina se observan en válvulas humanas con estenosis aórtica calcificada. Se ha observado que el mediador inflamatorio TNF- β acelera la calcificación [5,9,38,39] (Figura IV). Hay evidencias experimentales que relacionan la inflamación con la calcificación. En concreto, los TLRs se han relacionado con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis [40], y más recientemente con la estenosis aórtica [33,34,36] y la osteogénesis en AVIC [33,34].

1.3 Proteínas de la superfamilia del colágeno: colágeno XIII.

1.3.1 Superfamilia del colágeno.

Los colágenos son una familia de proteínas que constituyen hasta una tercera parte del contenido proteico en mamíferos, siendo el principal componente de muchos tejidos del cuerpo humano, por ejemplo, del 12-14% de la aorta. En los vertebrados, la superfamilia de los colágenos está constituida por más de 20 diferentes tipos, habiendo más de 30 cadenas polipeptídicas genéticamente distintas. Son proteínas homo y heterotriméricas constituidas por tres cadenas polipeptídicas levógiras denominadas cadenas α que se asocian entre sí formando una triple hélice dextrógira. La secuencia de aminoácidos es característica por tener repeticiones del triplete glicocola-X-Y, imprescindible en la formación de la triple hélice y resistentes a la degradación por proteasas comunes, pero no a colagenasas específicas. En los colágenos que no forman fibras, la estructura en triple hélice está interrumpida por regiones denominadas *No Colagenosas*, pudiendo ser desde dominios globulares hasta pequeñas regiones donde la secuencia triplete característica no se repita o esté alterada, las cuales le confiere flexibilidad, siendo estas zonas sensibles al ataque proteolítico [41,42].

1.3.2 Estructura, localización y función del colágeno XIII.

El colágeno XIII es una proteína transmembrana tipo II que pertenece a la superfamilia de las proteínas del colágeno, en concreto, pertenece a la subfamilia de colágenos asociados a membrana, junto con sus homólogos colágeno XXIII y XXV. Posee un corto dominio citoplasmático y un largo dominio extracelular, así como un dominio transmembrana (Figura V). El dominio extracelular puede escindirse y pasar a formar parte de la matriz extracelular. Esta escisión puede seguir una vía intracelular, escindiéndose en el aparato de Golgi y secretándose al medio extracelular por transporte vesicular, o una vía proteolítica en la membrana plasmática, regulado por la propia membrana según esta proteína se encuentre o no en las balsas lipídicas ricas en colesterol. Según el tipo celular, se encontrarán proporciones diferentes de la forma transmembrana y escindida [41,42].

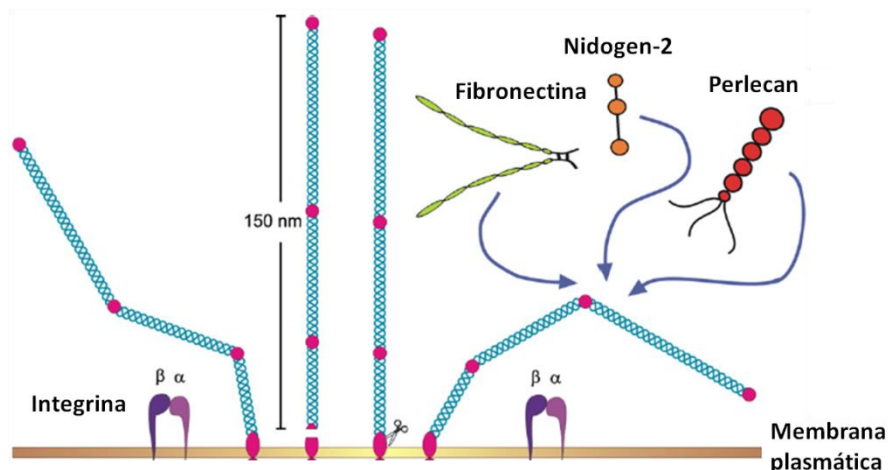


Figura V. Esquema del colágeno XIII e interacción con sus ligandos. Imagen tomada de [41].

Fundamentalmente, el colágeno XIII se expresa en tejidos mesenquimales. Por ello, puede encontrarse asociado a la membrana basal en casi todos los tejidos. Los dominios transmembrana y soluble del colágeno XIII se les atribuye papeles diferentes. A parte de un papel estructural como molécula de adhesión en el establecimiento de interacciones Matriz-Célula y Célula-Célula, el colágeno XIII juega un papel funcional en el desarrollo, maduración y diferenciación de tejidos musculoesqueléticos y vasculares, así como en el mantenimiento de la integridad de los tejidos. Por un lado, al ectodominio del colágeno XIII se le atribuyen propiedades antiadhesivas, antimigratorias, antiproliferativas, interacciones moderadas con proteínas de la matriz extracelular como vitronectina y colágeno IV, de alta

afinidad con fibronectina, Nidogen-2 y Perlecano, e incluso interacciones con Receptores de la superficie celular como $\alpha 1\beta 1$ integrina (Figura V) [41,42].

Aunque hay pocos estudios sobre la función del colágeno XIII si se ha descrito su asociación con patologías como el cáncer, donde podría actuar en el desarrollo del mismo, y diferentes enfermedades autoinmunes y vasculares [41]. Además, el colágeno XIII participaría en la regulación de la masa ósea [41]. Entre las funciones atribuidas al colágeno XIII, se ha descrito que también afecta a nivel del sistema inmune, pues induce la expresión de genes de respuesta inmune [41].

1.3.3 Colágeno XIII y estenosis aórtica.

Las fibras de colágeno están presentes en la capa fibrosa y ventricular de la válvula aórtica (Tabla I) [2,3,5,6]. Se le ha relacionado con la remodelación de la Matriz Extracelular, en la cual se encuentran inmersas las células intersticiales o AVIC [8,9,42]. Estudios realizados en el laboratorio y no publicados asocian a la estenosis aórtica con colágeno XIII, un gen no relacionado previamente con dicha enfermedad. En concreto, en análisis genómico completo de células AVIC mediante *microarrays*, se observó una mayor expresión del gen *col13a1*, que codifica para colágeno XIII, en células AVIC estenóticas respecto de las controles. Esto no es de extrañar, pues la expresión de colágeno XIII se ve aumentada bajo ciertas condiciones patológicas, como el cáncer, donde podría actuar contra el desarrollo del mismo, y diferentes enfermedades autoinmunes y vasculares [41]. Un aspecto interesante es que hay evidencias de que el colágeno XIII participaría en la regulación de la masa ósea, y se puede especular que podría participar en el proceso de diferenciación osteoblástica que tiene lugar en la enfermedad de la estenosis aórtica. También está relacionado con moléculas implicadas en la remodelación de la Matriz Extracelular, como la colagenasa MMP1, enzima que se ha asociado a la patología de la estenosis aórtica [8].

2 Objetivos.

El hecho de que el análisis del genoma completo de células AVIC mostrara una mayor expresión del gen *col13a1* en células AVIC estenóticas respecto de las células AVIC controles, nos llevó a estudiar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en células AVIC Control. Los objetivos concretos fueron:

- 1) Puesta a punto de la sobreexpresión de colágeno XIII en AVIC mediante dos técnicas de transfección transitoria.
- 2) Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de genes pro-inflamatorios en AVIC.

3 Materiales.

3.1 Cultivo celular.

- **Medio de cultivo de células AVIC:** Medio M199 (L-glutamina, NaHCO_3 1,25 g/L), suplementado con 10 % suero de ternera fetal inactivo (FBSi), antibiótico (Pencilina, Estreptomicina), antimicótico (Anfotericina B).
- Tripsina-EDTA (*InvitroGen, Carlsbad, CA, USA*).

3.2 Preparación de Plásmidos y transfección transitoria.

- Plásmidos cedidos por el grupo de investigación de la Dra. Pihlajaniemi de la Universidad de Oulu, Finlandia. Los plásmidos contienen el vector *pcDNA3.1TM/Hygro(+)* que tiene un promotor de citomegalovirus con resistencia a ampicilina (selección bacteriana), y a higromicina (selección celular).

- **pcDNA3.1/Hygro(+)/huColXIII-EGFP (en adelante abreviado como pc3.1-ColXIII-EGFP)**: Expresa colágeno XIII humano fusionado a la proteína EGFP, proteína fluorescente que sirve para estimar la eficiencia de transfección.
 - **pcDNA3.1/Hygro(+)/EGFP (en adelante pc3.1-EGFP)**: Expresa EGFP. Se utiliza como control del efecto del pc3.1-ColXIII-EGFP.
 - **pcDNA3.1/Hygro(+)/huColXIII (en adelante pc3.1-ColXIII)**: Expresa colágeno XIII. Se utiliza alternativamente para estudiar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII .
 - **pcDNA3.1/Hygro(+)** (en adelante **pc3.1**): Se utiliza como control del efecto del pc3.1-ColXIII.
- Plásmido comercial
 - **p-Max**: Expresa EGFP. Se utiliza como control del efecto de la expresión de EGFP.
 - **Medio de cultivo bacteriano** (400 mL) : 55g de Bactotripton, 2 g de extracto de levadura, 4 g de NaCl 400 mL agua MilliQ.
 - **Placas de LB Agar** (400 mL de Medio): placas petri con medio LB con agar (8 g agar noble).
 - **SOC estéril**: 2g de Bactotripton, 0,5 g de Extracto de Levadura, 200 µL de NaCl 5M, 250 µL de KCl 1M, 97 mL de Agua MilliQ 2 mL de Mg²⁺ 2M, 1 mL de Glucosa 2M, pH 7,0. Una vez disuelta la solución se esterilizó por filtración (0.2 µm).
 - MAXI-PREP (*QIAGEN Endofree Plasmid Maxi Kit*).
 - Lipofectamine™ 2000 (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*). (**En adelante abreviado como Lipofectamina**)
 - Turbofectin 8.0 (*OriGene Technologies, Rockville, MD, USA*). (**En adelante abreviado como Turbofectin**)
 - Opti-MEM® (*Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
 - Enzimas de restricción para el análisis de plásmidos: *Hind III* y *Xho I* (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*)

3.3 Lisado celular.

- **Tampón de Lisis (por mL)**: 1 mL de TNE (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, NP40 (Nonidet P40 Substitute) al 0,01%), *inhibidores de Proteasas* (4 µL de PMSF 250 mM, Aprotinina 10 mg/mL, 1 µL de Leupeptina 10 mg/mL) e *inhibidores de fosfatasa* (5 µL de Na₃VO₄ 200 mM, 10 µL NaF 500 mM).
- **Tampón fosfato alcalino (PBS)**: NaCl 154 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,9 mM, pH 7,4.

3.4 Western Blot.

- Geles de poliacrilamida:
 - **Disolución "Running" al 10%**: 30% acrilamida/bis acrilamida (*BioRad, Hercules, CA, USA*), Tris-HCl 1,5 mM, 10% SDS, TEMED (*Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA*), pH 8,8.
 - **Disolución "Stacking" al 5%**: 30% acrilamida/bis acrilamida, Tris-HCl 0,5 mM, 10%SDS, TEMED, pH 6,8.
- Marcador de Peso Molecular: *Spectra Multicolor* (*Fermentas, Burlington, Ontario*).
- **Tampón de Laemmli 5X** (36,5 mL volumen final): 12,5 mL de Tris 1M, 20 mL de Glicerol, 4 g de SDS sólido, 4 mg de Azul de Bromofenol y 4 mL de DTT 1M.
- Membrana de transferencia: fluoruro de polivinilideno o PVDF (*Westran Clear Sigma, Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*).
- Tampón de electroforesis: Tris hidroximetil aminometano 25mM, Glicina 192 mM, SDS al 1% (p/v), pH 8,3.
- Tampón de transferencia: Tris 25mM, Glicina 192 mM, SDS al 0,03%, metanol al 20%, pH 6,8.

- Disoluciones de lavado de membranas de *Western Blot* o **TTBS**: Tris-HCl 10 mM, NaCl 135 mM, Tween al 0,05% (v/v), pH 7.6. En el caso de COX2 se usa TTBS con 0,1% de Tween.
- Disolución de revelado: Kit de Quimioluminiscencia *ECL Western Blotting* (Pierce, Waltham, MA, USA).

3.5 Anticuerpos:

Tabla III. Anticuerpos.

Anticuerpo	Obtenido	Dilución	Diluido en	Marca
Anti-Colágeno XIII α 1 humano	Oveja	1:200	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo y 0,02% de azida sódica	R&D System
Anti β -Tubulina-1 humana	Ratón	1:20000	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo y 0,02% de azida sódica	Sigma Aldrich
Anti-ICAM-1 humano	Cabra	1:500	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo y 0,02% de azida sódica	Santa Cruz BioTechnology
Anti-COX2 humana	Conejo	1:1000	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo y 0,02% de azida	Santa Cruz BioTechnology
IgG anti-oveja, conjugada con peroxidasa de rábano (HRP)	Conejo	1:2000	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo	Thermo Scientific
IgG-HRP anti-ratón	Cabra	1:2000	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo	BioRad
IgG-HRP anti-cabra	Burro	1:1000	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo	Santa Cruz BioTechnology
IgG-HRP anti-conejo	Burro	1:2000	TTBS, 3% de leche desnatada en polvo	Amersham Bioscience

4 Métodos.

4.1 Cultivo y recuento Celular.

Las células empleadas en el presente estudio proceden de pacientes intervenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, y son parte de un proyecto aprobado por el Comité de investigación y ética de dicho hospital.

