



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Instituto de Biología y Genética Molecular

Escuela de Doctorado

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

***“Inflamación y Metabolismo de Células Intersticiales de
Válvulas Aórticas Humanas”***

Autora:

Cristina Fraile Sánchez

Tutora:

Dra. M^a Carmen García Rodríguez

Valladolid, septiembre 2021

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. <i>Válvula aórtica humana</i>	1
1.1.1. <i>Estructura</i>	1
1.1.2. <i>Componentes celulares</i>	1
1.2. <i>Estenosis de válvula aórtica calcificada</i>	2
1.2.1. <i>Fisiopatología</i>	2
1.2.2. <i>Sintomatología y diagnóstico</i>	4
1.2.3. <i>Terapias actuales y perspectivas futuras</i>	4
1.3. <i>Fenotipo y diferenciación de VICs</i>	5
1.4. <i>Estabilización del factor inducible por hipoxia HIF-1α y metabolismo celular</i>	6
2. Hipótesis y objetivos	8
3. Material y métodos	9
3.1. <i>Cultivo primario de células explantadas de válvulas aórticas humanas (aVICs, miofibroblastos)</i>	9
3.2. <i>Obtención de cultivos primarios de fibroblastos (qVICs) a partir de cultivos primarios de aVICs</i>	9
3.3. <i>Activación celular</i>	10
3.4. <i>Análisis de proteínas mediante Western blot</i>	11
3.5. <i>Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR</i>	11
3.5.1. <i>Extracción de ARN total</i>	11
3.5.2. <i>Síntesis del ADN complementario</i>	12
3.5.3. <i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>	12
3.6. <i>Análisis metabólico en tiempo real</i>	12
4. Resultados	13
4.1. <i>Comprobación del fenotipo de cultivos primarios de aVICs y qVICs</i>	13
4.2. <i>En respuesta a IFN-γ y LPS en normoxia, se induce la estabilización del factor HIF-1α tanto en aVICs como en qVICs</i>	14
4.3. <i>Tras la estimulación con IFN-γ y LPS se inducen genes regulados por HIF-1α e implicados en la glicólisis, tanto en aVICs como en qVICs</i>	15
4.4. <i>IFN-γ y LPS promueven la acidificación extracelular en aVICs y qVICs</i>	17
5. Discusión	19
6. Conclusiones	21
7. Referencias	22
ANEXO I - MATERIAL	26

ABREVIATURAS

α -SMA	alfa-Actina de músculo liso
aVIC	Célula intersticial de válvula aórtica parcialmente activada (fenotipo miofibroblástico)
CAVD	Enfermedad de la válvula aórtica calcificada
ECAR	Tasa de acidificación extracelular
ECM	Matriz extracelular
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLUT1	Transportador de glucosa 1
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia-1 alfa
HKII	Hexoquinasa II
IFN- γ	Interferón gamma
IL-6	Inteleuquina6
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LPS	Lipopolisacárido
NF- κ B	Factor nuclear-kappa B
obVIC	Célula intersticial de válvula aórtica osteoblástica
ox-LDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
PBS	Tampón fosfato salino
PFKFB3	6-Fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3
PKM2	Piruvato quinasa M2
qVIC	Célula intersticial de válvula aórtica quiescente (fenotipo fibroblástico)
RT-qPCR	Reacción de la transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SMM	Miosina de músculo liso
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEC	Célula endotelial valvular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial valvular
VIC	Célula intersticial de válvula aórtica

1. Introducción

1.1. Válvula aórtica humana

El corazón se encuentra dividido en cuatro cámaras, dos aurículas (atrios) en la parte superior y dos ventrículos en la parte inferior. A su vez, se pueden distinguir cuatro válvulas cardíacas. Todas ellas responden a cambios de presión, abriéndose para permitir el paso de la sangre o cerrándose para impedir el reflujo a medida que el corazón se contrae y relaja respectivamente. De esta forma, las cuatro válvulas están diseñadas para establecer un flujo unidireccional.¹

1.1.1. Estructura

En concreto, la válvula aórtica está formada por tres valvas avasculares con aspecto de medialuna y un grosor de ≤ 1 mm. Se une a la arteria principal a través de un anillo fibroso al que se adhieren las tres valvas. Permite la eyección de la sangre desde el corazón hasta la aorta y evita el reflujo de sangre hacia el ventrículo. Cuando este se contrae, la presión dentro de la cámara aumenta y la válvula se abre, mientras que, cuando el ventrículo se relaja, la válvula se cierra impidiendo la comunicación entre este y la aorta.²⁻⁴

1.1.2. Componentes celulares

Las valvas presentan una capa externa de células endoteliales valvulares (VECs) y tres capas internas compuestas por células intersticiales valvulares (VICs), denominadas fibrosa, esponjosa y ventricular, atendiendo a su disposición anatómica y composición celular (Fig. 1).⁴

Las VECs se localizan en las superficies de contacto con la sangre y regulan la permeabilidad, la adhesión de las células inflamatorias y la señalización paracrina, manteniendo así la homeostasis valvular. Por su parte, las VICs secretan la matriz extracelular (ECM), que incluye colágeno, elastina y glicosaminoglicanos, que proporcionan fuerza y elasticidad a la válvula. Se organizan en subpoblaciones dentro de las tres capas. La capa fibrosa es una extensión del anillo fibroso, por lo que se encuentra en el lado aórtico de la válvula y presenta abundantes haces de colágeno tipo I y III, responsables de la resistencia mecánica. La capa central, esponjosa, es rica en proteoglicanos y glicosaminoglicanos que reordenan la estructura interna al deformarse durante el ciclo cardíaco. Por último, la capa ventricular, del lado del ventrículo izquierdo, está constituida por fibras elásticas, tales como elastina, que amortiguan la presión que ejerce el flujo de la sangre.^{5,6}

Este patrón arquitectónico descrito es similar en las cuatro válvulas cardíacas y es necesario para que mantengan la resistencia y durabilidad requeridas para soportar las presiones y tensiones del ciclo cardíaco durante años. Sin embargo, en la válvula cardíaca este conjunto especializado de células y una matriz extracelular heterogénea que definen su estructura, puede verse alterado ante la exposición de estrés bioquímico (hipercolesterolemia, hiperglucemia, etc.) o mecánico (fuerza de cizalla debido al flujo turbulento de la sangre en la salida hacia la aorta, etc.). Esto conduce a un engrosamiento y fibrosis de las valvas, con evidencia de inflamación, neovascularización y calcificación.^{7,8}

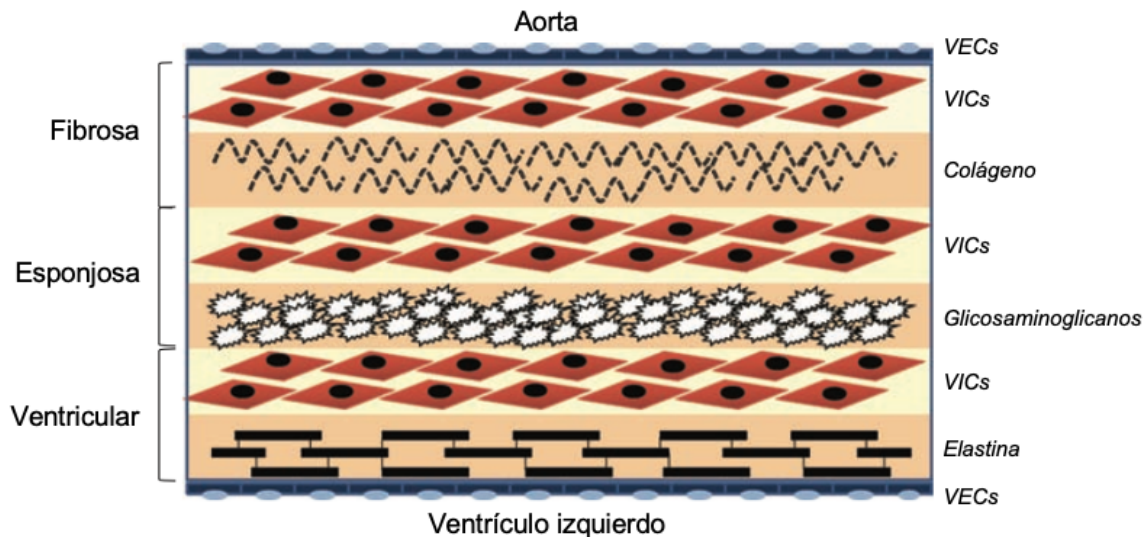


Figura I. Composición estructural y celular de la válvula aórtica. Las VECs recubren la superficie exterior de la válvula y funcionan como una barrera. Las tres capas intermedias de la válvula son la fibrosa, esponjosa y ventricular. Estas contienen VICs como el tipo de célula predominante. La fibrosa es la más próxima al lado aórtico de la válvula, contiene colágeno tipo I y III y su función es la de soporte de carga. La esponjosa contiene glicosaminoglicanos que lubrican las otras capas durante el ciclo cardíaco. La ventricular contiene fibras de elastina para disminuir la presión hidrodinámica.⁴ VECs = células endoteliales valvulares; VICs = células intersticiales valvulares.

1.2. Estenosis de válvula aórtica calcificada

La estenosis de válvula aórtica calcificada (CAVD) es la valvulopatía más común en el mundo occidental. Comprende las alteraciones iniciales en la biología celular de las valvas hasta la calcificación en la etapa terminal que concluye con estenosis aórtica, es decir, resulta en la obstrucción del flujo de salida del ventrículo izquierdo por estrechamiento de la apertura de la válvula aórtica. Es una enfermedad multifacética cuyo único tratamiento posible actualmente es el reemplazo valvular, lo que justifica la necesidad clínica por desarrollar nuevas estrategias para su prevención.⁹⁻¹¹

1.2.1. Fisiopatología

La CAVD ocurre tanto en válvulas aórticas normales, tricúspides, como en válvulas aórticas bicúspides. Aunque la prevalencia de esta anomalía congénita es solo del 0.5-1.0%, las válvulas bicúspides representan casi la mitad de válvulas reemplazadas por estenosis.¹² Es cada vez más común a medida que envejece la población y presenta además claras diferencias entre ambos sexos. De hecho, las mujeres tienden a desarrollar enfermedades cardiovasculares en promedio 10 años después que los hombres, quienes tienen mayor calcificación valvular para una determinada gravedad de la enfermedad y desarrollan diferentes patrones de fibrosis valvular y remodelado de la ECM en respuesta a la sobrecarga.^{13,14}

Durante mucho tiempo, se ha considerado que la CAVD consistía en una enfermedad degenerativa causada por el desgaste dependiente del tiempo de las valvas y la deposición pasiva de calcio.¹⁵ Aunque el estrés mecánico y las lesiones siguen siendo fundamentales para su fisiopatología, los estudios clínicos actuales sugieren que consiste en una enfermedad multifacética que se desarrolla como parte de una serie de procesos altamente complejos y estrictamente regulados, entre los que la inflamación juega un papel importante.¹⁶ En particular, se puede dividir en dos fases distintas, una fase inicial caracterizada por mecanismos parecidos a los de la aterosclerosis, y una fase de propagación con similitudes a la formación de hueso esquelético (Fig. II).¹⁷

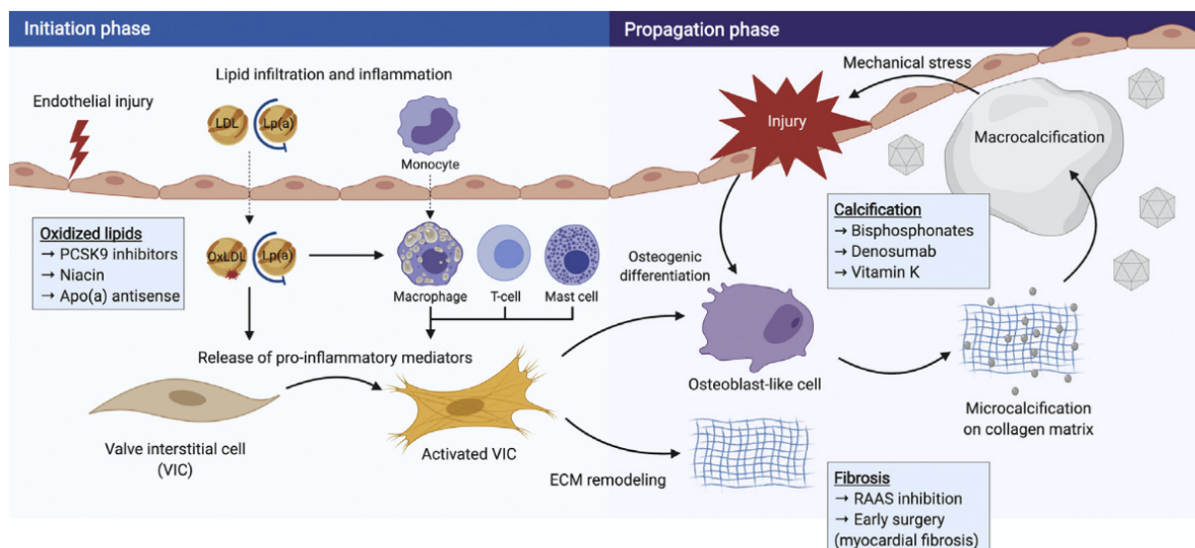


Figura II. Patogénesis de la CAVD. Fase de inicio: debido a una lesión endotelial, LDL y Lp(a) se infiltran y acumulan en la capa fibrosa subendotelial y sufren una modificación oxidativa. Esto provoca una respuesta inflamatoria crónica que involucra a macrófagos, células T y mastocitos, lo que lleva a la activación de las VICs y la liberación de vesículas extracelulares que proporcionan un soporte para la calcificación. Fase de propagación: las células activadas regulan la remodelación de la ECM y se diferencian en osteoblastos, que desencadenan una calcificación adicional que da como resultado un círculo vicioso.⁹ LDL = lipoproteína de baja densidad; Lp (a) = lipoproteína (a); VICs = células intersticiales valvulares; ECM = matriz extracelular.

➤ Fase de inicio

Comienza por un daño endotelial debido al estrés mecánico que soporta la válvula, siendo este el más elevado de todo el organismo. Este daño aumenta aún más en el caso de la válvula aórtica bicúspide. La estructura característica de dos valvas da como resultado una disipación menos eficiente de la tensión mecánica y daño endotelial acelerado, de modo que casi todos los pacientes desarrollan estenosis y muestran además una progresión de la enfermedad más rápida.¹⁸ Esta activación provoca una infiltración lipídica en la válvula, en concreto, lipoproteína (a) (Lp(a)) y lipoproteínas de baja densidad (LDLs). El daño endotelial progresivo junto con la oxidación de lípidos desencadenan una respuesta inflamatoria dentro del endotelio valvular que involucra macrófagos, linfocitos T y mastocitos.¹⁹ En esta etapa se observan además regiones de microcalcificación, iniciada por la liberación de cuerpos apoptóticos y vesículas extracelulares en estas áreas, que contienen los componentes necesarios para la deposición de cristales de calcio (incluidos iones de calcio y fosfato inorgánico) y facilitan la formación de cristales de hidroxapatita en forma de aguja.²⁰ A su vez, la deposición de hidroxapatita provocan más respuestas proinflamatorias de los macrófagos, creando un circuito de retroalimentación positiva de calcificación e inflamación en las primeras etapas de la enfermedad.²¹

El aparente vínculo entre los lípidos, la inflamación y la calcificación, muestra algunas similitudes patológicas con la aterosclerosis, también iniciada como respuesta a un daño endotelial. De hecho, ambas condiciones comparten muchos factores de riesgo, como la edad, el sexo masculino, el índice de masa corporal, el tabaquismo, la hipertensión y los niveles elevados de lípidos, entre otros.¹⁷ También se asocia con factores genéticos, pues muestra un efecto de agrupamiento probablemente consecuencia de estos.²²

➤ Fase de propagación

La fibrosis y la calcificación juegan un papel importante durante la progresión de la enfermedad. En el entorno inflamatorio de las lesiones valvulares, las células

intersticiales se activan y estimulan para que proliferen, produzcan colágeno y regulen la remodelación de la ECM.⁹ Esto da como resultado la acumulación de tejido fibroso que proporciona un soporte sobre el cual se puede desarrollar una calcificación progresiva, resultando en una mayor acumulación de calcio y rigidez de las valvas que, a su vez, aumenta el estrés mecánico y la lesión valvular, lo que provoca una mayor deposición de calcio.²³ Así, se establece un ciclo de calcificación autoperpetuante potenciado por mecanismos pro-osteogénicos que agravan la calcificación y la disfunción valvular.²⁴

La calcificación progresiva se justifica además por la diferenciación celular en un tipo similar a los osteoblastos, para lo que se han descrito numerosas vías reguladoras de calcificación que convergen corriente abajo para regular al alza factores de diferenciación osteogénica. Posteriormente, estas células secretan varias proteínas reguladoras de calcificación de modo similar a la formación de tejido óseo.²⁵ El proceso de diferenciación celular se explica con profundidad más adelante (ver apartado 1.3.).

1.2.2. Sintomatología y diagnóstico

En circunstancias normales, las tres valvas presentan una estructura delgada, lisa, flexible y móvil. En la CAVD, las valvas se engrosan, se vuelven fibrosas y calcifican, dando como resultado una movilidad reducida y una obstrucción valvular progresiva (Fig. III).¹⁷⁻¹⁹ Esto conduce a un aumento de la carga hemodinámica en el ventrículo izquierdo que no es capaz de superar tanto en reposo como durante el ejercicio. Este desequilibrio explica la sintomatología de la enfermedad. Con el fin de restaurar el estrés y mantener la función cardíaca, esto genera un aumento del grosor de la pared ventricular, conocido como hipertrofia ventricular izquierda. Sin embargo, el aumento de la hipertrofia se asocia con un pronóstico adverso y con el tiempo puede desencadenar insuficiencia cardíaca y el desarrollo de otros síntomas y eventos cardiovasculares.²⁹



Figura III. Progresión de la estenosis aórtica. Se esquematiza el engrosamiento y la consiguiente rigidez de las valvas que conduce a una obstrucción valvular progresiva.¹⁷

El diagnóstico y seguimiento de la CAVD se establece generalmente mediante imágenes no invasivas.¹⁰ En particular, la ecocardiografía es la técnica más comúnmente utilizada para evaluar la progresión de la estenosis, proporcionando información sobre la gravedad, el grosor de la pared del ventrículo y la posibilidad de estimar la calcificación valvular. No obstante, es la tomografía computarizada sin contraste la que proporciona un sistema de puntuación de calcificación más detallado y reproducible. A diferencia de las anteriores, la tomografía por emisión de positrones es una técnica de imagen que informa sobre la actividad de procesos biológicos específicos, como la inflamación y la calcificación que se pueden dirigir utilizando los marcadores ¹⁸F-fluorodeoxiglucosa (¹⁸F-FDG) y ¹⁸F-flúoruro de sodio (¹⁸F-NaF), respectivamente.^{27,28}

1.2.3. Terapias actuales y perspectivas futuras

Aunque numerosos factores de riesgo clínicos y genéticos se han asociado con la aparición y progresión de la CAVD, hasta el momento ninguna estrategia ha demostrado ser eficaz para la prevención primaria o secundaria de esta enfermedad.¹⁰ No se conoce ninguna farmacoterapia que reduzca la progresión de la estenosis o los efectos

adversos resultantes sobre la función ventricular izquierda. Por tanto, el reemplazo valvular es la única opción de tratamiento eficaz para la CAVD grave. Este proceso puede realizarse mediante intervención quirúrgica o transcáteter como alternativa a la cirugía.^{7,11}

A pesar de lo mencionado, múltiples estudios observacionales recomiendan farmacoterapias de uso común para detener o retrasar la progresión de la enfermedad. Se incluye el tratamiento para la hipertensión, que afecta a la válvula estenótica y acelera la hipertrofia ventricular; el empleo de estatinas, habitualmente empleadas para la reducción de lípidos en aterosclerosis e inflamación, si bien carecen de efecto una vez iniciada la fase de propagación cuando los mecanismos patológicos dominantes son la fibrosis y calcificación; tratamientos para enfermedades óseas como los bisfosfonatos y denosumab, que podrían tener un efecto beneficioso sobre la calcificación valvular; suplementación con vitamina K para inhibir la calcificación; agentes terapéuticos para reducir Lp(a); etc.²⁹