- **Células Intersticiales de Válvula Aórtica (AVIC) controles:** Aisladas de la válvula aórtica de pacientes receptores de trasplante cardiaco sin enfermedad valvular.

Las células, previamente aisladas de sus respectivas válvulas, se cultivan en medio de cultivo de AVIC en un incubador a 37 °C con 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad, como se ha descrito en [34,36]. Cada cuatro días, aproximadamente, el medio de cultivo es renovado y, cuando la confluencia de los pocillos es de entre el 70-90 %, se hacen pases de dichas células y se siembran sobre nuevas placas de cultivo. Para los experimentos de transfección transitoria, las confluencias óptimas de los pocillos se encuentran en \approx 65% para los experimentos llevados a cabo con Turbofectin 8.0 y en \approx 90% para los experimentos llevados a cabo con Lipofectamina 2000.

El recuento celular se realiza bien de forma manual (Cámara *Malassez*) o de forma instrumental (Roche CASY® Cell Counter, que estima el número de células detectando campos eléctricos), calculando las células por mL de la suspensión celular.

4.2 Preparación y amplificación de los plásmidos.

4.2.1 Transformación de bacterias.

4.2.1.1 Transformación de las bacterias por choque térmico.

Mediante un método de choque térmico se introduce el plásmido en bacterias competentes, que en el presente trabajo han sido DH5 α y XL1 blue, ambas cepas de *E. coli*. Procedimiento: **i)** Se incuba el plásmido (0,01-1 μ g) con 50-100 μ L de las bacterias competentes durante 20 minutos en hielo. **ii)** Choque térmico en un baño a 42 $^{\circ}$ C durante 40 segundos, seguido de incubación en hielo durante 2 minutos. **iii)** Se añaden 200 μ L de SOC, cuatro veces el volumen de las bacterias, en condiciones de esterilidad. **iv)** Se incuban a 37 $^{\circ}$ C durante 1 hora, tiempo necesario para adquirir la resistencia al antibiótico. **v)** Se añaden 200 μ L del cultivo bacteriano sobre una placa de agar con el antibiótico de selección, en este caso ampicilina, repartiéndolo homogéneamente por la superficie con ayuda de una pipeta Pasteur previamente moldeada a fuego, y se deja secar durante unos minutos. **vi)** Se incuba la placa con las bacterias a 37 $^{\circ}$ C durante toda la noche.

4.2.1.2 Cultivo bacteriano.

Las colonias bacterianas seleccionadas se inoculan en un matraz con medio LB estéril suplementado con ampicilina 50-100 μ g/mL. Se incuba a 37 $^{\circ}$ C y 300 r.p.m. entre 12-16 horas. Se recogen las bacterias transformadas y posteriormente se extrae el DNA.

4.2.1.3 Extracción, purificación y digestión de plásmidos.

La extracción y purificación de DNA se realizó con el kit comercial *QIAGEN Endofree® Plasmid Maxi Kit* que usa un método de separación mediante una resina de intercambio aniónico para aislar DNA libre de endotoxinas, para lo que se siguió el protocolo provisto con dicho kit. Una vez extraído el DNA, se midió su concentración y su pureza en un espectrofotómetro *NanoDrop (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA)*, utilizando el programa DNA1, $\lambda=260$ y 280 nm, donde la proporción óptima que indica pureza será $A_{260}/A_{280} = [1.8 - 2]$.

Posteriormente, se llevó a cabo una digestión del DNA obtenido con dos enzimas de restricción, *Hind* III y *Xho* I, y posterior separación en un gel de agarosa al 1% teñido con Red Safe, con el fin de comprobar que el DNA extraído contiene el plásmido de interés, así como que no se ha extraído DNA genómico (Figura VI). Se observan otras bandas, especialmente en la Figura VIb, que pueden explicarse porque *Hind* III puede reconocer y cortar secuencias similares al sitio canónico (“*star activity*”).

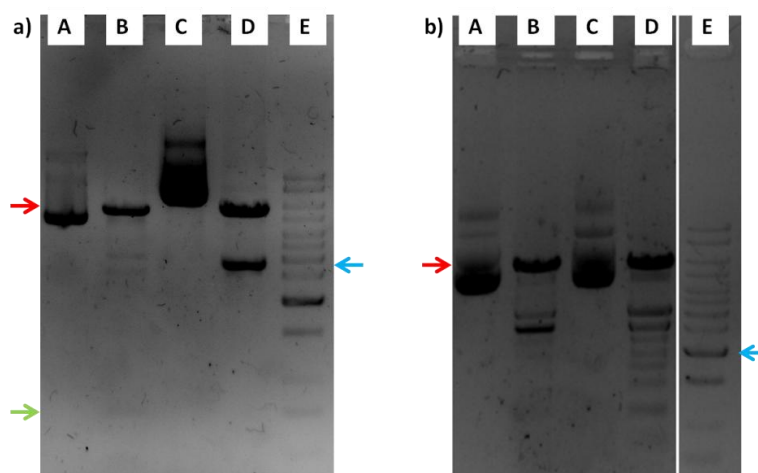


Figura VI. Digestión de plásmidos con *Hind* III y *Xho* I. Imágenes de geles de agarosa. **a)** Plásmidos con EGFP A) pc3.1-EGFP Sin digerir, B) pc3.1-EGFP Digerido, C) pc3.1-ColXIII-EGFP sin digerir, D) pc3.1-ColXIII-EGFP digerido, E) Marcador de DNA. **b)** Plásmidos Sin EGFP A) pc3.1 Sin digerir, B) pc3.1 Digerido, C) pc3.1-ColXIII sin digerir, D) pc3.1-ColXIII digeridos, E) Marcador de DNA. *Flecha roja:* pc3.1 (5.6 kb); *Flecha Verde:* DNA de EGFP (0.7 kb). *Flecha Azul:* DNA de a) colágeno XIII-EGFP (2.7 kb), b) colágeno XIII (2 kb).

4.3 Métodos de Transfección Transitoria.

La transfección transitoria se llevó a cabo en células AVIC controles usando reactivos comerciales y poniendo a punto los métodos en nuestro modelo celular.

4.3.1 Transfección con Lipofectamina.

Se llevó a cabo usando el reactivo comercial Lipofectamina como se ha descrito en [17] y se puso a punto el método usando distintas proporciones de DNA: Lipofectamina. El procedimiento a seguir fue el recomendado por el fabricante: **i)** Un día previo a la transfección se plaquean, aproximadamente, 50.000 células por pocillo en placas 12 pocillos. **ii)** Al día siguiente, una hora antes de llevarse a cabo la transfección, se hace un cambio de medio por 0,5 mL de M199 suplementado con 10% FBSi y sin antibiótico. **iii)** Se diluye el DNA con Opti-MEM® en un Volumen final de 50 µL (Dilución B) y se mezcla suavemente. **iv)** Se diluyen 2µL de Lipofectamina con Opti-MEM® para un volumen final de 50 µL (Dilución B). Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. **v)** Tras los 5 minutos de incubación de la Dilución B, se mezclan las diluciones A y B entre ellas y se incuba durante 20 minutos a 37 °C. **iv)** La mezcla DNA:Lipofectamina se añadió gota a gota sobre las células. **v)** Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. **vi)** Transcurridas 6 horas tras la transfección, se sustituye el medio por 0,5 mL de Medio de cultivo de células AVIC.

4.3.2 Transfección con Turbofectin.

Se llevó a cabo usando el reactivo comercial Turbofectin como se ha descrito en [43], usando distintas proporciones de DNA:Turbofectin. El procedimiento a seguir fue el recomendado por el fabricante: **i)** Se plaquean las células un día previo a la transfección sobre placas de cultivo de 12 pocillos de tal forma que al día siguiente se tenga una confluencia de entre el 50-70%. **ii)** Una hora antes de que se lleve a cabo la transfección se cambia el medio de cultivo de las células por 1 mL de medio de cultivo completo. **iii)** Para la formación del complejo se añaden, en un tubo Eppendorf por muestra, 50 µL de Medio M199 sin suero y sobre ello 3 µL de Turbofectin 8.0 (Tubo A), mezclando suavemente por pipeteo. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se añaden 3 µg del plásmido, mezclándolo suavemente por pipeteo e incubando 30 minutos a temperatura ambiente. **iv)** Se añade la mezcla sobre las células, balanceando la placa para distribuir homogéneamente el complejo. **v)** Las células se incuban a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. **vi)** Transcurridas 24 horas se cambia el medio de las muestras por 0,5 mL de Medio de cultivo de células AVIC.

4.4 Eficiencia de la transfección transitoria.

En el caso de los plásmidos que expresan la proteína fluorescente EGFP, es posible estimar la eficiencia de transfección mediante imagen de fluorescencia analizando varias imágenes de cada pocillo de forma aleatoria, y haciendo un recuento, con ayuda del Software *Image J*, tanto de las células totales (imagen en campo claro) como de las que emiten fluorescencia (imagen de fluorescencia).

4.5 Obtención de Sobrenadantes y Lisados celulares.

Las células transfectadas durante el tiempo que se indique en cada caso, se analizaron mediante *Western Blot*, para ello se recogieron dos tipos de muestras:

a) Sobrenadantes: Se recoge el medio (0,5 mL) de cada pocillo y se guarda a -20°C hasta su uso.

b) Extractos celulares: Tras recoger los sobrenadantes, las muestras se procesan en hielo. **i)** Cada pocillo se lava con PBS frío. **ii)** Se retira el PBS y se añaden, por pocillo, 50 µL del *Tampón de Lisis*. **iii)** Con una espátula de plástico se rasca cada pocillo, y se transfiere el lisado celular a un tubo Eppendorf. **iv)** Se centrifugan los tubos durante 10 minutos a 16000 x g en una mini-centrífuga refrigerada. **v)** Se recoge el sobrenadante, que contiene el lisado celular, y se desecha el precipitado. **vii)** Los lisados se guardan a -80°C hasta su uso.

4.6 Western Blot.

4.6.1 Preparación de las muestras.

La preparación de las muestras de *Western Blot* incluye:

- i) **Extractos:** Se mezclan el volumen total recogido ($\approx 50\mu\text{L}$) y $12.5\mu\text{L}$ de *Tampón de Laemmli 5X*.
- ii) **Sobrenadantes:** Se mezclan $50\mu\text{L}$ del sobrenadante (de un total de $0,5\text{ mL}$ de medio) y $12.5\mu\text{L}$ de *Tampón de Laemmli 5X*.

4.6.2 Electroforesis y Transferencia.

Las muestras se hierven en un bloque térmico a 100°C y durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. A continuación, se lleva a cabo una electroforesis por el método SDS-PAGE 10% aplicando una intensidad de 25 mA por gel. A continuación se procede a realizar la transferencia a una membrana de PVDF. Los parámetros de la fuente de alimentación son, 200 V constante durante 2 horas.

4.6.3 Bloqueo.

Para evitar las uniones inespecíficas se incuban las membranas con TTBS (TBS-Tween 0.05%) y 5% de leche desnatada en polvo a temperatura ambiente durante 1 hora y con agitación.

4.6.4 Incubación con Anticuerpo primario y secundario.

Las membranas se incuban con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche y en agitación. A continuación se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS. Después se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado a HRP. Finalmente se realizan 3 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno.

4.6.5 Detección de las proteínas.

Las membranas se recubren con la mezcla a partes iguales de los reactivos 1 y 2 del kit de quimioluminiscencia *ECL* durante 1 minuto. Se introduce la película de autorradiografía en una máquina de revelado fotográfico (Curix 60 Agfa). Una vez reveladas, las películas se escanean para digitalizarlas en un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, BioRad) y se analizan con el programa *QuantityOne* (Bio-Rad). Para obtener los valores de las densidades ópticas (DO) de cada banda, se multiplica el valor DO/mm^2 por el área del cuadro de selección. Para corregir las variaciones de las diferentes señales debidas a las diferencias de carga, los valores de DO de cada banda se normalizan frente a sus correspondientes valores de β -Tubulina.

4.7 Análisis de Datos

El análisis estadístico de los datos se realizó en base a métodos descritos: [44-47].

4.7.1 Estimación de la eficiencia de la Transfección.

Dado el elevado número de células no es posible conocer la "Eficiencia de Transfección Poblacional", siendo necesario estimarla obteniendo la "Eficiencia de Transfección Muestral". En primer lugar, para evitar sesgos es necesario tomar varias imágenes de cada pocillo de forma aleatoria; y con ayuda del Software *Image J* se hace un recuento tanto de las células totales de las imágenes en campo claro como de las que emiten fluorescencia. A continuación se estima el "porcentaje de Eficiencia de Transfección" para cada Proporción DNA: Reactivo de Transfección mediante la siguiente fórmula:

$$\%Eficiencia = \frac{Células\ Fluorescentes}{Células\ Totales} \cdot 100$$

Como la "Eficiencia de Transfección" es un porcentaje, la Fluorescencia es la variable aleatoria dicotómica en estudio cuya distribución depende del parámetro de localización desconocido "Eficiencia de Transfección", por lo que ésta variable sigue una distribución

Binomial. Así, el cálculo de los intervalos de confianza (I) se realiza aplicando la siguiente fórmula:

$$I = \left[\%Eficiencia \pm 1,96 \sqrt{\frac{\%Eficiencia(1 - \%Eficiencia)}{n}} \right]$$

Así, el intervalo de confianza obtenido cubre el verdadero y desconocido valor del parámetro poblacional "Eficiencia de Transfección" con un nivel de confianza del 95%.

4.7.2 Diseño Estadístico de Experimentos.

Para que las conclusiones extraídas de un experimento sean correctas es necesario identificar de antemano qué diferentes *variables o factores* influyen sobre el resultado del experimento. Se pueden distinguir entre *Variables o Factores Controlados* (en nuestro caso el *Método de Transfección*, el *Plásmido*, y el *Tiempo tras la transfección*), e *Incontrolados o ruido* (tales como la variabilidad de los cultivos primarios, la *Presión*, la *Humedad* o la *Temperatura ambiental*). Además, un factor puede tomar diferentes valores, denominados **niveles** o **tratamientos**, ej. el *Tiempo Transcurrido Tras la Transfección*, y sus correspondientes niveles 24, 48, 72 y 96 horas.

El método tradicional de experimentación es el de *Variar Un Factor Cada Vez*, basado en alterar un factor manteniendo los demás constantes, repitiendo el proceso para cada factor, lo que permite atribuir la variación de la respuesta a la del factor en estudio, pero no permite evaluar la interacción¹ entre diferentes factores ni encontrar el valor óptimo de respuesta. La solución al método tradicional radica en variar más de un factor a la vez en cada experimento, para lo que es importante obtener información con un número reducido de experimentos. Para ello, el *Diseño Estadístico de Experimentos* (DEE) proporciona un marco matemático que lo posibilita, siguiendo los siguientes pasos: **(i)** Identificar los factores que puedan influir en el resultado de un experimento, así como sus niveles (Dominio experimental ensayado) **(ii)** Diseñar un experimento que minimice los efectos de los factores incontrolados y que permita obtener la información buscada con un mínimo coste **(iii)** Buscar qué valores de los factores proporcionan las respuestas de mayor calidad (Optimización) **(iv)** Aplicar un análisis estadístico para evaluar los efectos de los factores, así como de las interacciones entre ellos. Entre los diferentes diseños de experimentos se encuentran los *ANOVA multifactoriales* y los *Diseños factoriales completos 2^k*.

Para analizar los datos del presente estudio se decidió llevar a cabo un *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* por varios motivos: **(i)** Todos los valores se refieren al valor sin plásmido, por lo que dicha población tendrá media 1 y varianza 0, luego no se puede aplicar un ANOVA con réplicas al no cumplirse la condición de que todas las poblaciones tengan varianzas comparables entre sí, lo que hace que haya que recurrir a otras estrategias, como *Métodos Robustos (Con réplicas)* o *Diseños Factoriales 2^k Sin Réplicas*; **(ii)** Debido a que la cantidad de muestras biológicas disponible es limitada y reducida, es necesario llevar a cabo experimentos con que permita evaluar el máximo número de factores con el menor número de experimentos **(iii)** En el caso de que no sea posible aleatorizar los experimentos, la elevada variabilidad entre réplicas debido a los diversos factores incontrolados en ensayos celulares enmascararía los factores significativos, pues el error aleatorio o experimental alcanzaría valores desorbitados, a lo que se le suma el hecho de que los datos densitométricos de los Western Blot son de carácter semicuantitativo.

¹ Interacción entre los factores AB significa que la diferencia en la respuesta al variar A depende del valor (nivel) que tome el factor B, y viceversa.

4.7.2.1 Diseño factorial 2^k Sin réplicas.

En estos experimentos la variable respuesta (ej. la inducción de una proteína) se mide para todas las combinaciones posibles de los niveles elegidos de los factores, que a su vez tienen dos posibilidades, nivel alto y bajo, denominados +1 y -1, respectivamente, siendo muy importante la elección de los mismos. En el caso de factores que sean variables continuas (ej. el tiempo), si los niveles elegidos están muy cercanos entre sí (ej. 24 y 25 horas en una transfección transitoria), es posible que se obtenga un efecto no significativo para dicho factor, cuando en realidad sí que lo es. Por el contrario, si los niveles se distancian demasiado, es posible que se encuentren a ambos lados de un máximo de la variable respuesta (ej. 5 y 120 horas en una transfección transitoria), lo que supondría obtener un efecto no significativo del factor cuando en realidad sí que lo es. Para la determinación de los factores significativos se estiman los efectos de cada *factor* e *interacción* aplicando el *Algoritmo de Yates*. Este DEE presenta una importante ventaja frente a otros, y es el reducido número de experimentos requerido. Un ejemplo de *Diseño Factorial 2^k Sin réplicas* se muestra en la tabla IV.

Combinación	Observación	A	B	C	Respuesta (\bar{R})
1	1	-1	-1	-1	3,5863383
a	2	+1	-1	-1	2,24230002
b	3	-1	+1	-1	0,05050267
c	4	-1	-1	+1	2,92928163
ab	5	+1	+1	-1	1,51032445
ac	6	+1	-1	+1	3,17838839
bc	7	-1	+1	+1	4,75608234
abc	8	+1	+1	+1	10,7046294

Tabla IV. Matriz del diseño experimental completo. *Observación:* enumera los experimentos, cada uno correspondiente con una combinación dada para los niveles de cada factor. Los factores a evaluar son A, B y C; *Combinación:* corresponde con la notación de Yates, donde en minúscula se muestran los Factores que están en su nivel alto para ese experimento; **A, B, C:** corresponde a los niveles experimentales de los factores; *Respuesta:* corresponde con el promedio de las respuestas de cada observación experimental.

Para evaluar la significación estadística de los efectos en el caso de los *Diseños Factoriales 2^k Sin Réplicas*, puesto que no se puede estimar directamente el error experimental, se recurre a un análisis de los efectos estimados mediante un gráfico de Probabilidad Normal. Para ello, se organizan los efectos en orden creciente, donde el efecto i -ésimo tiene una frecuencia acumulada de i/N en una muestra de tamaño N . Posteriormente se representan el conjunto de puntos:

$$\left\{ \left(100 \cdot \left(\frac{i-0,5}{n} \right), efecto_i \right), i = 1, \dots, n \right\}$$

i) Efectos no significativos (hipótesis nula o H_0) Los efectos serán nulos, por lo que sus estimaciones, a partir de las observaciones experimentales, seguirán una distribución normal de media cero y varianza σ^2 , $N(0, \sigma^2)$, es decir, que estos efectos estarán distribuidos a lo largo de una línea recta que pase por $X=0$ del Gráfico de Probabilidad Normalidad (Factores A, B e interacción AC, Figura VII).

(ii) Efectos significativos (hipótesis alternativa o H_1) Los efectos no serán nulos, por lo que sus estimaciones no se ajustarán a la línea recta, pues no pueden ser explicados como una variación aleatoria (ej. Factores C, e interacción AB, BC y ABC, Figura VII).

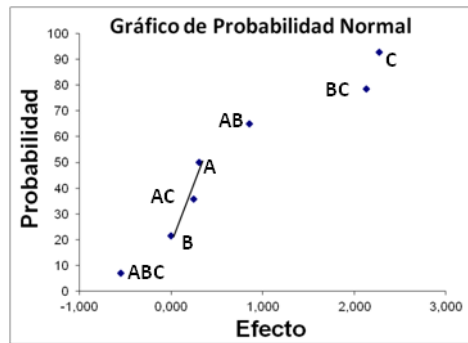


Figura VII. Gráfico de Probabilidad Normal. Los efectos estimados siguen una distribución normal, $N(0, \sigma^2)$, luego los efectos estimados que se alejen de la recta serán estadísticamente significativos.

Si existiesen datos anómalos, se podrían detectar y corregir aplicando el método de *Reestimación de una Observación Sospechosa a Partir de los 2^{k-1} Efectos Centrales*, en el que se promedian los valores absolutos de los 4 efectos estimados más cercanos al cero, se les multiplica por 2^{k-1} ($k = n^{\circ}$ factores) y dicho valor se le resta a la observación anómala, que será aquella cuya magnitud relativa respecto del resto de observaciones sea elevada.

4.7.2.2 Estimación la línea de tendencia.

Considerando los datos para las inducciones de proteínas pro-inflamatorias en las células transfectadas con *pc3.1-ColXIII-EGFP* o con *pc3.1-ColXIII*, a diferentes tiempos, se tendría una serie temporal. Así, para estimar la línea de tendencia se procede a ajustar la recta a la nube de puntos proporcionada por la serie temporal. En la Regresión Lineal por Mínimos Cuadrados se estiman los coeficientes de regresión B_0 y B_1 , donde la recta de regresión ajustada será:

$$Y = B_0 + B_1X$$

Para estimar la tendencia a partir de la recta de regresión ajustada se procede al siguiente contraste de hipótesis, donde si $B_1 = 0$ (pendiente nula) la serie temporal no muestra ninguna tendencia, mientras que si $B_1 \neq 0$ (Pendiente diferente de cero) la serie temporal muestra una tendencia que puede ir al alza (Pendiente positiva) o a la baja (Pendiente negativa). Así, para este contraste de hipótesis se van a tener en cuenta los intervalos de confianza de la pendiente.

5 Resultados.

5.1 Sobreexpresión de colágeno XIII en células AVIC mediante transfección transitoria.

Dado que el análisis del genoma completo había revelado una mayor expresión del *gen col13a1* en las AVIC estenóticas respecto de las AVIC controles (datos no publicados), se planteó estudiar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en AVIC, que son células con un fenotipo miofibroblástico que se encargan de la síntesis y recambio de la Matriz Extracelular de la válvula aórtica. Para ello, se diseñaron una serie de experimentos de transfección transitoria en AVIC usando plásmidos que sobreexpresan colágeno XIII y sus correspondientes controles, previamente extraídos y purificados como se indica en el apartado *Métodos*.

5.1.1 Puesta a punto de los métodos de Transfección transitoria en AVIC.

Se utilizaron dos métodos, uno basado en Lipofectamina y otro basado en Turbofectin, usados previamente en la literatura para transfectar células AVIC [17,43]. El plásmido elegido para los estudios de puesta a punto de la transfección fue *pc3.1-EGFP*, puesto que la expresión de la proteína EGFP posibilita el seguimiento de la transfección mediante fluorescencia.

5.1.1.1 Lipofectamina.

Inicialmente se estudió el efecto de diferentes proporciones de DNA:Lipofectamina con el fin de optimizar el método de la transfección. Se transfectaron las células y tomaron imágenes aleatorias de cada pocillo a las 24 horas post-transfección, en las que puede observarse una baja expresión de EGFP (Figura 1).

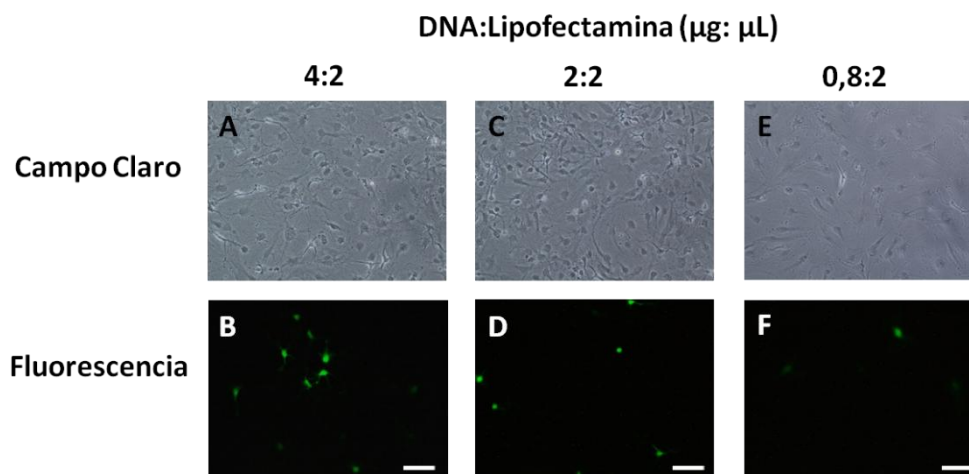


Figura 1. Transfección con diferentes proporciones DNA:Lipofectamina a 24h. AVIC controles transfectadas con diferentes proporciones *DNA:Lipofectamina* ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$), según se indica en la figura. Imágenes de Campo Claro (**A,C,D**) y de Fluorescencia (**B,D,F**) de aumento 10X obtenidas 24h tras la transfección. **Barra blanca** representa 100µm. Representativo de $n = 8$ experimentos independientes.

Cuando se tomaron imágenes a las 48 horas, se observó que la fluorescencia había decaído (Figura 2), algo esperable al tratarse de transfecciones transitorias.