Hasta la fecha, la CAVD sigue siendo la valvulopatía más común en los países económicamente desarrollados cuya prevalencia aumenta drásticamente con la edad, siendo una carga de salud pública cada vez mayor debido al envejecimiento demográfico de la población mundial.³⁰ Todavía no se conoce el mecanismo molecular preciso, pero los procesos fisiopatológicos involucrados se están elucidando rápidamente. Se han identificado además nuevas dianas terapéuticas y técnicas de imagen que se pueden emplear para probar la eficacia de nuevos agentes e informar aún más nuestra comprensión fisiopatológica. De hecho, varios tratamientos farmacológicos potenciales están bajo investigación actual para lograr inhibir el desarrollo de la enfermedad. El fin es comprender el conocimiento de los mecanismos biomoleculares y abrir nuevas vías para el diagnóstico y el tratamiento.⁹

1.3. Fenotipo y diferenciación de VICs

Se ha demostrado que la inmunidad, tanto innata como adaptativa, desempeña un papel importante en la progresión de la CAVD.³¹ Las especies lipídicas oxidadas (ox-LDLs) podrían activar la respuesta inmune innata a través de los receptores tipo Toll (TLR) y la vía del factor nuclear-kappa B (NF-κB). Por el contrario, el papel de la inmunidad adaptativa aún se desconoce en su mayor parte, pero los estudios sugieren que un subconjunto de células T de memoria se activa durante la enfermedad.³²⁻³⁴

La activación de NF-κB promueve la expresión de diferentes citoquinas, tales como interleuquina 6 (IL-6) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), que desencadenan una transición osteogénica y mineralización valvular. Esto es, las VICs se activan y diferencian en miofibroblastos y osteoblastos, responsables de la fibrosis valvular y calcificación, respectivamente.³¹

➤ Células intersticiales quiescentes (qVICs)

En adultos, la gran mayoría (95-98%) de las VICs se encuentran inactivas, en estado quiescente (qVICs).⁶ Comprenden una población heterogénea, dinámica y altamente plástica, siendo cruciales para el funcionamiento de las válvulas cardiacas. Son capaces de modular su fenotipo en respuesta a cambios en la homeostasis valvular y reparar la ECM alterada por el daño mecánico o de otro tipo.⁴

En estado inactivo, la población se caracteriza por un fenotipo mayoritariamente fibroblástico, si bien <5% son miofibroblastos y algunas células de músculo liso. Los marcadores más utilizados para definirlos son vimentina y desmina, entre otros. Son proteínas de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular y funcionan como soporte celular.³⁵ En cuanto a su morfología, se caracterizan por ser células pequeñas con un núcleo grande, alargadas y compactas.³⁶

► Células intersticiales activadas (aVICs)

La activación y diferenciación miofibroblástica son procesos regenerativos comunes en todo el organismo. De hecho, las aVICs están presentes entre las qVICs que pueblan las válvulas aórticas normalmente. Estas células tienen características intermedias entre los fibroblastos y las células musculares lisas. Los marcadores que las diferencian son alfa-actina de músculo liso (α -SMA) y miosina de músculo liso (SMM), entre otros. La α -actina es una proteína de unión a actina que, conjuntamente con la miosina, permiten la concentración muscular. Los miofibroblastos se presentan con niveles mucho más altos de α -SMA y miosina ya que son mucho más activos en la contracción, pero muestran una disminución de vimentina.³⁵ Son células extendidas de mayor tamaño que los fibroblastos, con forma romboidal.³⁶

La plasticidad entre ambos fenotipos, fibroblastos y miofibroblastos, es reversible. Es más, las VICs de las válvulas fetales son predominante aVICs, mientras que las células de válvulas adultas son mayoritariamente qVICs como ya se ha indicado.³⁷ Sin embargo, en condiciones estándar de cultivo *in vitro* de válvulas adultas, se encuentra que >90% exhiben un fenotipo activado, ya que estas células parecen sufrir una rápida transformación a un fenotipo miofibroblástico cuando se cultivan en poliestireno.^{25,38} Para abordar esta limitación significativa, N. Latif, *et al.*, propusieron una formulación de medio que incluye FGF2, suero en baja concentración e insulina. El tratamiento con el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF2) reprime la activación para evitar que las VICs humanas se activen y diferencien espontáneamente, la reducción del contenido sérico del medio reduce los factores de crecimiento y la insulina actúa como mitógeno promoviendo la proliferación.³⁹ Esto permite reproducir la condición fenotípica de la válvula aórtica en su estado nativo y proporciona un mejor modelo celular para estudiar la biología y los mecanismos involucrados en la CAVD. Como alternativa a los cultivos 2D, otros investigadores han adoptado el cultivo celular en 3D, que mantiene un fenotipo fibroblástico inactivo y permite crear modelos biológicamente más relevantes al imitar el comportamiento *in vivo* de tejidos y órganos.⁴⁰

► Células intersticiales osteoblásticas (obVICs)

Los miofibroblastos pueden diferenciarse aún más a un fenotipo osteoblástico la de forma irreversible. En las válvulas, los primeros signos de calcificación suelen estar marcados por una mayor actividad de fosfatasa alcalina y la activación de los factores osteoblásticos Runx2 y BMP2. Runx2 es el factor transcripcional 2 relacionado con Runt, regulador maestro del linaje osteoblástico. BMP2 es la proteína morfogénica ósea 2, que juega un papel importante en el desarrollo del hueso y el cartílago. El indicador tardío y último de la calcificación es la mineralización detectada con rojo de alizarina, tinción de Von Kossa o colorante arsenazo.³⁵

1.4. Estabilización del factor inducible por hipoxia HIF-1 α y metabolismo celular

HIF-1 α es una de las subunidades del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1). Tiene una vida media corta ($t_{1/2} \sim 5$ min) y su transcripción y síntesis están altamente reguladas por oxígeno. En normoxia, las proteínas HIF-1 α se degradan rápidamente: la hidroxilación por el enzima proil hidroxilasa promueve la interacción de HIF-1 α con el complejo de ubiquitina ligasa E3, que lo marca con ubiquitina para su posterior degradación en el proteosoma.⁴¹ Durante la hipoxia, HIF-1 α se estabiliza y transloca desde el citoplasma hasta el núcleo, donde regula la expresión de más de 100 genes. Por tanto, HIF-1 α solo es estable en condiciones de hipoxia y resulta un regulador clave responsable de la inducción de genes que facilitan la adaptación y supervivencia celular en esas condiciones.⁴²

En las válvulas estenóticas, la remodelación estructural de la ECM conduce a un aumento significativo del espesor de la válvula aórtica reduciendo así la difusión de

oxígeno a través del tejido y creando un ambiente hipóxico. Como consecuencia, HIF-1 α se estabiliza e induce la expresión del factor de crecimiento endotelial valvular (VEGF) con la consiguiente formación de nuevos vasos sanguíneos para no solo superar el estado hipóxico sino también para sostener el proceso de calcificación.⁴³ Sin embargo, de modo similar a lo que sucede en procesos como el cáncer y en la respuesta inmunitaria, la estabilización de HIF-1 α ocurre, sorprendentemente, también en normoxia por la exposición de aVICs a agentes proinflamatorios como interferón-gamma (IFN- γ) y lipopolisacárido (LPS).⁴⁴

En el escenario inflamatorio de la CAVD, entre las citoquinas liberadas se encuentra el IFN- γ , una citoquina proinflamatoria conocida por ser activador de numerosos tipos celulares involucrados en la aterogénesis. Es además modulador de otras vías inmunes, como la señalización de TLR. Por su parte, el LPS es un ligando de TLR4, transportado por el torrente sanguíneo en el curso de la infección y/o daño endotelial. La confluencia de ambas señales proinflamatorias promueve una inducción inmune y no hipóxica de HIF-1 α que además exhibe fuertes diferencias específicas de sexo de los pacientes. Los resultados en VICs también revelan fuertes efectos proangiogénicos, proinflamatorios y procalcíficos del IFN- γ , que además promueve la diferenciación osteoblástica de las células, simulando el estadio temprano de la patología.⁴⁴

El factor HIF-1 α estabilizado es transcripcionalmente activo y regula la expresión de múltiples genes, incluidos genes implicados en el metabolismo, la proliferación celular y la angiogénesis.⁴² Por ejemplo, regula positivamente numerosos genes relacionados con la glicólisis, la principal ruta de obtención de energía de todas las células.⁴⁵ Entre ellos:

- *GLUT1*, gen que codifica para el transportador de glucosa 1. Esta proteína es responsable de la captación basal de glucosa requerida para sostener la respiración celular.
- *HKII*, gen que codifica para la hexoquinasa II. Este enzima cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato, iniciándose así la glicólisis.
- *PFKFB3*, gen que codifica para la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3. Este enzima cataliza la conversión de fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bisfosfato, estimulando la glicólisis.
- *PKM2*, gen que codifica para la piruvato quinasa M2. Es una isoenzima del enzima piruvato quinasa, que cataliza el último paso de la glicólisis, la desfosforilación del fosfoenolpiruvato a piruvato.

Tras la glicólisis en el citosol, por cada molécula de glucosa se obtienen 2 de piruvato, a partir de las cuales se obtiene energía por fosforilación oxidativa en condiciones aeróbicas en la mitocondria o bien, por fermentación láctica que no requiere oxígeno. En las células cancerosas, el metabolismo de la glucosa se encuentra alterado y se describe un aumento en la captación de glucosa, la glicólisis y los niveles de lactato, conocido como efecto Warburg.⁴⁶ De forma análoga a lo que ocurre en los tumores, la estimulación con IFN- γ y LPS no solo inducen HIF-1 α sino que también se ha descrito un aumento en la producción de lactato y, en consecuencia, un aumento en la acidificación extracelular.

2. Hipótesis y objetivos

Antecedentes:

- El cultivo primario de VICs de válvula aórtica en placas de plástico conduce a un fenotipo miofibroblástico (A. Rutkovsky, *et al.*).²⁵ Como alternativa, el cultivo en presencia de FGF2 inhibe la activación y reproduce el fenotipo mayoritariamente fibroblástico de las células valvulares (N. Latif, *et al.*).³⁹
- En normoxia, la estimulación de aVICs con los agentes proinflamatorios IFN- γ y LPS induce la estabilización del factor HIF-1 α (I. Parra-Izquierdo, *et al.*).⁴⁴
- El factor HIF-1 α regula la transcripción de múltiples genes, entre ellos, genes implicados en el metabolismo celular (G. N. Masoud & W. Li).⁴²
- La activación celular con IFN- γ y LPS promueve además la acidificación extracelular (T. Sánchez-Bayuela, *et al.*, datos aún no publicados).