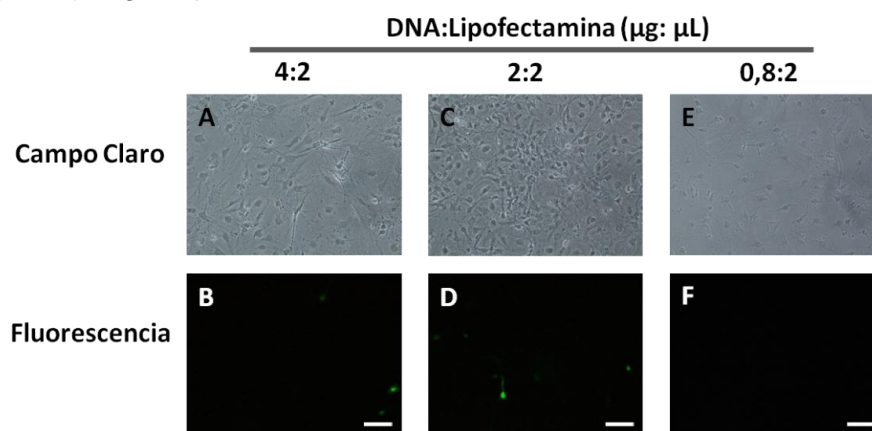


Figura 2: Transfección con diferentes proporciones DNA:Lipofectamina a las 48 h. AVIC controles transfectadas con diferentes proporciones *DNA:Lipofectamina* ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$), según se indica en la figura. Imágenes de: Campo Claro (**A,C,D**) y de Fluorescencia (**B,D,F**) de aumento 10X obtenidas 48h tras la transfección. **Barra blanca** representa 100µm. Representativo de $n = 8$ experimentos independientes.

A continuación se llevó a cabo el recuento, tanto de las células totales como de las células que emiten fluorescencia, estimándose las siguientes eficiencias de transfección al tiempo de 24h tras la transfección (tabla 1):

Tabla 1. Eficiencia de transfección con Lipofectamina 2000 (24h).

DNA:Lipofectamina 2000 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$)	Eficiencia %	Intervalo de Confianza
4:2	17	3
2:2	4,0	0,8
0,8:2	4,0	0,4

Así, se puede concluir que la eficiencia de transfección es baja, obteniéndose la mayor eficiencia con la proporción 4:2 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) de DNA:Lipofectamina. Además, la Lipofectamina tiene un elevado efecto citotóxico sobre las AVIC control.

5.1.1.2 Turbofectin.

Puesto que la eficiencia de transfección con Lipofectamina era baja, se decidió poner a punto otro método de transfección transitoria de AVIC. Para ello, se analizaron diferentes proporciones de DNA:Turbofectin con el fin de optimizar el método de transfección. Para el cálculo de la eficiencia de transfección se tomaron imágenes aleatorias de cada pocillo, en las que puede observarse una baja expresión de EGFP a las 24-48 horas (Figura 3a), que decae aun más a las 48 horas (Figura 3b).

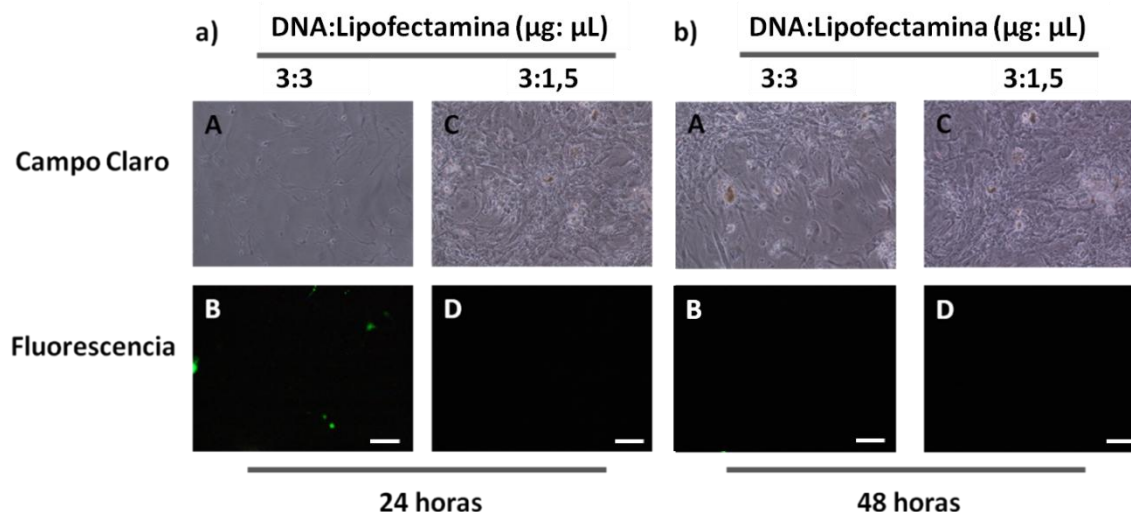


Figura 3. Transfección con diferentes proporciones DNA:Turbofectin 8.0. AVIC control transfectadas con diferentes proporciones *DNA:Turbofectin*, según se indica en las imágenes, tomadas a las 24h (**a**), o 48h (**b**) tras la transfección. Imágenes de Campo Claro (A,C) y de Fluorescencia (B,D). **Barra blanca** representa 100 μm . Representativo de $n = 5$.

Se llevó a cabo el recuento, tanto de las células totales como de las células que emiten fluorescencia, estimándose las siguientes eficiencias de transfección a 24 horas (tabla 2):

Tabla 2. Eficiencia de transfección con Turbofectin (24h)

Proporción $\mu\text{g DNA} : \mu\text{L Turbofectin}$	Eficiencia	Intervalo de Confianza
3:3	5,2	0,2
3:1,5	0	0

Así, se pueden concluir que la eficiencia de transfección es baja, siendo mayor para la proporción 3:3 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) de DNA:Turbofectin.

5.1.1.3 Comparación de los métodos de transfección anteriores en la sobreexpresión de colágeno XIII.

Con las proporciones optimizadas para cada método de transfección, se llevaron a cabo experimentos de transfección con el fin de confirmar la sobreexpresión de colágeno XIII mediante ensayos de *Western Blot*. Para ello, se transfectaron células con *pc3.1-ColXIII-EGFP*, con su control *Sin Plásmido*. En los ensayos de *Western Blot* se observa la sobreexpresión de colágeno XIII fusionado a EGFP solo en células transfectadas con el plásmido *pc3.1-ColXIII-EGFP* (Figura 4). La banda de 120 kDa corresponde al colágeno XIII-EGFP, mientras las bandas inferiores pueden indicar diferentes niveles de procesamiento o de conformación. El colágeno XIII endógeno (100 KDa) se detecta cuando las células se transfectan *sin plásmido* (Figura 4a). El análisis comparativo de *Western Blot* indica que el método de Lipofectamina promueve una mayor expresión de colágeno XIII-EGFP que el de Turbofectin (Figura 4), lo que está de acuerdo con una mayor intensidad de fluorescencia observada (Figuras 1 y 3).

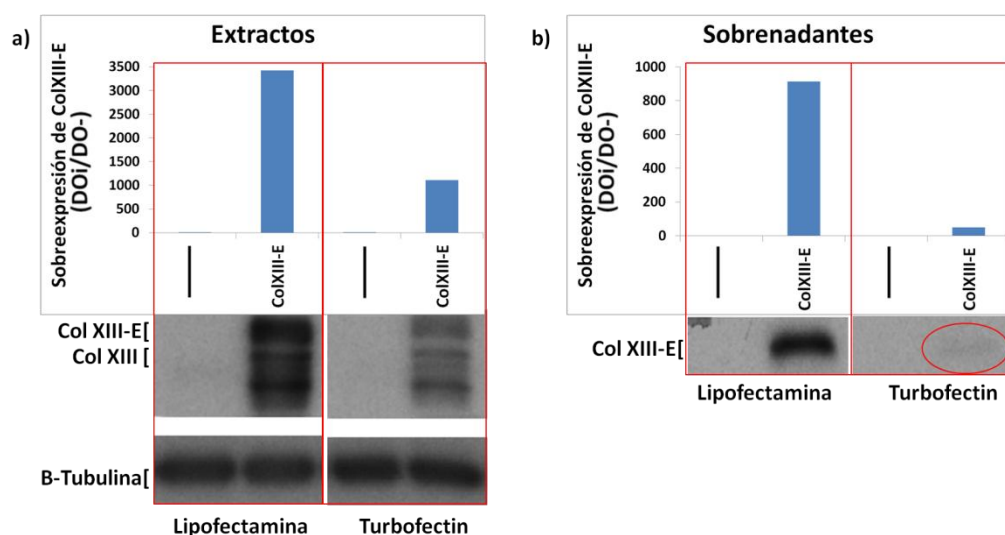


Figura 4. Comparación de la sobreexpresión de colágeno XIII-EGFP en AVIC transfectadas con Lipofectamina y Turbofectin. AVIC transfectadas *Sin Plásmido* (Barra negra) y *pc3.1-ColXIII-EGFP* (ColXIII-E). Se comparó la expresión de colágeno XIII con lipofectamina y Turbofectin en el mismo experimento a las 48h tras la transfección. Se muestra el análisis densitométrico, expresando la Densidad Óptica como DO, para los (a) Extractos y (b) Sobrenadantes celulares. El gráfico corresponde a los valores de DO normalizada frente a β -Tubulina y referido al valor sin plásmido (DO-): DO_i/DO_- , donde i=sin plásmido o COL XIII. Las imágenes corresponden a la banda de colágeno XIII (a,b, Superior) y β -Tubulina (a, Inferior). ColXIII indica colágeno XIII; ColXIII-E indica colágeno XIII-EGFP. Experimento representativo de n=6 experimentos independientes.

A continuación se analizó la secreción al medio extracelular. En la Figura 4b se puede observar una mayor secreción de colágeno XIII-EGFP en AVIC controles transfectadas con Lipofectamina respecto de Turbofectin, lo que está de acuerdo con una mayor sobreexpresión de colágeno XIII-EGFP en el caso de la Lipofectamina (Figura 4a). Un análisis cinético (24, 48, 72 y 96 horas) reveló la secreción y acumulación de colágeno XIII-EGFP hasta 72-96h post-transfección (Figura 5b). Además, se puede observar una tendencia positiva de la cantidad de colágeno XIII-EGFP en los sobrenadantes con el tiempo, lo que sugiere una acumulación del mismo en el medio extracelular (Figura 5b). En resumen, se puede concluir que las células AVIC transfectadas sobreexpresan y secretan colágeno XIII-EGFP en mayor medida cuando se usa Lipofectamina.

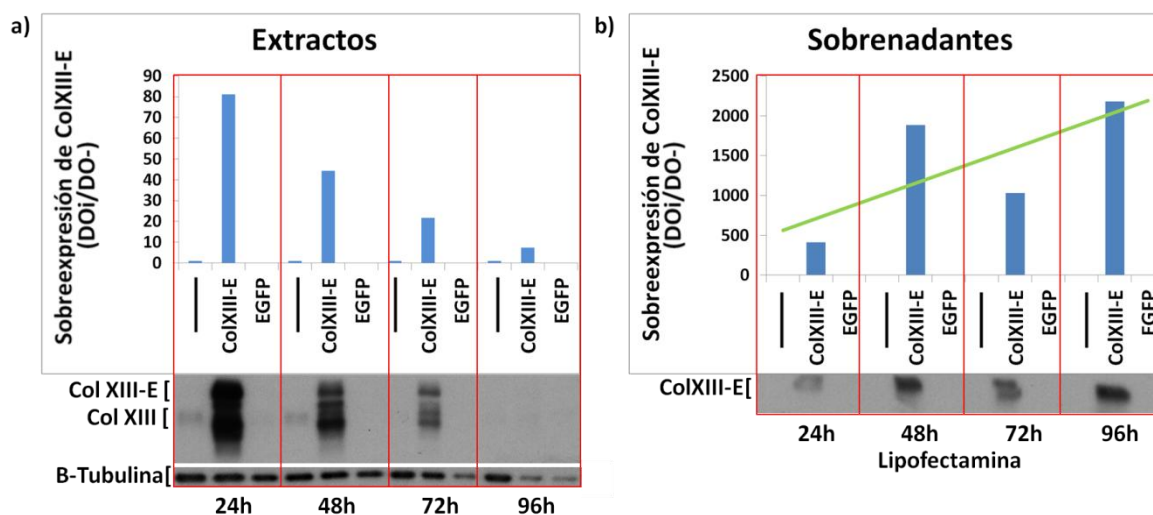


Figura 5. Cinética de expresión y secreción de colágeno XIII-EGFP en células AVIC transfectadas con lipofectamina. Cinética de sobreexpresión de colágeno XIII-EGFP con Lipofectamina (24-96h). Transfectadas *Sin Plásmido* (Barra negra), *pc3.1-ColXIII-EGFP* (ColXIII-E) y *pc3.1-EGFP* (EGFP). Se muestra el análisis densitométrico, expresando la Densidad Óptica como DO, para los (a) Extractos (b) sobrenadantes celulares. Línea de Tendencia de pendiente (Verde) obtenida por ajuste lineal de mínimos cuadrados de los datos para Xi=Col XIII, i=24, 48, 72 y 96 horas. **Análisis densitométrico y abreviaturas como en Figura 4.** Experimento representativo de n=2 experimentos independientes.