Hipótesis planteadas:

- La exposición a los agentes proinflamatorios IFN- γ y LPS induce la estabilización de HIF-1 α en miofibroblastos (células parcialmente activadas, aVICs) y en fibroblastos (células quiescentes, qVICs).
- La exposición a los agentes proinflamatorios IFN- γ y LPS induce cambios metabólicos en aVICs y qVICs.

Objetivos propuestos:

- Estudio morfológico y del fenotipo de células cultivadas en plástico (aVICs) y de células que simulan el estado quiescente (qVICs).
- Comparar la inducción de HIF-1 α como respuesta a la estimulación con IFN- γ y LPS en normoxia en ambos tipos celulares.
- Comparar el efecto de la activación con IFN- γ y LPS en la expresión de genes implicados en la glicólisis regulados por HIF-1 α y en la acidificación extracelular en ambos fenotipos.

3. Material y métodos

La composición de los medios de cultivo y tampones, las referencias y la fuente de reactivos, kits y materiales empleados se pueden encontrar en el Anexo I.

3.1. Cultivo primario de células explantadas de válvulas aórticas humanas (aVICs, miofibroblastos)

Las muestras humanas incluyeron 3 válvulas aórticas tricúspides explantadas de pacientes receptores de trasplante de corazón sin valvulopatía e intervenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética local (protocolo no. P115-263). El consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes, en este caso, varones de 57 ± 6 años de edad.

Las VICs se aislaron mediante digestión con colagenasa y se cultivaron en medio de válvulas como se describe.^{47,48} El medio fue renovado cada 3-4 días y se realizaron los correspondientes pases celulares cuando las placas alcanzaban, aproximadamente, un 80% de confluencia celular. Esto es, se retiró completamente el medio por aspiración, los pocillos se lavaron con 1 mL de PBS estéril a temperatura ambiente y se incubaron 3-5 min a 37°C y 5% de CO₂ con 200 µL de tripsina-EDTA. Transcurrido ese tiempo, se comprobó al microscopio que las células se hubieran separado del fondo del pocillo (a diferencia de las células adherentes, las células en suspensión se caracterizan por presentar una morfología redondeada) y el enzima se inactivó con 1.5 mL de medio de cultivo con suero. El volumen contenido en los pocillos se recogió en un recipiente común, el recuento celular se realizó empleando la cámara de contaje Malassez y, finalmente, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos. Para permitir la adhesión celular, se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente, las células exhibían el fenotipo miofibroblástico (aVIC) esperado.

Para los experimentos, las células entre pase 4 y 6 se cultivaron con una concentración final de 100.000 células/pocillo. Tras 24 h, el medio de válvulas se cambió por 1 mL de medio control (MC).

3.2. Obtención de cultivos primarios de fibroblastos (qVICs) a partir de cultivos primarios de aVICs

Para los experimentos, las células entre pase 4 y 6 se cultivaron con una concentración final de 100.00 células/pocillo como se describe en el apartado 3.1. Tras 24 h, el medio de válvulas se cambió por 1 mL de medio fibroblástico (FIB), que incluye FGF2, suero en baja concentración e insulina para revertir y mantener el fenotipo fibroblástico (qVIC), reproduciendo el protocolo descrito por N. Latif, *et al.*³⁹

Los cultivos en medio MC y en FIB se mantuvieron en cultivo durante dos semanas a 37°C y 5% de CO₂, renovando el medio cada dos días. De forma periódica, también se comprobó y fotografió la morfología celular de ambos fenotipos empleando un microscopio óptico invertido (*Nikon Eclipse TS100*) acoplado a una cámara (*Nikon Digital Sight*).

Para la edición y presentación de las imágenes se utilizaron los programas *Adobe Photoshop* y *Adobe Illustrator*.

3.3. Activación celular

1. Procedimiento de activación celular para los ensayos de Western blot y RT-qPCR

La Fig. IV resume el procedimiento llevado a cabo. Tras 14 días en cultivo, se recogió el contenido proteico o el extracto de ARN referentes al “tiempo 0” y tras 24 h de tratamiento en las condiciones que se indican a continuación (“tiempo 24”).

- Células en reposo. En cultivos de aVICs, el medio control (MC) se sustituyó por 1 mL de medio de activación (MA); mientras que en los cultivos de qVICs el medio fibroblástico (FIB) simplemente se renovó.
- Células activadas con una combinación de los agentes proinflamatorios IFN- γ (100 ng/mL) y LPS (1 μ g/mL). Los cultivos de aVICs se activaron sobre medio de activación (MA) y los cultivos de qVICs sobre medio fibroblástico (FIB).

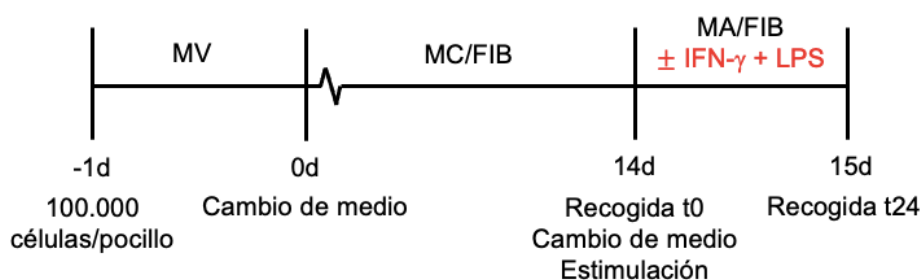


Figura IV. Esquema del procedimiento para Western blot y RT-qPCR. En la parte superior de la línea temporal se indica el medio en el que permanecen las células en cultivo, mientras que en la parte inferior se recogen los pasos más relevantes. FIB = medio fibroblástico; MA = medio de activación; MC = medio control; MV = medio de válvulas.

2. Procedimiento de activación celular para el análisis metabólico en tiempo real

La Fig. V resume el procedimiento llevado a cabo. Tras 14 días en cultivo, las células cultivadas en medio control (MC) y en medio fibroblástico (FIB) se sembraron en placa de 24 pocillos empleadas en el analizador metabólico *Seahorse XFe24*. Para ello, después del recuento celular, el volumen recogido se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 7 min y el pellet resultante de células se resuspendió en el medio correspondiente, MC o FIB, para lograr una concentración final de 30.000 células/100 μ L/pocillo. La placa se incubó 1 h a temperatura ambiente y posteriormente 24 h a 37°C y 5% de CO₂ para que las células se adhirieran. Al día siguiente, se renovó el medio y se trataron como se indica a continuación.

- Células en reposo. Los medios MC y FIB se sustituyeron por 1 mL de medio de activación sin L-glutamina, específico para el analizador *Seahorse XFe24*.
- Células activadas con una combinación de los agentes proinflamatorios IFN- γ (100 ng/mL) y LPS (1 μ g/mL). Todos los cultivos se activaron sobre medio de activación sin L-glutamina.

Después de 24 h tras la estimulación celular, se examinaron las células bajo microscopio para confirmar la adherencia celular y la confluencia del cultivo. Después, los pocillos se lavaron con 200 μ L del medio *Seahorse* (SH) específico para el análisis mediante la tecnología *Seahorse XFe* y se añadieron 500 μ L/pocillo del mismo medio. La placa se incubó durante 1 h a 37°C en ausencia de CO₂ y posteriormente se realizó el ensayo correspondiente (ver apartado 3.7.).

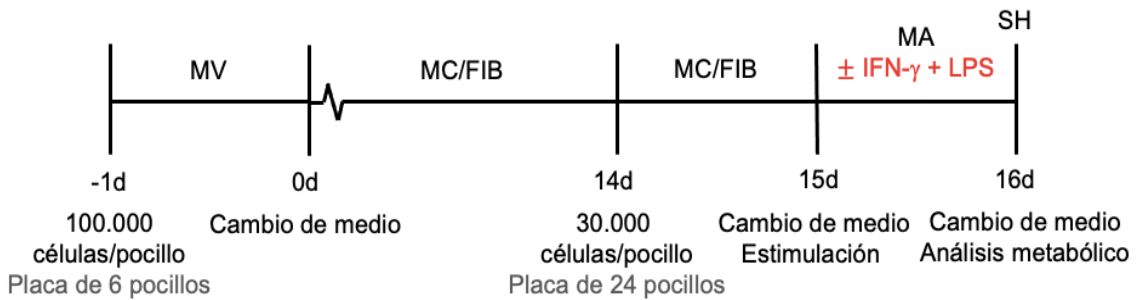


Figura V. Esquema del procedimiento para el análisis metabólico. En la parte superior de la línea temporal se indica el medio en el que permanecen las células en cultivo, mientras que en la parte inferior se recogen los pasos más relevantes. FIB = medio fibroblástico; MA = medio de activación; MC = medio control; MV = medio de válvulas; SH = medio Seahorse.

3.4. Análisis de proteínas mediante Western blot

Para la recogida de proteína, se retiró completamente el medio por aspiración, los pocillos se lavaron con 1 mL de PBS frío y el extracto proteico se recogió por raspado con 75 μ L de tampón de lisis celular. Tras la centrifugación a 16.100 g durante 20 min a 4°C se recogió el sobrenadante. La proteína total extraída se cuantificó empleando el kit comercial *BCA assay* siguiendo las instrucciones del fabricante. La recta de calibrado se realizó con diluciones seriadas de BSA. Se añadieron 15 μ L del tampón de carga 5X al contenido proteico restante, las muestras se calentaron 5 min a 100°C y se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

La electroforesis se desarrolló siguiendo el método SDS-PAGE, es decir, en condiciones desnaturizantes empleando geles de poliacrilamida. Las muestras se calentaron 5 min a 100°C y se cargaron en los distintos pocillos del gel, así como un marcador de pesos moleculares. La separación mediante electroforesis se realizó a 25 mA/gel en el tampón correspondiente (ver Anexo I). Una vez completada, las proteínas se transfirieron del gel a la membrana. La transferencia se llevó a cabo en frío durante 2 h a 200V en el tampón adecuado (ver Anexo I). La membrana se lavó con TBS y posteriormente se incubó con una solución de bloqueo de los sitios de unión inespecíficos de anticuerpos durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés (ver Anexo I, Tabla 1) toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, se lavaron con TTBS, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (ver Anexo I, Tabla 2) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave y se volvieron a lavar con TTBS. Para la detección de proteínas, las membranas se incubaron durante 1 min en una disolución 1:1 preparada con cada uno de los reactivos del kit comercial *ECL* y se expusieron a películas autorradiográficas que se revelaron automáticamente en el equipo *Curix-60* (Agfa-Gevaert).