En el análisis microscópico observamos citotoxicidad celular con el método de Lipofectamina. Para estimar de modo indirecto y comparar el efecto citotóxico de ambos métodos de transfección, en ensayos de transfección (cinéticas de 24 a 96 horas) se analizó, mediante *Western Blot*, la banda de β -Tubulina, pues es directamente proporcional a la carga celular. Se observó cómo ésta disminuye con el tiempo en el caso de Lipofectamina (Figura 6b), pues su línea de tendencia tiene pendiente negativa y su intervalo de confianza no incluye a cero (-283, -102), lo que significa que la DO de β -Tubulina disminuye con el tiempo. Por el contrario, se observó que, para el reactivo Turbofectin (Figura 6a), su línea de tendencia tiene pendiente positiva y su intervalo de confianza sí incluye a cero: (-36, 74), lo que significa que DO β -Tubulina permanece constante con el tiempo.

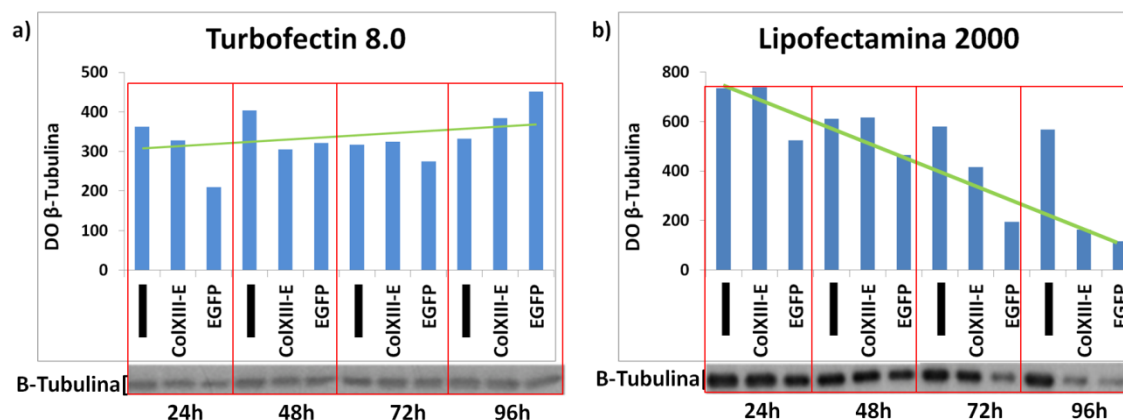


Figura 6. Estimación del efecto citotóxico del Turbofectin y la Lipofectamina. AVIC transfectadas *Sin Plásmido* (Barra negra), *pc3.1-ColXIII-EGFP* (ColXIII-E) y *pc3.1-EGFP* (EGFP). Se muestran las autorradiografías digitalizadas de Western Blot y el correspondiente análisis densitométrico, expresando la Densidad Óptica como DO, de las bandas de β -tubulina para los tiempos y plásmidos indicados. (a) Turbofectin (b) Lipofectamina. Línea de Tendencia de pendiente (Verde) obtenida por ajuste lineal de mínimos cuadrados de los datos para $X_i = \text{Col XIII}$, $i = 24, 48, 72$ y 96 horas. Experimento representativo de $n = 2$ experimentos independientes.

Hay que hacer notar que, a pesar de que las células sí que se transfectan con el plásmido *pc3.1-ColXIII-EGFP*, pues claramente sobreexpresan colágenoXIII-EGFP (Western blot, Figuras 4 y 5), la fluorescencia observada para las células transfectadas con *pc3.1-ColXIII-EGFP* es menor que para el plásmido control *pc3.1-EGFP* (Figura 7). Esta menor fluorescencia puede deberse a que la proteína EGFP es de pequeño tamaño mientras que el colágeno XIII-EGFP es de mayor tamaño y requiere más procesamientos intracelulares. Además, podría explicarse porque de las posibles conformaciones espaciales que pueda adquirir la proteína colágeno XIII-EGFP, la que emita fluorescencia sea la configuración menos probable.

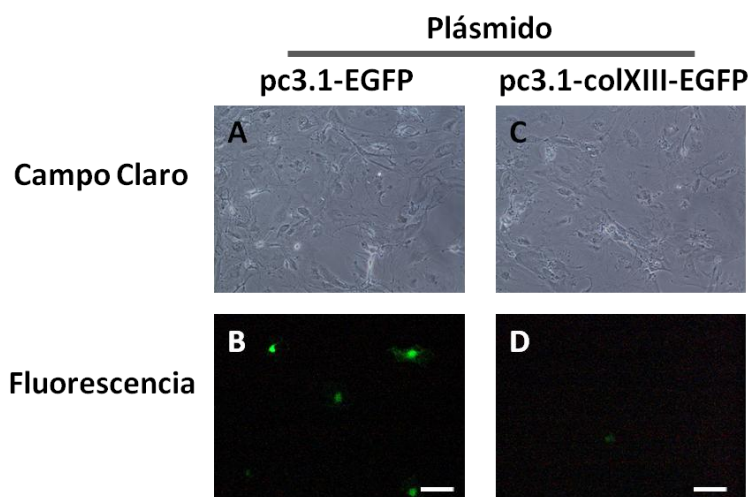


Figura 7. Fluorescencia emitida por AVIC transfectadas con pc3.1-EGFP y pc3.1-ColXIII-EGFP. Células transfectadas con pc3.1-EGFP (A,B) o pc3.1-ColXIII-EGFP (C,D), empleando *Lipofectamina*. (A,B): Imagen de campo claro; (B,D): Imagen de fluorescencia. **Barra blanca** representa 1µm; Experimentos representativos de n=4 experimentos independientes.

5.2 Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de proteínas pro-inflamatorias

El siguiente paso fue analizar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de proteínas pro-inflamatorias ICAM-1 y COX2 mediante *Western Blot*. Para ello, primero se transfectaron las células con las proporciones optimizadas de *Lipofectamina* y *Turbofectin*, y a distintas horas se recogieron por una parte los sobrenadantes y por otra los extractos celulares.

5.2.1 Sobreexpresión de colágeno XIII fusionado a EGFP

Los primeros experimentos llevados a cabo se realizaron con células transfectadas con *pc3.1-ColXIII-EGFP*, que expresa colágeno XIII humano recombinante fusionado a EGFP, con su plásmido control *pc3.1-EGFP*, o sin plásmido.

Por los motivos indicados en el apartado de *Diseño estadístico de experimentos de Métodos*, se llevó a cabo un *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas*. En primer lugar, se identificaron los Factores y Niveles: *Tiempo* (24, 48, 96 y 72 horas), *Plásmido* (Sin plásmido, *pc3.1-ColXIII-EGFP* y *pc3.1-EGFP*) y *Método de Transfección* (*Lipofectamina* y *Turbofectin*). Posteriormente, se llevó a cabo un *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* para evaluar el efecto de dichos Factores en la sobreexpresión de colágeno XIII y su efecto en la inducción de moléculas proinflamatorias, según la matriz del diseño experimental de la tabla 3.

Tabla 3. Matriz del Diseño Experimental 2^k.

Factor (Unidades)	Denominación	Nivel -	Nivel +
Tiempo (horas)	A	24	72
Plásmido	B	<i>pc3.1- ColXIII-EGFP</i>	<i>pc3.1- EGFP</i>
Reactivo	C	<i>Turbofectin</i>	<i>Lipofectamina</i>

5.2.1.1 Inducción de ICAM-1.

El análisis de *Western Blot* usando un anticuerpo frente a ICAM-1 humana demuestra que, para ambos métodos, la sobreexpresión de colágeno XIII-EGFP promueve la inducción de ICAM1 (con respecto a sin plásmido) y que ésta aumenta con el tiempo, siendo mayor con *Lipofectamina* (Figura 8). De modo inesperado, *pc3.1-EGFP* también induce su expresión (Figura 8).

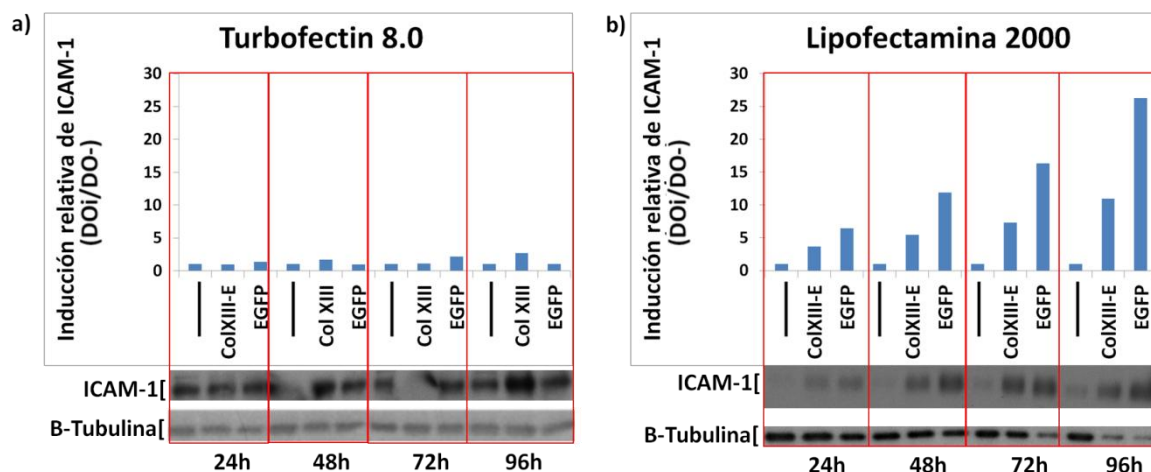


Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de ICAM-1 en AVIC. Células transfectadas Sin Plásmido (Barra negra), *pc3.1-ColXIII-EGFP* (ColXIII-E) y *pc3.1-EGFP* (EGFP). Se muestran las autorradiografías digitalizadas de Western Blot (las bandas superiores corresponden a ICAM-1 y las inferiores a β -Tubulina), y su correspondiente análisis densitométrico, expresando la Densidad Óptica como DO, para (a) Turbofectin y (b) Lipofectamina con los plásmidos y tiempos indicados; (a,b) El gráfico corresponde a los valores de DO de ICAM-1 normalizado frente a β -Tubulina y referido al valor sin plásmido: DO_i/DO_- , donde i =Sin Plásmido, EGFP o Col XIII, y DO_- =DO Sin Plásmido. Experimento representativo de $n=2$ experimentos independientes.

A continuación se aplica el *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* (Figura 9). Son factores críticos (se rechaza H_0 y se acepta H_1), por este orden: C, A, B y la interacción ABC, por lo que, a nivel de inducción de ICAM-1, se encuentran diferencias significativas en el *Tiempo transcurrido tras la Transfección* (A), entre los *Plásmidos* (B) y entre los *Métodos de transfección empleados* (C). A su vez, la variación en la inducción de ICAM-1 al variar el *Plásmido* dependerá del *Método de Transfección* y del *Tiempo transcurrido tras la transfección* (ABC). La mayor inducción, en el dominio experimental ensayado, corresponde a la combinación de niveles A(+), B(+), C(+), es decir, *72 horas, pc3.1-EGFP y Lipofectamina* (Figura 9a).

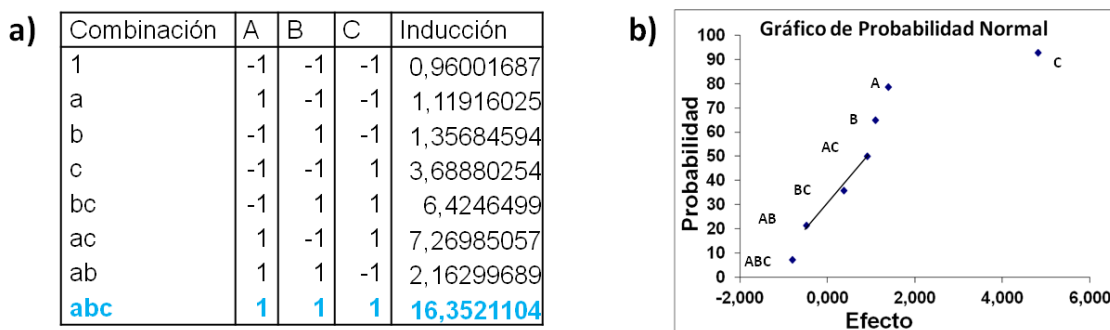


Figura 9. Diseño Factorial 2^k "Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de ICAM-1". (a) Matriz del Diseño Experimental (en azul la respuesta óptima). (b) Gráfico de probabilidad Normal. Experimento representativo de $n = 2$ experimentos independientes. A = tiempo, B = plásmido, C = método de transfección.

5.2.1.2 Inducción de COX2.

El análisis de *Western Blot* usando un anticuerpo frente a COX2 humana demuestra que, para ambos métodos, la sobreexpresión de colágeno XIII-EGFP promueve la inducción de COX2 (con respecto a sin plásmido), siendo mayor con Lipofectamina y más marcada de 24 a 48 horas tras la transfección (Figura 9). Al igual que se observaba con ICAM-1, *pc3.1-EGFP* también induce COX2.

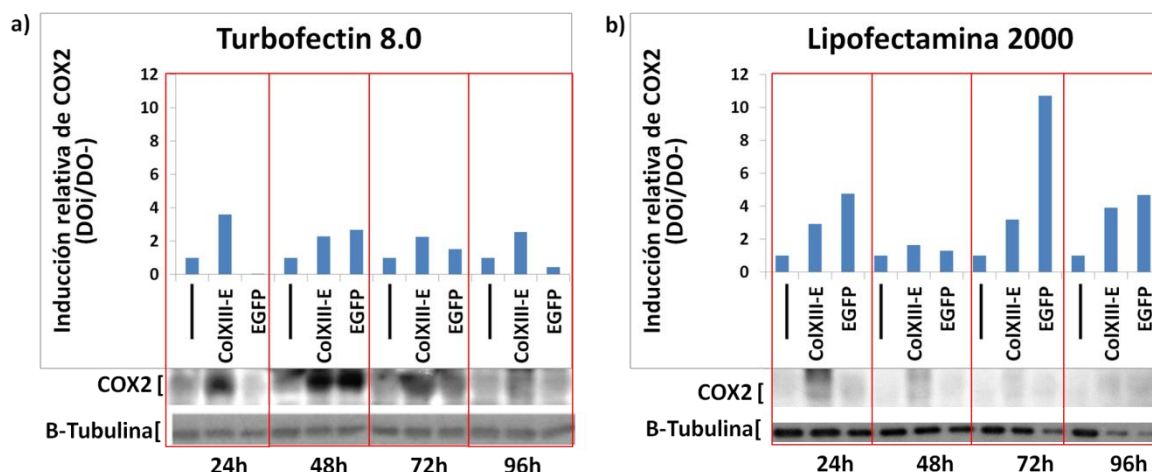


Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de COX2 en AVIC. Células transfectadas *Sin Plásmido* (Barra negra), *pc3.1-ColXIII-EGFP* (ColXIII-E) y *pc3.1-EGFP* (EGFP). Se analizaron para COX2 mediante *Western Blot*. Análisis densitométrico y abreviaturas como en la Figura 8. Experimento representativo de n=2 experimentos independientes.

A continuación se aplica el *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* (Figura 11). Son factores críticos (se rechaza H_0 y se acepta H_1), por este orden: C, la interacción BC, AB y ABC, por lo que a nivel de inducción de COX2 se encuentran diferencias significativas entre ambos *Métodos de Transfección* (C), y la variación en la inducción de COX2 al cambiar de *Plásmido* dependerá del *Método* y del *Tiempo transcurrido tras la transfección* (ABC). La mayor inducción, en el dominio experimental ensayado, corresponde a la combinación de niveles A(+), B(+), C(+), es decir, *72 horas, pc3.1-EGFP* y *Lipofectamina* (Figura 11a).

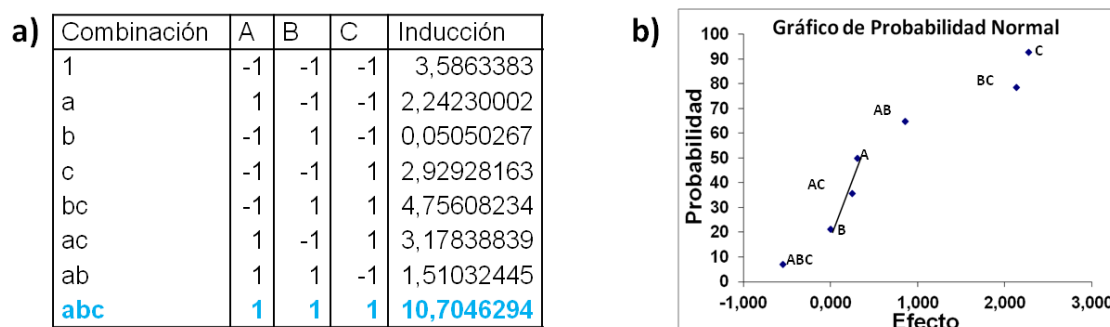


Figura 11. Diseño Factorial 2^k "Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de COX2" (a) Matriz del Diseño Experimental (en azul la respuesta óptima); b) Gráfico de probabilidad Normal; Experimento representativo de n=2 experimentos independientes; A=tiempo, B= plásmido, C=método de transfección.

Ante la inesperada inducción de moléculas pro-inflamatorias por la transfección de *pc3.1-EGFP* con ambos métodos de transfección, se llevaron a cabo experimentos de transfección transitoria de células AVIC en los que se empleó el plásmido *p-Max*, que expresa EGFP. Así, se evaluó la inducción de COX2 e ICAM-1 en las células transfectadas con los plásmidos que expresan colágeno XIII-EGFP y EGFP (*pMax*), empleando los métodos de transfección con *Lipofectamina* y con *Turbofectin* a las 48 horas tras la transfección (Figura 12). En el caso de *Lipofectamina*, la expresión de EGFP induce ICAM-1 (Figura 12a) y COX2 (Figura 12b), mientras que este efecto no se observa con *Turbofectin*.

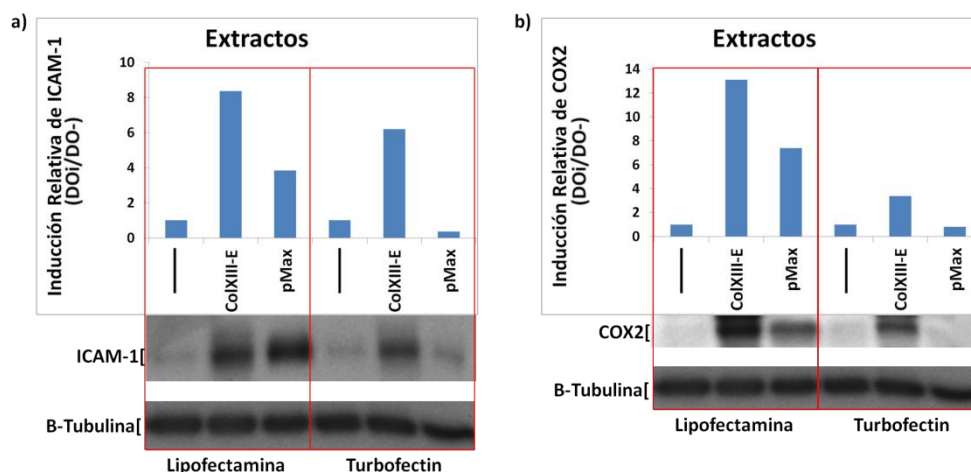


Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de EGFP (pMax) y de colágeno XIII-EGFP en la inducción de COX2 y de ICAM-1 en células AVIC. Células transfectadas *Sin Plásmido* (Barra negra), *pc3.1-ColXIII-EGFP* (ColXIII-E) y pMax. Se analizaron por *Western Blot* para ICAM-1 y COX2. **Análisis densitométrico y abreviaturas como en la Figura 8.** Experimento representativo de n=4 experimentos independientes.

A continuación se aplica el *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas*, como se explica en Métodos, y usando la matriz de diseño experimental de la tabla 4.

Tabla 4. Matriz del Diseño Experimental 2^k.

Factor (Unidades)	Denominación	Nivel -	Nivel +
Plásmido	A	<i>pc3.1-ColXIII-EGFP</i>	<i>p-Max</i>
Reactivo	B	Turbofectin	Lipofectamina

Los resultados del *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* se muestran en la Figura 13. Se concluye que no hay diferencias significativas en la inducción de COX2 ni de ICAM-1 a la hora de emplear p-Max o *pc3.1-ColXIII-EGFP*, lo que sugiere que la sobreexpresión de EGFP promueve la inducción de moléculas pro-inflamatorias en un orden igual a como lo hace la sobreexpresión de colágeno XIII-EGFP. El efecto de la interacción AB es estadísticamente significativa, luego la variación en la inducción de ICAM-1 y de COX 2 al variar el plásmido dependerá del Método de transfección empleado, y viceversa. La mayor inducción, en el dominio experimental ensayado, correspondiente a la combinación de niveles *pc3.1-ColXIII-EGFP* y *Lipofectamina*, tanto para COX2 como para ICAM-1 (figuras 13a y 13b, respectivamente).

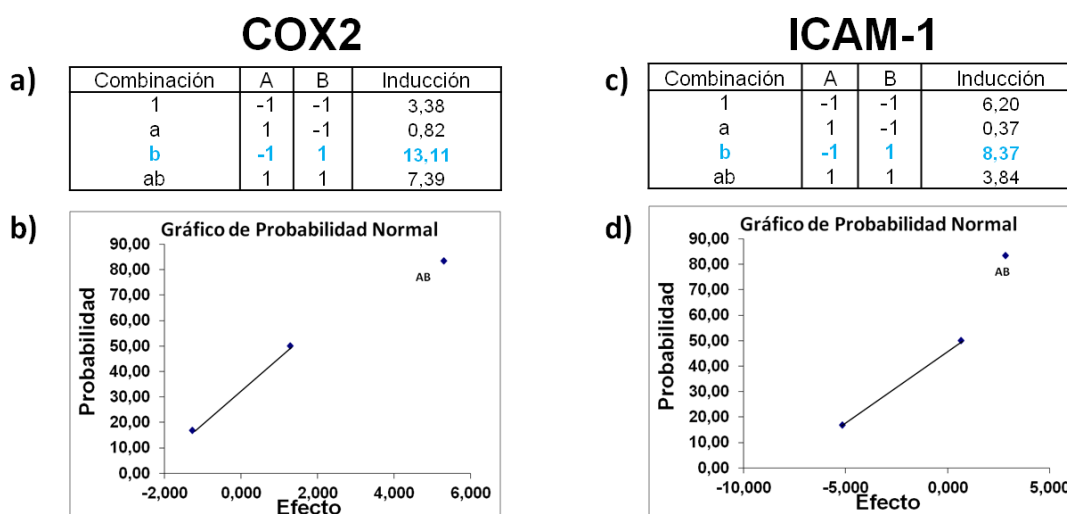


Figura 13. Diseño Factorial 2^k "Inducción de ICAM-1 y COX2 por la sobreexpresión de EGFP y de colágeno XIII-EGFP en AVIC control transfectadas". (a,c) Matriz del Diseño Experimental (en azul la respuesta óptima); (b,d) Gráfico de probabilidad Normal; (a,b) COX2; (c,d) ICAM-1; Experimentos representativos de n=4 experimentos independientes; A=Plásmido, B=método de transfección.

Como conclusión de los experimentos de Transfección transitoria de AVIC, se puede extraer que estos plásmidos que expresan colágeno XIII-EGFP no son adecuados para evaluar el efecto de su sobreexpresión en la respuesta inflamatoria en AVIC.

5.2.2 Sobreexpresión de colágeno XIII sin fusionar a EGFP

Para subsanar el efecto de EGFP, se realizaron nuevos experimentos de transfección transitoria usando un plásmido que expresa colágeno XIII pero sin fusionar a EGFP, pc3.1-ColXIII, y su control pc3.1. Para ello, se transformaron y purificaron los nuevos plásmidos. En primer lugar, se evaluaron los Factores *Tiempo tras la Transfección* (24, 48 y 72 horas), *Plásmido* (Sin plásmido, pc3.1-ColXIII y pc3.1) y *Método de Transfección* (Lipofectamina y Turbofectin). Posteriormente, se llevó a cabo un *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* para evaluar el efecto de los factores y de las interacciones entre ellos en la inducción de ICAM-1 y COX2, según la siguiente matriz del diseño experimental (tabla 5):

Tabla 5. Matriz del Diseño Experimental 2^k.

Factor (Unidades)	Denominación	Nivel -	Nivel +
Tiempo (horas)	A	24	48
Plásmido	B	pc3.1	pc3.1-ColXIII
Reactivo	C	Turbofectin	Lipofectamina

Cabe destacar que, en estos experimentos, puesto que no hay expresión de EGFP, no es posible seguir la eficiencia de transfección mediante imagen de fluorescencia. Para corroborar que las células se han transfectado se usó el método de *Western Blot*. En la Figura 14 se observa que las células sí han sido transfectadas con Turbofectin. Por problemas técnicos con el anticuerpo anti-colágeno XIII, no se pueden mostrar imágenes de expresión con Lipofectamina.

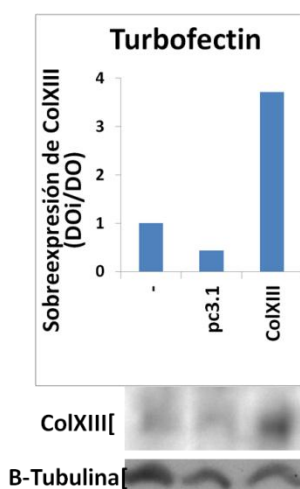


Figura 14. Sobreexpresión de colágeno XIII en células AVIC control. Células transfectadas *Sin Plásmido* (Barra negra), pc3.1-ColXIII (ColXIII-E) y pc3.1 (pc3.1) con Turbofectin. Se muestran las autorradiografías digitalizadas de Western Blot (las bandas superiores corresponden a colágeno XIII y las inferiores a β -Tubulina, y su correspondiente análisis densitométrico, expresando la Densidad Óptica como DO. El gráfico corresponde a los valores de DO de colágeno XIII normalizado frente a β -Tubulina y referido al valor sin plásmido: $DOI/DO-$, donde i=Sin Plásmido, EGFP o Col XIII, y $DO-$ =DO Sin Plásmido. Experimento representativo de n=2 experimentos independientes.