Las películas reveladas se escanearon en el densitómetro *GS-800 Calibrated Densitometer* (Bio-Rad) y se analizaron con el programa *Quantity One* (Bio-Rad). Para obtener los valores de densidad óptica (DO), se multiplicó el valor DO/mm² obtenido por el área de cada banda seleccionada y se normalizaron frente a los correspondientes valores de DO de β -Tubulina. Para el análisis de datos y la representación gráfica se empleó el programa *GraphPad Prism 7.0*.

3.5. Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR

3.5.1. Extracción de ARN total

Para aislar el ARN, se retiró completamente el medio por aspiración, los pocillos se lavaron con 1 mL de PBS estéril atemperado y se incubaron 10 min a temperatura

ambiente con 1 mL de TRIzol. Se añadieron 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y la mezcla se incubó 3 min a temperatura ambiente. Para la separación de fases, la mezcla se centrifugó a 12.000 g durante 20 min a 4°C y se recogió la fase acuosa sobre la que se añadieron 500 μ L de isopropanol. Se agitó de nuevo vigorosamente, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. El precipitado de ARN se lavó con 1 mL de etanol al 75% en H₂O-DEPC y se dejó secar al aire. Finalmente, el ARN total resuspendido en 15 μ L de H₂O DEPC, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y 10 min a 58°C. La cantidad de ARN presente en la muestra se cuantificó con el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) analizando la ratio entre absorbancias A260/A280.

3.5.2. Síntesis del ADN complementario

Para la síntesis de ADN complementario se partió de 1000 a 1500 ng de ARN extraído que se diluyeron con H₂O milli-Q hasta un volumen final de 10.5 μ L. Se añadieron 2 μ L de la mezcla 1 (ver Anexo 1) por cada condición y se incubó a 65°C durante 5 min. Después, las muestras se enfriaron rápidamente en hielo y se añadieron 6.5 μ L de la mezcla 2 (ver Anexo 1) a cada una de ellas. Se incubaron 2 min a 37°C y se añadió 1 μ L de M-MLV RT, enzima transcriptasa reversa que cataliza la síntesis de ADN complementario a partir de ARN. Las muestras se incubaron 10 min a temperatura ambiente y 50 min a 37°C. Para detener la acción del enzima, se realizó una última incubación a 70°C durante 15 min. Por último, se añadió el volumen correspondiente de H₂O milli-Q para que la cantidad de ADN complementario presente en todas las muestras fuera de 20 ng. Estas se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

3.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real

Los genes de interés se amplificaron mediante PCR cuantitativa. Por condición experimental, se añadieron 9.2 μ L de muestra, 0.4 μ L de los cebadores sentido y anti-sentido correspondientes (ver Anexo I, Tabla 3) y 10 μ L de SYBRgreen a cada pocillo de la placa. La reacción se realizó en el termociclador *LightCycler 480 II* (Roche Diagnostics). Las condiciones fueron las siguientes: (i) desnaturalización inicial durante 5 min a 95°C; (ii) 45 ciclos de tres pasos: 95°C durante 15 seg (desnaturalización del DNA), 60°C durante 20 seg (hibridación del DNA) y 72°C durante 5 seg (elongación del DNA); (iii) ciclo final de 5 seg a 100°C y 1 min a 55°C, seguido de 10 seg a 4°C.

Los niveles de transcripción basal se refirieron al valor del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*) como control endógeno ($2^{-\Delta C_t}$, C_t = valor de umbral de ciclo). Los niveles de transcripción relativos se calcularon según el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (relativo a *GADPH* y a condiciones basales). Para el análisis de los resultados y la representación gráfica se empleó el programa *GraphPad Prism 7.0*.

3.6. Análisis metabólico en tiempo real

Se evaluó la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en tiempo real en las células sembradas y activadas como se ha descrito en el apartado 3.3, para lo que se empleó el analizador de flujo *Seahorse XFe24* (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, primero se hidrató el cartucho del kit comercial *Flux Packs* al menos 4 h antes. Esto es, se incubó a 37°C en ausencia de CO₂ con 500 μ L/pocillo del calibrante. Luego, se introdujo en el equipo para calibrarlo y a continuación, se reemplazó el cartucho por la placa de célula. Una vez completado el ensayo, se fotografió cada pocillo y se realizó el recuento celular con el lector de placas *Cytation 5* (BioTek).

Los datos obtenidos se normalizaron en función del número total de células y para el análisis de los resultados se empleó el programa online *Seahorse Analytics*.

4. Resultados

4.1. Comprobación del fenotipo de cultivos primarios de aVICs y qVICs

Con el fin de analizar el efecto de agentes proinflamatorios en células intersticiales quiescentes (qVICs), imitando la composición celular de las válvulas aórticas sanas, se obtuvieron cultivos primarios de células qVICs empleando la formulación del medio de cultivo fibroblástico descrito por N. Latif, *et al.*, para diferenciar las células parcialmente activadas o aVICs a un estado mayoritariamente quiescente.³⁹

Para el estudio se partió de cultivos primarios de aVICs adheridas en plástico que cultivaron paralelamente en medio control (MC) o en medio fibroblástico (FIB). Se comprobó que la formulación FIB indujo un fenotipo mayoritariamente fibroblástico, como ya se había descrito.³⁹ En el día 0, los cultivos estaban compuestos principalmente por células grandes con forma romboidal, morfología típica de los miofibroblastos (Fig. 1, paneles izquierdos). Tras 48 h, ya se observó un cambio sustancial del fenotipo de las células cultivadas en FIB, siendo estas cada vez más alargadas y compactas como los fibroblastos; mientras que la morfología celular en MC no se vio alterada (Fig. 1, paneles centrales). En los días posteriores, el cambio morfológico fue mucho más lento y se podían observar en un mismo campo tanto miofibroblastos como fibroblastos. Tras 14 días de cultivo, no se había modificado la morfología de las células en MC y se observó una notable proliferación. Por el contrario, las células en medio FIB proliferaron aparentemente menos que las anteriores y se habían diferenciado mayoritariamente en fibroblastos, si bien en algún campo se podía seguir observando alguna célula tipo miofibroblasto (Fig. 1, paneles derechos). Por tanto, este cultivo primario logra reproducir el patrón celular presente en las válvulas cardiacas, donde el 95-98% son fibroblastos y <5% miofibroblastos.

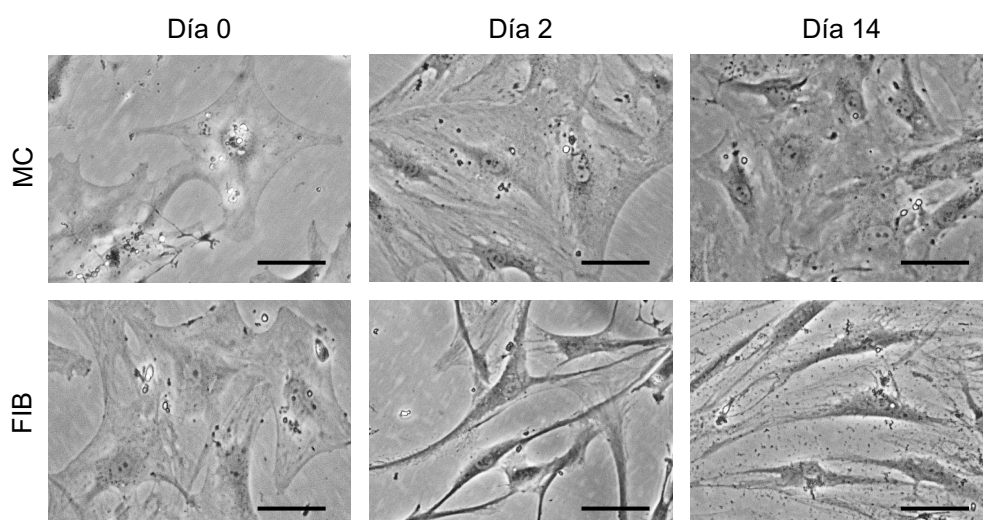


Figura 1. Comprobación de la diferenciación de aVICs a qVICs. Las células aVICs (tipo miofibroblastos) se cultivaron en medio control (MC) o en medio fibroblástico (FIB) y se tomaron imágenes de microscopía de los cultivos correspondientes a los días 0, 2, y 14. La barra de escala hace referencia a 50 μm .

A continuación, se comprobó el fenotipo celular analizando los niveles proteicos del marcador α -SMA. Las células cultivadas en medio fibroblástico (FIB) mostraron una notable disminución de este marcador, directamente relacionado con un fenotipo del tipo miofibroblástico (Fig. 2).

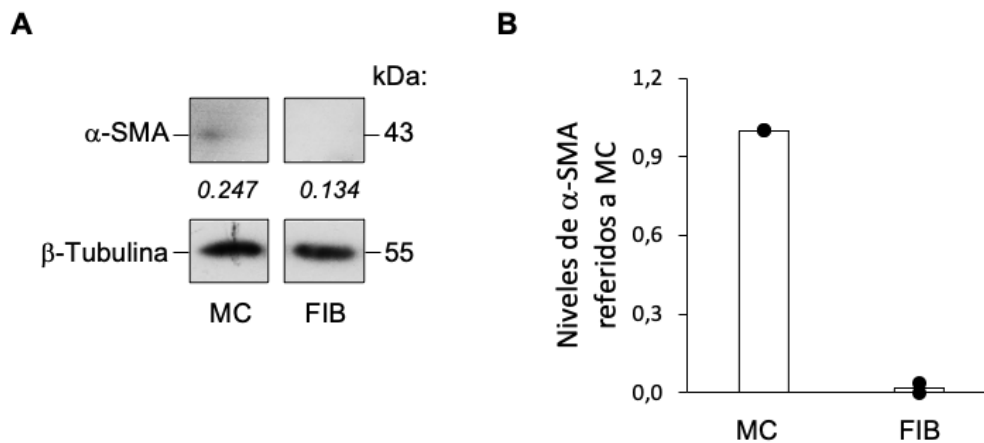


Figura 2. Disminución del marcador α -SMA asociado con un fenotipo miofibroblástico en cultivos en medio FIB. Se analizaron mediante Western blot los niveles proteicos de α -SMA en células cultivadas durante 14 días en medio MC o en FIB. **(A)** Western blot representativo de $n=2$ cultivos de células valvulares explantadas de donantes independientes. Se indican además los valores de densidad óptica normalizados frente al correspondiente valor de β -Tubulina. Las imágenes corresponden al mismo gel y han sido procesadas y reveladas a la vez. **(B)** Niveles de α -SMA referidos al medio control. Los valores se representan como la media \pm el error estándar de la media de $n=2$. FIB = medio fibroblástico; MC = medio control.