El siguiente paso fue analizar la inducción de moléculas pro-inflamatorias en células transfectadas con plásmidos sin EGFP.

5.2.2.1 Inducción de ICAM-1.

Las células transfectadas con Turbofectin y Lipofectamina se analizaron mediante *Western Blot* (usando un anticuerpo frente a ICAM-1 humana) Para ambos métodos de transfección, la sobreexpresión de colágeno XIII induce ICAM-1 con respecto a células transfectadas sin plásmido, siendo mayor con Lipofectamina que con Turbofectin. Con

ambos métodos, el plásmido *pc3.1* también induce ICAM-1, pero en menor medida que *pc3.1-ColXIII* para Lipofectamina. También se observa un aumento de la inducción con el tiempo, más notable con Lipofectamina entre las 24-48 horas post-transfección (Figura 15).

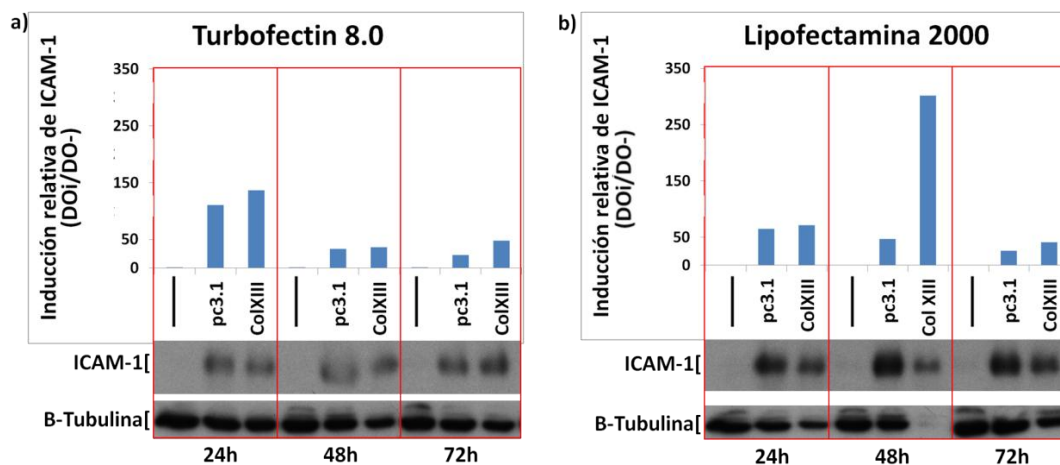


Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de ICAM-1 en AVIC. Células transfectadas Sin Plásmido (Barra negra), *pc3.1-ColXIII* (ColXIII-E) y *pc3.1* (*pc3.1*). Se analizaron mediante Western Blot para ICAM-1. Análisis densitométrico y abreviaturas como en Figura 8. Experimento representativo de n=3 experimentos independientes.

A continuación se aplica el *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* (Figura 16), usando la matriz de diseño experimental de la tabla 5. Son factores críticos por este orden: la interacción AC, el factor B, C, la interacción ABC y BC, por lo que, a nivel de inducción de ICAM-1 se encuentran diferencias significativas entre los Plásmidos y entre el Método de transfección empleado. A su vez, la variación en la inducción de ICAM-1 al variar el Plásmido dependerá de los niveles del Método y del Tiempo transcurrido tras la transfección (Interacción ABC). La mayor inducción, en el dominio experimental ensayado, corresponde a la combinación de niveles A(+), B(-), C(+), es decir, 48 horas, *pc3.1-ColXIII* y Lipofectamina (Figura 16a). Por lo tanto, el plásmido *pc3.1-ColXIII* podrá usarse para estudiar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de ICAM-1.

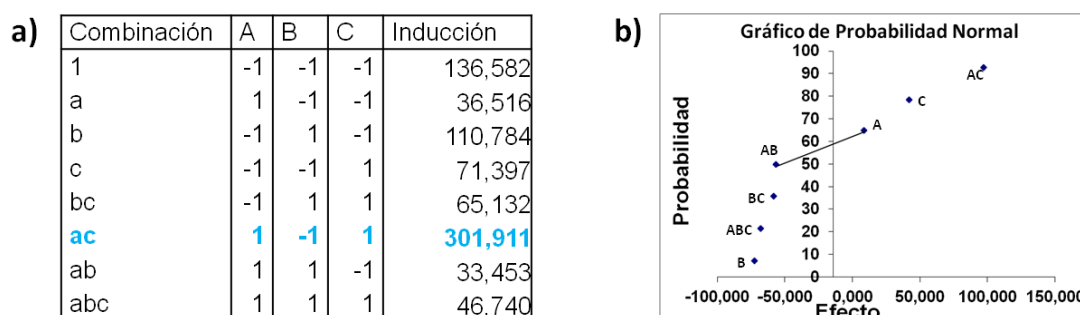


Figura 16. Diseño Factorial 2^k "Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de ICAM-1 en AVIC sanas". a) Matriz del Diseño Experimental (en azul la respuesta óptima); b) Gráfico de probabilidad Normal. Experimento representativo de n=3. A=tiempo, B= plásmido, C=método de transfección.

5.2.2.2 Inducción de COX 2

El análisis de *Western Blot* usando un anticuerpo frente a COX-2 humana demuestra que la sobreexpresión de colágeno XIII promueve la inducción de COX2 a 24h que aumenta de 24 a 48 horas (Figura 17). Para ambos métodos, la sobreexpresión de colágeno XIII induce COX2 con respecto a las células transfectadas sin plásmido, siendo mayor con Lipofectamina que con Turbfectin. Para ambos métodos, el plásmido *pc3.1* también induce COX2, pero en menor medida que *pc3.1-ColXIII* (Figura 17).

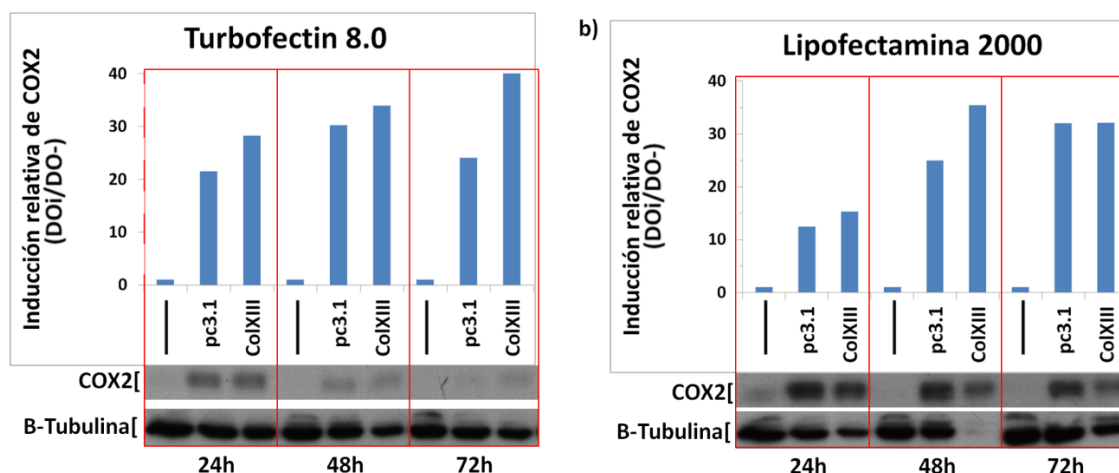


Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de COX 2 en células AVIC control. Células transfectadas Sin Plásmido (Barra negra), pc3.1-ColXIII (ColXIII-E) y pc3.1 (pc3.1). Se analizaron mediante Western Blot para COX2. Análisis densitométrico y abreviaturas como en Figura 8. Experimento representativo de n=3 experimentos independientes.

A continuación se aplicó el *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* (Figura 18), usando la matriz del diseño experimental de la tabla 5. Son factores críticos (Se rechaza H_0 y se acepta H_1), por este orden: A, la interacción AC, C, B y la interacción ABC, por lo que, a nivel de inducción de COX2, se encuentran diferencias significativas entre el *Tiempo transcurrido tras la Transfección*, entre los *Plásmidos* y entre ambos *Métodos de transfección*. A su vez, la variación en la inducción de COX 2 al variar el *Plásmido* dependerá del *Método* y del *Tiempo transcurrido tras la transfección* (ABC). La mayor inducción en el dominio experimental ensayado corresponde a la combinación de niveles A(+), B(-), C(+), es decir, 48 horas, pc3.1-ColXIII y Lipofectamina (Figura 18a).

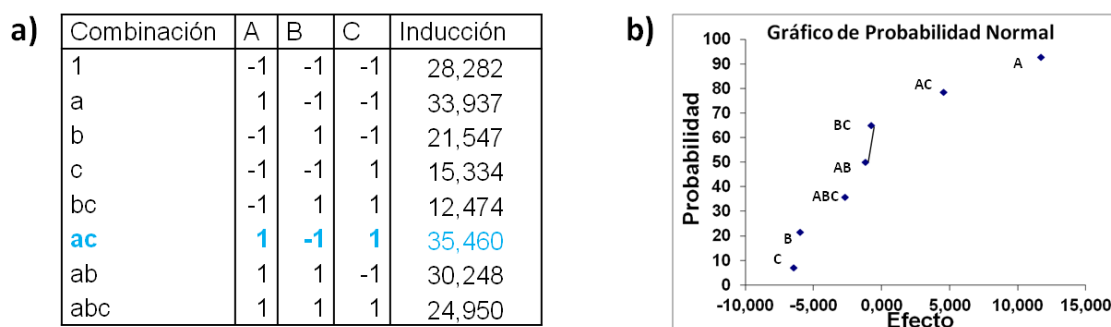


Figura 18. *Diseño Factorial 2^k* "Efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de COX 2 en AVIC control". a) Matriz del Diseño Experimental (en azul la respuesta óptima); b) Gráfico de probabilidad Normal. Experimentos n=1 por día, representativo de n=1. A=tiempo, B= plásmido, C=método de transfección.

6 Discusión.

La novedad del presente trabajo radica en la puesta a punto de dos métodos de transfección transitoria de células AVIC para el posterior análisis de los efectos de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de moléculas pro-inflamatorias. Estos objetivos surgieron a raíz de los estudios previos realizados en el grupo de investigación que mostraban una mayor expresión del gen *col13a1* en células AVIC estenóticas respecto de las células AVIC control. El objetivo final era saber si la sobreexpresión de colágeno XIII en AVIC control podía inducir inflamación, proceso que subyace en la patogenia de la estenosis aórtica.

La elección de poner a punto dos métodos de transfección transitoria, *Lipofectamina 2000* y *Turbofectin 8.0*, se debió a los antecedentes bibliográficos consultados [17,43] en los que se transfectaban células AVIC, pero no se especificaban las condiciones óptimas. Los resultados de la puesta a punto realizada en AVIC indican que las proporciones óptimas,

en el dominio experimental ensayado, son de 4:2 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) de *Lipofectamina* y 3:3 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) de *Turbofectin*. Con ambos métodos se detectó la sobreexpresión de colágeno XIII mediante fluorescencia, aunque se obtuvieron bajas eficiencias de transfección, como cabía esperar ante la dificultad de transfectar células de cultivo primario. Cuando se compararon varios métodos de transfección, la eficiencia fue significativamente mayor para el método de *Lipofectamina 2000*, a pesar de que este método presentó una limitación experimental grande, una elevada citotoxicidad, que se manifestaba por un cambio morfológico incipiente a las 24 horas en algunas células transfectadas (como se observaba en la imagen de fluorescencia y campo claro), que finalmente perdían su adherencia a la placa de cultivo. Se intentó evitar dicho problema eliminando el complejo DNA-Lipofectamina a las pocas horas de transfección y sustituyéndolo por medio de cultivo, no mejorando mucho más la viabilidad celular. La sobreexpresión de colágeno XIII en células transfectadas se confirmó mediante *Western blot*, y los resultados correlacionaron con los de imagen de fluorescencia. Se observó mayor sobreexpresión de colágeno XIII en el caso de la *Lipofectamina*, aunque la disminución del control de carga (β -tubulina) evidenciaba la pérdida de células, lo que confirmaba la citotoxicidad observada con este método.

Un aspecto interesante fue detectar la secreción de colágeno XIII en el medio extracelular de las células AVIC que sobreexpresan ColXIII (fusionado o no a EGFP). Estos resultados están de acuerdo con estudios publicados que evidencian que en otras células las moléculas de colágeno, y en particular colágeno XIII, se sintetizan, y posteriormente se escinden y el ectodominio se secreta al medio extracelular [41]. En el caso de AVIC, el colágeno XIII se acumula en el medio extracelular, por lo que no se degrada, posiblemente porque no hay proteasas específicas para dicha molécula. Además, por otra parte, se demuestra que se da una mayor secreción y acumulación en aquellas células AVIC cuya transfección se lleva a cabo por el *Método con Lipofectamina* respecto con *Turbofectin*. Por tanto, las células que expresan más colágeno XIII también lo secretan en mayor medida.