En adelante, las células cultivadas en medio control y fenotipo miofibroblástico se nombrarán como aVICs, y las células cultivadas en medio fibroblástico y fenotipo mayoritariamente fibroblástico como qVICs.

4.2. En respuesta a $IFN-\gamma$ y LPS en normoxia, se induce la estabilización del factor HIF-1 α tanto en aVICs como en qVICs

Hasta la fecha, se ha reportado escasa asociación molecular entre HIF-1 α y la calcificación valvular. Por un lado, se sabe que tanto HIF-1 α como VEGF se expresan en áreas de angiogénesis y calcificación valvular.⁴³ Por otro, se sabe que en aVICs humanas, en un contexto inmunológico e inflamatorio la cooperación de $IFN-\gamma$ y LPS estabiliza el factor de transcripción HIF-1 α en normoxia, siendo este un mecanismo relevante en la calcificación de aVICs humanas *in vitro*.⁴⁴ Para estudiar si el microentorno inflamatorio podría también afectar a células valvulares quiescentes (qVICs) y promover la estabilización de HIF-1 α , se analizaron los niveles proteicos tras 24 h de la activación con $IFN-\gamma$ y LPS. Los resultados de Western blot sugieren que la estabilización de HIF-1 α ocurre de forma paralela tanto en aVICs como en qVICs y solo como respuesta a la estimulación celular (Fig. 3).

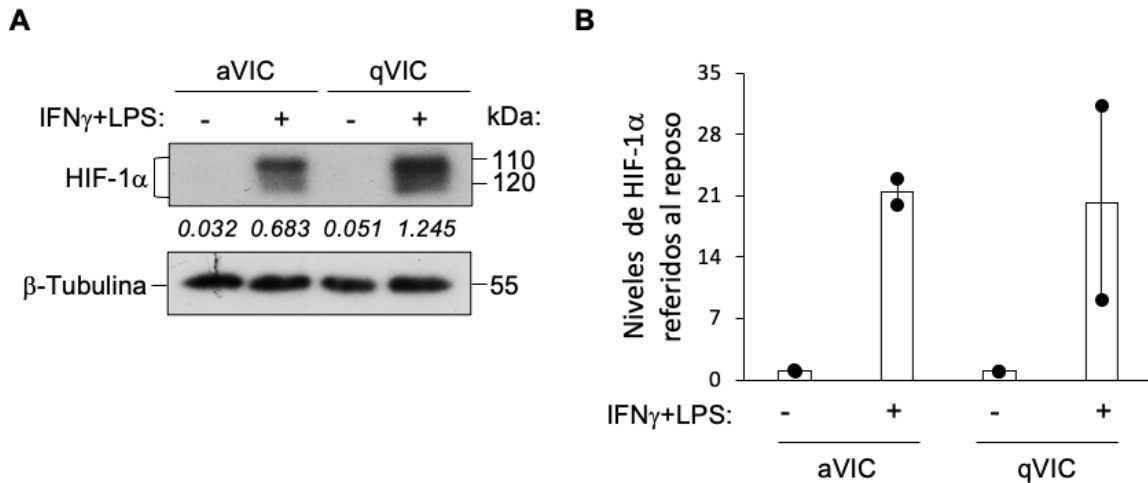


Figura 3. La activación con IFN- γ y LPS en normoxia promueve la estabilización de HIF-1 α tanto en aVICs como en qVICs. Se analizaron mediante Western blot los niveles proteicos de HIF-1 α tras 24 h de la estimulación con IFN- γ (100 ng/mL) y LPS (1 μ g/mL). **(A)** Western blot representativo de $n=2$ cultivos de células valvulares explantadas de donantes independientes. Se indican además los valores de densidad óptica normalizados frente al correspondiente valor de β -Tubulina. **(B)** Niveles de HIF- α referidos al basal correspondiente. Los valores se representan como la media \pm el error estándar de la media de $n=2$. aVIC = VIC parcialmente activada (miofibroblasto); qVIC = célula intersticial valvular quiescente (fibroblasto).

4.3. Tras la estimulación con IFN- γ y LPS se inducen genes regulados por HIF-1 α e implicados en la glicólisis, tanto en aVICs como en qVICs

El siguiente paso fue estudiar algunos genes relacionados con el metabolismo, en concreto, con la glicólisis, que se sabe que son regulados por este factor de transcripción.⁴²

En particular, se analizaron los genes que codifican para el transportador de glucosa *GLUT1* y las enzimas glicolíticas *HKII*, *PFKFB3* y *PKM2*. Inicialmente, se analizó su expresión basal en los cultivos primarios de aVICs y qVICs (Fig. 4). Se observó que todos los genes estudiados se expresan en ambos tipos celulares, siendo *PKM2* el que más se expresaba (Fig. 4C). Además, los resultados sugieren una tendencia a una mayor transcripción de *HKII*, *PFKFB3* y *PKM2* (Fig. 4A-C) en qVICs que en aVICs, que alude a una mayor actividad glicolítica basal en células quiescentes; mientras que, por el contrario, se encontró una menor expresión de *GLUT1* en qVICs (Fig. 4D).

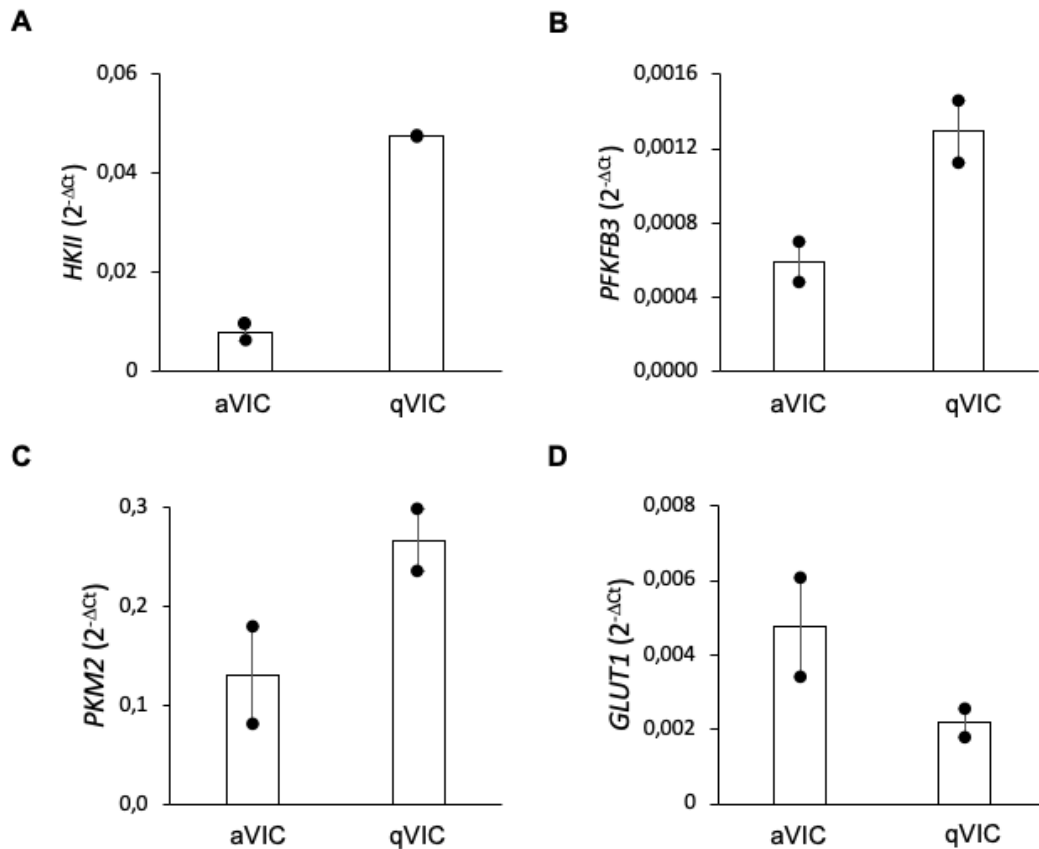


Figura 4. En estado basal, aVICs y qVICs presentan diferencias en la expresión de genes relacionados con la glicólisis y regulados por HIF-1 α . Tras 14 días en cultivo, se analizaron en aVICs y qVICs mediante RT-qPCR algunos genes implicados en la glicólisis como *HKII* (A), *PFKFB3* (B), *PKM2* (C) y *GLUT1* (D). Los valores de transcritos están referidos a la expresión del gen constitutivo *GAPDH* y se representan como la media \pm el error estándar de la media de $n=2$ cultivos de células valvulares explantadas de donantes independientes. aVIC = VIC parcialmente activada (miofibroblasto); qVIC = VIC quiescente (fibroblasto).

A continuación, se analizó el efecto de la estimulación con IFN- γ y LPS durante 24 h. En este caso, se observó un aumento en casi todos los genes analizados en respuesta a los agentes proinflamatorios, tanto en aVICs como en qVICs (Fig. 5A-C). En el caso de *PKM2*, se observó una respuesta diferente según el paciente donador (Fig. 5D).

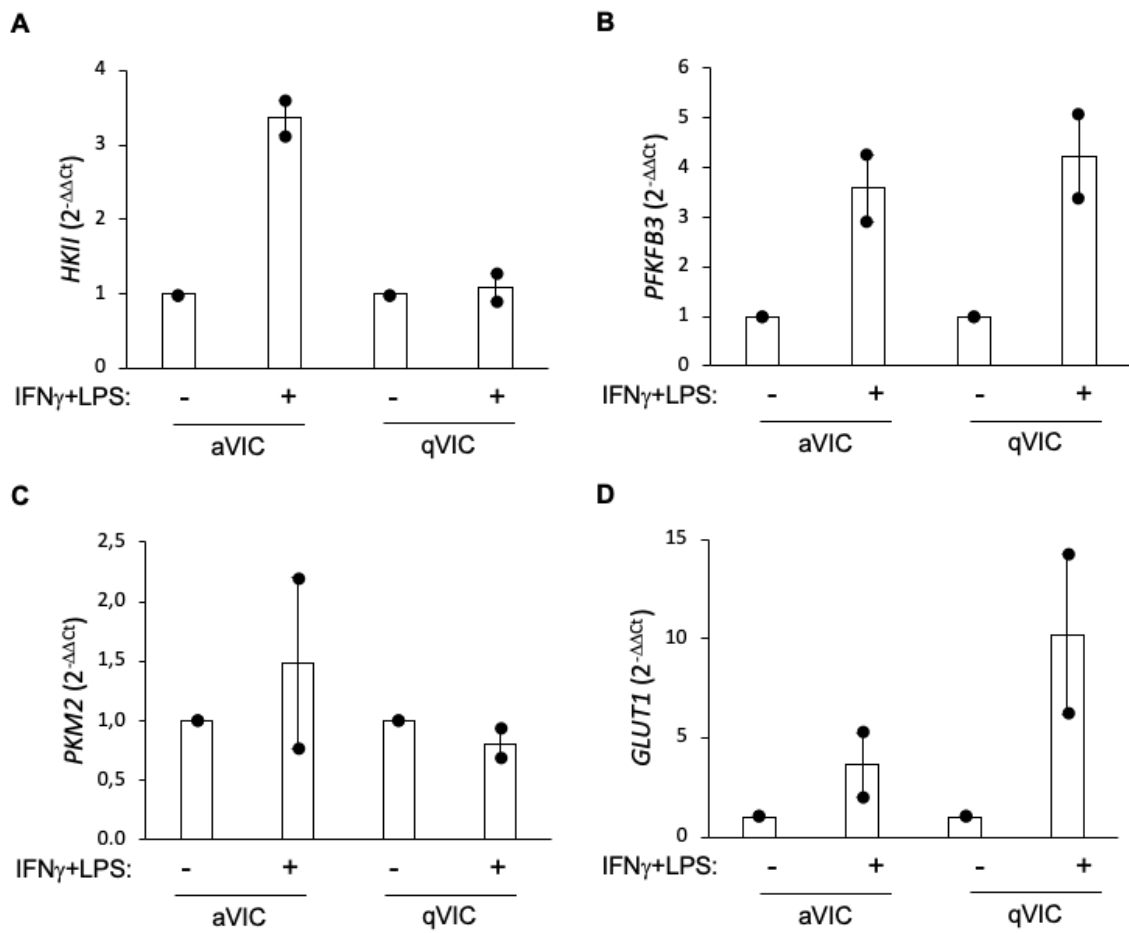


Figura 5. Aumento en la expresión de genes relacionados con la glicólisis regulados por HIF-1 α en respuesta a la estimulación con IFN- γ y LPS, tanto en aVICs como en qVICs. Tras 24 h de la estimulación de aVICs y qVICs con con IFN- γ (100 ng/mL) y LPS (1 μ g/mL), se analizaron mediante RT-qPCR algunos genes implicados en la glicólisis como *HKII* (A), *PFKFB3* (B), *PKM2* (C) y *GLUT1* (D). Los valores de transcritos están referidos a la expresión del gen constitutivo *GAPDH* y al estado basal correspondiente. Se representan como la media \pm el error estándar de la media de $n=2$ cultivos de células valvulares explantadas de donantes independientes. aVIC = VIC parcialmente activada (miofibroblasto); qVIC = VIC quiescente (fibroblasto).

4.4. IFN- γ y LPS promueven la acidificación extracelular en aVICs y qVICs

Estudios no publicados por el laboratorio sugieren que la exposición de aVICs a agentes proinflamatorios promueve en estas células una reprogramación metabólica, en concreto, una acidificación extracelular. Este parámetro se evaluó a tiempo real analizando los niveles de ECAR empleando el analizador de flujo *Seahorse XFe24* (Fig. 6A). Por limitaciones técnicas, solo se pudo realizar un experimento piloto comparando el efecto de los cultivos de aVICs y qVICs procedentes de un único donante valvular. Los resultados infieren una mayor acidificación extracelular en qVICs que en aVICs (Fig. 6A-B) y en ambos casos se observa un aumento tras la estimulación con IFN- γ y LPS, siendo este mayor en aVICs que en qVICs (Fig. 6B-C). Estos resultados aún están pendientes de confirmarse.

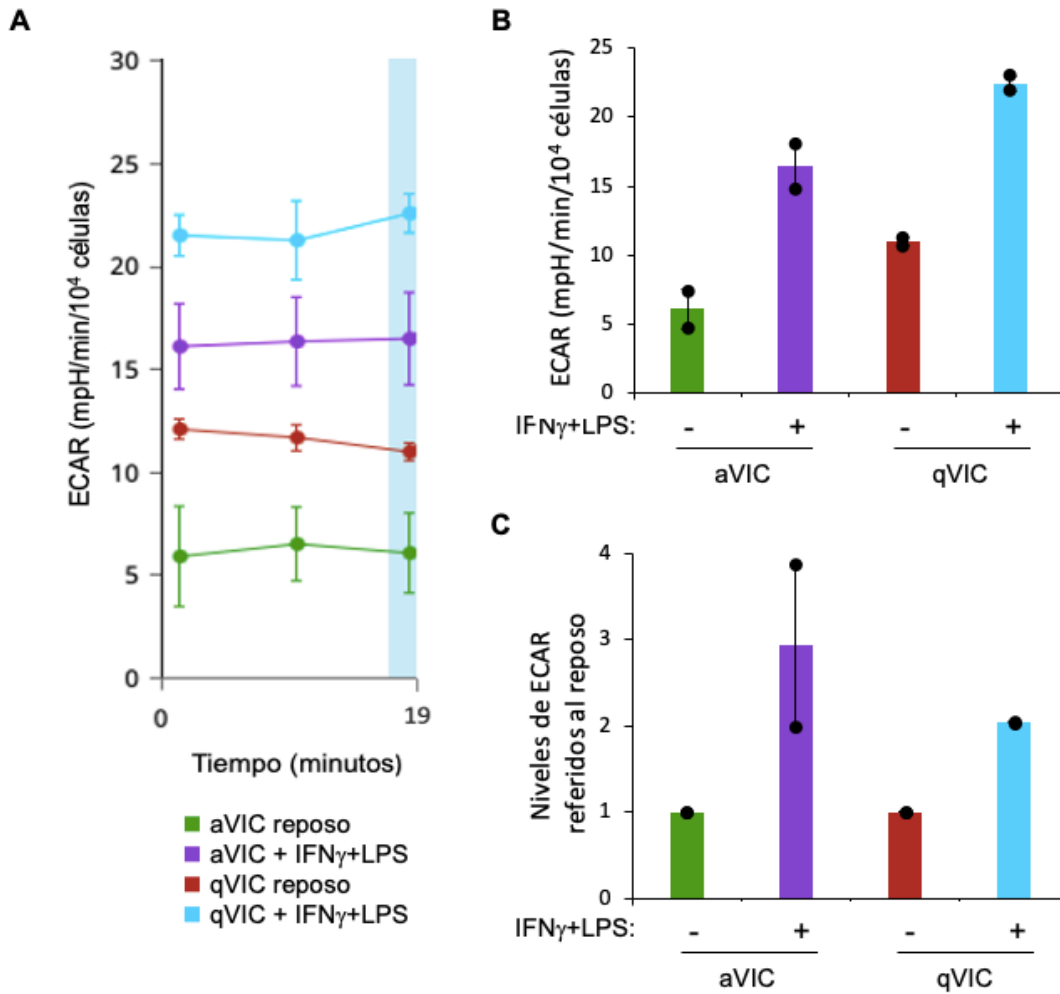


Figura 6. Tendencia a una mayor acidificación extracelular en qVICs que en aVICs y aumento de esta tras la estimulación con IFN- γ y LPS en ambos tipos celulares. Tras 24 h de la estimulación de aVICs y qVICs con IFN- γ (100 ng/mL) y LPS (1 μ g/mL) se evaluó la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en el analizador metabólico *Seahorse XFe24*. **(A)** Cinética de ECAR, valores de mpH/min normalizados frente al número total de células. **(B)** Valores de ECAR correspondientes a la tercera medida, representados como la media \pm el error estándar de la media de duplicados realizados para $n=1$ cultivos de células valvulares explantadas de donantes independientes. **(C)** Valores de ECAR referidos al basal correspondiente. aVIC = VIC parcialmente activada (miofibroblasto); qVIC = VIC quiescente (fibroblasto).

5. Discusión

Las células intersticiales de válvula aórtica representan un modelo celular relevante para los estudios de calcificación de la válvula aórtica, pero se debe tener en cuenta que se trata de una población bastante heterogénea con respecto tanto a la capacidad de diferenciación como a la morfología.²⁵ Son muchos los factores que pueden influir en el fenotipo de las VICs y representan limitaciones importantes para esclarecer los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la calcificación de las válvulas cardíacas.³⁵ En este trabajo, siguiendo la formulación de medio descrita por N. Latif, *et al.*, se ha logrado mantener las VICs humanas en un estado más representativo del fenotipo nativo, lo que proporciona un mejor modelo *in vitro* para estudiar la fisiopatología de la enfermedad valvular.³⁹

Gracias a la plasticidad de las VICs, se logró revertir el fenotipo y mantener las VICs en un estado quiescente, con una morfología y comportamiento característicos de una célula fibroblástica, para lo que se empleó un medio suplementado con FGF2, insulina y suero en baja concentración.³⁹ Esta formulación resulta útil para mantener y cultivar fibroblastos en su estado nativo y además disminuye el grado de diferenciación de los cultivos en superficies de plástico, predominantemente miofibroblásticos.³⁸ Como alternativa al cultivo en monocapa, se propuso inicialmente el cultivo 3D en una matriz extracelular, para lo que se sintetizaron los compuestos gelatina y ácido hialurónico metacrilados como se ha descrito previamente.⁴⁹ Este modelo permitiría simular la mecanobiología valvular y mantener la quiescencia de las VICs. Sin embargo, la falta de material impidió desarrollar este objetivo.

El estudio realizado se ha basado en la comparación de cultivos de células aVICs parcialmente activadas de forma espontánea por el material plástico, con cultivos de células qVICs que simulan el estado quiescente. La evolución morfológica durante la diferenciación hacia una conformación celular más alargada y compacta y la disminución en los niveles del marcador α -SMA, confirman la reversión hacia un fenotipo mayoritariamente fibroblástico con el que se trabajó.