Una vez optimizados los métodos de transfección, se pasó al objetivo 2 estudiando el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de COX2 e ICAM-1, proteínas pro-inflamatorias que en estudios previos se inducen bajo el efecto de agentes pro-inflamatorios [33,34]. Inicialmente, se emplearon plásmidos que expresan colágeno-EGFP, donde, para ambos métodos, la sobreexpresión tanto de colágeno XIII-EGFP como de EGFP inducen la expresión de COX2 e ICAM-1. Como conclusión del análisis actual se puede afirmar que estos plásmidos no son adecuados para evaluar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de proteínas pro-inflamatorias en AVIC.

Para confirmar que el resultado inesperado de inducción con pc3.1-EGFP era atribuible a la sobreexpresión de EGFP, se probó pMax, que expresa EGFP. Se confirmó que la sobreexpresión de EGFP con otro plásmido también estimula de modo artefactual a las células. Por tanto, el plásmido *pc3.1-ColXIII-EGFP* no es adecuado para estudiar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la Inducción de Proteínas Proinflamatorias. No se sabe a qué nivel puede afectar la expresión de EGFP, quizás a nivel de estrés del retículo, pero está claro que su sobreexpresión en células primarias puede no ser tan inocua como a veces se piensa. Lo que si podemos descartar es que el efecto de *pc3.1-EGFP* se deba a restos de endotoxina, pues en las preparaciones de DNA se usó un método que purifica DNA libre de endotoxinas. Este aspecto es importante, pues en estudios previos del grupo se ha descrito que LPS induce COX2 e ICAM-1 [34].

Para subsanar los problemas anteriores, solicitamos, a los colaboradores, nuevos plásmidos que no expresaran EGFP y se comenzó de nuevo el proceso de puesta a punto de la transfección. Con ambos métodos, la sobreexpresión de colágeno XIII induce COX2 e ICAM-1 de modo significativo con respecto al vector vacío. Mediante un *Diseño Factorial 2^k Sin Réplicas* se obtuvo que el *Método de Transfección* y el *Plásmido* afectan significativamente en la inducción de COX2 y de ICAM1, siendo mayor la inducción con *Lipofectamina*. Que sea significativo el efecto del *Plásmido* significa que existen diferencias

en la inducción dependiendo del plásmido empleado, donde la inducción debida al vector vacío es menor que la debida a *pc3.1-ColXIII*. De hecho, la mayor inducción de ICAM-1 y de COX2, en el dominio experimental ensayado, corresponde a la combinación de niveles 48 horas, *pc3.1-ColXIII* y Lipofectamina. Por tanto, el plásmido *pc3.1-ColXIII* puede considerarse adecuado para evaluar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII en la inducción de ICAM-1 y COX2, a diferencia de los plásmidos que expresan EGFP. En el caso del experimento con plásmidos sin EGFP, el tamaño muestral ha sido menor dadas las limitaciones técnicas con el anticuerpo anti-colágeno XIII. El siguiente paso será resolver los problemas técnicos con el anticuerpo anti-colágeno XIII, aumentar el tamaño muestral y analizar otras moléculas pro-inflamatorias así como moléculas que inducen osteogenesis, otro proceso clave en la patogenia de la estenosis aórtica. Además, sería interesante intentar obtener una línea estable de células tranfectadas con colágeno XIII, usando higromicina para la selección de los clones que hayan integrado el DNA plasmídico en su genoma. Con ella se podría estudiar el efecto del colágeno XIII en calcificación *in vitro*, ya que se sabe que el colágeno XIII puede regular la masa ósea [41].

7 Conclusiones.

- 1) Tanto el método de Lipofectamina como el de Turbofectin se pueden usar para la sobreexpresión de colágeno XIII en células adherentes AVIC.
- 2) Con ambos métodos se observa una baja eficiencia de transfección, aunque es mayor en el método de Lipofectamina que en el de Turbofectin.
- 3) Las proporciones óptimas de DNA:Reactivo de transfección en AVIC son 4:2 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) para el método de Lipofectamina y 3:3 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) para el método de Turbofectin.
- 4) El colágeno XIII sobreexpresado en células AVIC se secreta y acumula en el medio extracelular.
- 5) El plásmido *pc3.1-ColXIII-EGFP* no es adecuado para estudiar el efecto de la sobreexpresión de colágeno XIII a nivel de inducción de proteínas proinflamatorias dado el efecto artefactual de la proteína EGFP.
- 6) La sobreexpresión de colágeno XIII en células AVIC induce de modo estadísticamente significativo la expresión de ICAM-1 y COX2, lo que está de acuerdo con un fenotipo pro-inflamatorio que subyace en los estadios iniciales de la estenosis aórtica.
- 7) En el dominio experimental ensayado, la mayor inducción observada, tanto de ICAM-1 como de COX2, corresponde a la combinación del plásmido *pc3.1-ColXIII* con el reactivo Lipofectamina a las 48 horas.

8 Bibliografía.

1. Koeppen BM. and Staton BA. *Fisiología*. Elsevier. Sexta edición.
2. Butcher JT, Mahler GJ and Hockaday LA. *Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solution*. Advanced Drug Delivery Review. 2011; 63: 242-68.
3. Merryman WD. *Mechano-potencial etiologies of aortic valve disease*. J. Biomech. 2010; 43 (1): 87-92.
4. Mendelson K. and Schoen FJ. *Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress and challenges*. Annals of Biomedical Engineering. 2006; 34 (12): 1799-1819.
5. Yetkin E. and Waltenberger J. *Molecular and cellular mechanism of aortic stenosis*. International Journal of Cardiology. 2009; 135: 4-13.
6. Freeman RV and Otto CM. *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. Circulation. 2005; 111: 3316-26.
7. Walker GA. et Al. *Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor- β : implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease*. Circ Res. 2004; 95: 253-260.
8. O'Brien KD. *Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 1721-1728.
9. Miller JD, Weiss RM and Heistad DD. *Calcific aortic valve stenosis: methods, models and mechanism*. Circ Res. 2011; 108: 1392-1412.
10. Rojas Velasco G. et Al. *Historia natural de la estenosis aórtica. Diagnóstico y tratamiento*. Acta Médica Grupo Ángeles. 2012; 10 (4): 200-206.
11. Selser A. *Changing aspects of the natural history of valvular aortic stenosis*. New Engl J Med. 1987; 317: 91-98.
12. Branchetti E. et Al. *Antioxidant Enzymes Reduce DNA Damage and Early Activation of Valvular Interstitial Cells in Aortic Valve Sclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33: e66-74.
13. Boudoulas H. *Etiology of valvular heart disease in the 21st century*. Hellenic Journal of Cardiology. 2002; 43: 183-188.

14. Helse S. et Al. *Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process*. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18: 483-491.
15. Otto CM. et Al. *Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. *Circulation*. American Heart Association. 1994; 90 (2): 844-853.
16. Rajamannan NM. *Calcific aortic stenosis lessons learned from experimental and clinical studies*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29: 162-168.
17. Zhang X. et Al. *Twist-related protein 1 negatively regulated osteoblastic transdifferentiation of human aortic valve interstitial cells by directly inhibiting runt-related transcription factor 2*. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2014; 1-9.
18. Baumgartner H. et Al. *Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice*. *European Journal of Echocardiography*. 2008; 1-25.
19. Patherl JH., Mathew ST, Hennebry TA. *Transcatheter aortic valve replacement: a potential option for the nonsurgical patient*. *Clin Cardiol*. 2009; 32 (6): 296-301.
20. Makkar RR. et Al. *PARTNER Trial Investigators. Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis*. *N Engl J Med*. 2012; 366 (18): 1696-1704.
21. Owell CJ. et Al. *A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis*. *N Engl J Med*. 2005; 352: 2389-2397.
22. Osseba RA. et Al. *Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis*. *N Engl J Med*. 2008; 359: 1343-1356.
23. O'Brien KD et Al. *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and change in aortic valve calcium. Formerly Archives of Internal Medicine*. 2005; 165: 858-862.
24. Innamithu AL. and Katz WE. *Effect of bisphosphonates on the progression of degenerative aortic stenosis*. *Echocardiography*. 2011; 28: 1-7.
25. Aksoy O et Al. *Do bisphosphonates slow the progression of aortic stenosis?*. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59: 1452-1459.
26. Stewart RA. *A randomized trial of the aldosterone-receptor antagonist eplerenone in asymptomatic moderate-severe aortic stenosis*. *Am Heart J* 2008; 156: 348-355.
27. Mann DL. *The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls*. *Circ Res*. 2011; 108: 1133-1145.
28. Soini Y. et Al. *Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis*. *Hum Pathol*. 2003; 34 (8): 756-763.
29. Takeuchi O. and Akira S. *Pattern Recognition Receptors and inflammation*. *Cell*. 2010; 140: 805-820.
30. Regueiro González JR., López Larrea C., González Rodríguez S., Martínez Naves E. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune*. Editorial Médica Panamericana. 3ª Edición Revisada.
31. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Biología Moléculas de la Célula*. Editorial OMEGA. 5ª edición.
32. Weis RM., Miller JD., Heistad DD. *Fibrocalcific aortic valve disease: opportunity to understand disease mechanism using mouse models*. *Circ Res*. 2013; 113 (2): 209-222.
33. Fernández-Pisonero I, López J, Onecha E, Dueñas AI, Maeso P, et al. *Synergy between Sphingosine 1-Phosphate and Lipopolysaccharide Signaling Promotes an Inflammatory, Angiogenic and Osteogenic Response in Human Aortic Valve Interstitial Cells*. *PLoS ONE*. 2014; 9(10): e109081.
34. López J. et Al. *Viral and bacterial patterns induce TLR-mediated sustained inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells*. *Int J Cardiol*. 2010 158: 18-25.
35. Meng X. et Al. *Expression of functional Toll-like Receptor 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294: C29-C35.
36. Yang X. et Al. *Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like Receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenic protein 2*. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53 (6): 491-500.
37. Kaden JJ et Al. *Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis*. *Cardiovascular Pathology*. 2005; 14(2): 80-87.
38. Towler DA. *Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease*. *Circ Res*. 2013; 113: 198-208.
39. Yu Z et Al. *Tumor necrosis factor- α accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011; 337: 16-23.
40. Curtiss LK. and Tobias PS. *Emerging role on Toll-like Receptors in atherosclerosis*. *The Journal of Lipid Research*. 2009; 50 :S340-S345.
41. Heikkinen A. et Al. *Collagen XIII: a type II transmembrane protein with relevance to musculoskeletal tissues, microvessels and inflammation*. *int J Biochemistry and Cell Biology*. 2012; 44: 714-717.
42. Lizarbe MA. *Horizontes Culturales: Las Fronteras de la Ciencia. El colágeno, ¿Un cemento biológico que mantiene la arquitectura y plasticidad tisular?*. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Espasa. 2000; 119-138.
43. El Hussein D. et Al. *P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: Implication for calcific aortic valve disease*. Elsevier, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014; 72: 146-156.
44. Miller JN. y Miller JC. *Estadística u Quimiometría para Química Analítica*. Prentice Hall. 4ª Edición.
45. Pérez A. *Estadística Aplicada: Conceptos básicos*. UNED. 3ª Edición.
46. Kuehl RO. *Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. Matemáticas Thomson. 2ª Edición.
47. Juan J. y Peña D. *Análisis de diseños factoriales sin replicación*. *Trabajos de Estadística*. 1991;6(1):63-80.

ANEXO I: Abreviaturas.

AVIC: Células intersticiales de Válvula Aórtica.

VEGF: Factor de Crecimiento de los Vasos Sangíneos.

ICAM: Molécula de Adhesión Intercelular.

COX: Ciclooxygenasa.

IL: Interleucina.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TLRs: Receptores Tipo Toll.

BMP: Proteína Morfogénica Ósea.

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad.

LPS: Lipopolisacárido o Endotoxina.

pc3.1: pcDNA3.1/Hygro(+).

pc3.1-ColXIII: pcDNA3.1/Hygro(+)/huColXIII.

Lipofectamina: Lipofectamina 2000.

Turbofectin: Turbofectin 8.0.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

TTBS: Buffer Salino de Tris con Tween. Receta en página 12.

HRP: Peroxidasa de Rábano.

FBSi: Suero de Ternera Fetal Inactivo.

EGFP: Proteína Fluorescente Verde.

DO: Densidad Óptica.

DO-: Densidad Óptica Sin Plásmido.

DEE: Diseño Estadístico de Experimentos.

ANOVA: Análisis de Varianza.

ColXIII (Como texto o Autorradiografía digitalizada de Western Blot): Colágeno XIII.

ColXIII (Como coordenada de una gráfica): pc3.1-ColXIII.

ColXIII-E (Como texto o Autorradiografía digitalizada de Western Blot): Colágeno XIII-EGFP.

ColXIII-E (Como coordenada de una gráfica): pc3.1-ColXIII-EGFP.