El objetivo fue investigar la posible inducción de HIF-1 α en qVICs como respuesta a los agentes proinflamatorios IFN- γ y LPS en normoxia, descrito previamente en aVICs humanas por I. Parra-Izquierdo, *et al.*⁴⁴ Los resultados del estudio derivados de 2 donantes independientes sugieren que ambos tipos celulares responden de forma análoga a la estimulación celular, estabilizando HIF-1 α en normoxia, si bien se observan diferencias según el paciente. Estos resultados aún están pendientes de confirmarse aumentando el tamaño muestral, pero resultan interesantes porque indicarían que, las células intersticiales tanto miofibroblastos como fibroblastos, responderían a un entorno inflamatorio exacerbado estabilizando un factor de transcripción que solo se induce en hipoxia.

Se han identificado más de 100 genes diana inducidos por HIF-1 α , incluidos genes relacionados con el metabolismo de la glucosa.⁴² Es por ello que, tras comprobar la inducción de HIF-1 α , se estudió a continuación la expresión de genes implicados en la glicólisis. En condiciones basales, se observaron notables diferencias metabólicas entre aVICs y qVICs. En concreto, los resultados del análisis de cultivos de células valvulares explantadas de 2 donantes independientes refieren una mayor expresión de genes que codifican enzimas glicolíticas en qVICs que en aVICs, en particular, los que codifican las enzimas *HKII*, *PFKFB3* y *PKM2*, lo que podría especularse como un aumento de la glicólisis en fibroblastos. Sin embargo, se observó una marcada reducción en la expresión de *GLUT1* en qVICs comparado con aVICs, que no puede explicarse si se afirma que la glicólisis aumenta, pues este regula el transporte de glucosa al interior celular para su empleo como fuente de energía.⁵⁰ Esto podría ser consecuencia de la presencia de insulina en el medio FIB necesario para obtener células qVICs, pues esta puede regular otros transportadores de glucosa como GLUT4. El perfil metabólico de

genes glicolíticos regulados por HIF-1 α también se evaluó tras 24 h de la estimulación celular con IFN- γ y LPS y se observó, tanto en aVICs como en qVICs, un aumento en la expresión de *HKII*, *PFKFB3* y *GLUT1* como respuesta a la activación con los agentes proinflamatorios, mientras que la expresión de *PKM2* difiere tanto con el fenotipo como con el donante valvular. Estos datos sugieren que la expresión de genes implicados en la glicólisis y regulados por HIF-1 α , aumenta en qVICs y aVICs expuestas a un microentorno inflamatorio exacerbado. Se necesita aumentar el tamaño muestral para confirmar los resultados de estos estudios preliminares.

Los cambios metabólicos asociados a la glicólisis también se evaluaron midiendo la acidificación extracelular a tiempo real. En un experimento piloto, los valores de ECAR basales reflejaron una mayor actividad glicolítica en qVICs que en aVICs, lo que podría deberse a un efecto de la insulina presente en el medio FIB empleado para obtener cultivos de qVICs. Por otro lado, en ambos tipos celulares la estimulación con IFN- γ y LPS indujo un aumento de la acidificación extracelular, consistente con los resultados del perfil génico de enzimas glicolíticas y un posible aumento de la glicólisis que necesitan ser confirmados.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que las células intersticiales de válvula aórtica humana, tanto parcialmente activadas como quiescentes, sufren en normoxia una reprogramación metabólica en respuesta a la cooperación de agentes proinflamatorios como IFN- γ y LPS. Es interesante que esta remodelación ocurra de modo similar a lo descrito en células inflamatorias, especulando que, en el caso de la válvula aórtica expuesta a un entorno inflamatorio exacerbado, esta reprogramación metabólica podría tener relevancia en las etapas iniciales de la patogenia de la estenosis aórtica. El papel de la fosforilación oxidativa y otras rutas metabólicas no ha sido explorado y es el objetivo de estudios futuros.

Este estudio está sujeto a importantes limitaciones, siendo la primera la de tratarse de cultivos primarios *in vitro*. Además, el medio fibroblástico empleado es M199 y no DMEM como se indica,³⁹ si bien no parece alterar la diferenciación, pues la clave en la reversión del fenotipo radica en la suplementación con el factor de crecimiento FGF2. Sin embargo, la formulación propuesta por N. Latif, *et al.*, también incluye insulina y L-glutamina, que podrían alterar el metabolismo de células quiescentes. Para abordar esta limitación, las matrices 3D serían las más adecuadas.^{40,49} Por último, y no menos relevante, las células intersticiales obtenidas de válvulas aórticas están lejos de ser una población uniforme y afectan otras variables como la edad del paciente, el sexo y las enfermedades concomitantes, que influyen en la fisiopatología de la CAVD.^{14,17} Es por ello que se deben evaluar además estos factores de riesgo y tratar los resultados de forma independiente. Así por ejemplo, el cultivo con insulina o el análisis glicolítico podría verse influenciado por la enfermedad diabetes mellitus, pues en estos pacientes el metabolismo de la glucosa en células valvulares podría estar alterado.

6. Conclusiones

- En normoxia, la estimulación con IFN- γ y LPS de cultivos primarios de qVICs, que simulan el fenotipo mayoritariamente fibroblástico de la población intersticial de la válvula aórtica, promueve la estabilización de HIF-1 α de forma análoga a las aVICs (miofibroblastos).
- En estado basal, aVICs y qVICs exhiben diferencias en la expresión de algunos genes implicados en la glicólisis y regulados por HIF-1 α , pero en ambas células se incrementa la expresión de los genes *HKII*, *PFKFB3* y *GLUT1* en respuesta a la activación con IFN- γ y LPS.
- En un experimento piloto, la estimulación con IFN- γ y LPS promueve un aumento de la acidificación extracelular tanto en aVICs como en qVICs.

7. Referencias

1. G. J. Tortora & B. Derrickson. Principios de Anatomía y Fisiología. *Editorial Médica Panamericana*. 13a. edición (2013).
2. R. B. Hinton & K. E. Yutzey. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol*. 73, 29-46 (2011). doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142145
3. C. M. Otto, *et al.* Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 90, 844-853 (1994). doi: 10.1161/01.cir.90.2.844
4. J. A. Leopold. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv*. 5, 605-614 (2012). doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.112.971028
5. N. M. Rajamannan, F. J. Evans, E. Aikawa, *et al.* Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 124, 1783-1791 (2011). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767
6. A. E. Kostyunin, *et al.* Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol*. 132, 189-209 (2019). doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.016
7. F. J. Schoen. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation*. 118, 1864-1960 (2008). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805911
8. R. V. Freeman & C. M. Otto. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 111, 3316-3326 (2005). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486738
9. K. H. Zheng, *et al.* Pathophysiology of Aortic Stenosis and future Perspectives for Medical Therapy. *Cardiol Clin*. 38, 1-12 (2019). doi: 10.1016/j.ccl.2019.09.010
10. B. R. Lindman, *et al.* Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2, 1783-1791 (2016). doi: 10.1038/nrdp.2016.6
11. F. E. C. M. Peeters, *et al.* Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment. *Eur Heart J*. 39, 2618-2624 (2017). doi: 10.1093/eurheartj/ehc653
12. W. C. Roberts & J. M. Ko. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation*. 111, 920-925 (2005). doi: 10.1161/01.CIR.0000155623.48408.C5
13. V. I. Summerhill, *et al.* Sex-specific features of calcific aortic valve disease. *Int J Mol Sci*. 21, 5620 (2020). doi: 10.3390/ijms21165620
14. A. M. Porras, C. M. McCoy & K. S. Masters. Calcific aortic valve disease: a battle of the sexes. *Circ Res*. 120, 604-606 (2017). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310440
15. B. Lung & A. Vahanian. Degenerative calcific aortic stenosis: a natural history. *Heart*. 98, 7-13 (2012). doi: 10.1136/heartjnl-2012-302395
16. N. M. Rajamannan, R. O. Bonow & S. H. Rahimtoola. Calcific aortic stenosis: an update. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 4, 254-262 (2007). doi: 10.1038/ncpcardio0827

17. T. A. Pawade, D. E. Newby & M. R. Dweck. Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key. *J Am Coll Cardiol.* 66, 561-577 (2015). doi: 10.1016/j.pcad.2014.02.006
18. L. Sun, S. Chandra & P. Sucosky. *Ex vivo* evidence for the contribution of hemodynamic shear stress abnormalities to the early pathogenesis of calcific bicuspid aortic valve disease. *PLoS One.* 7, e48843 (2012). doi: 10.1371/journal.pone.00488843
19. M. A. Raddatz, *et al.* Adaptive immune cells in calcific aortic valve disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 317, 141-155 (2019). doi: 10.1152/ajpheart.00100.2019
20. D. Proudfoot, *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification *in vitro*: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res.* 87, 1055-1062 (2000). doi: 10.1161/01.res87.11.1055
21. I. Nadra, *et al.* Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res.* 96, 1248-1256 (2005). doi: 10.1161/01.RES.0000171451.88616.c2
22. V. Probst, *et al.* Familial aggregation of calcific aortic valve stenosis in the western part of France. *Circulation.* 113, 856-860 (2006). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.569476
23. E. R. Mohler 3rd, *et al.* Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 103, 1522-1528 (2001). doi: 10.1161/01.cir.103.11.1522
24. M. R. Dweck, T. A. Pawade & D. E. Newby. Aortic stenosis begets aortic stenosis: between a rock and a hard place? *Heart.* 101, 919-920 (2015). doi: 10.1136/heartjnl-2015-307519
25. A. Rutkovsky, *et al.* Valve interstitial cells: the key to understanding the pathophysiology of heart valve calcification. *J Am Heart Assoc.* 6, e006339 (2017). doi: 10.1161/JAHA.117.006339
26. B. H. Lorell & B. A. Carabello. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 102, 470-479 (2000). doi: 10.1161/01.cir.102.4.470
27. T. K. Mittal & N. Marcus. Imaging diagnosis of aortic stenosis. *Clin Radiol.* 76, 3-14 (2020). doi: 10.1016/j.crad.2020.04.008
28. T. A. Pawade, T. Sheth, *et al.* Why and how to measure aortic valve calcification in patients with aortic stenosis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 12, 1835-1848 (2019). doi: 10.1016/j.jcmg.2019.01.045
29. P. Mathieu, *et al.* Molecular biology of calcific aortic valve disease: towards new pharmacological therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 12, 851-862 (2014). doi: 10.1586/14779072.2014.923756
30. J. J. Thaden, *et al.* The global burden of aortic stenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 56, 565-571 (2014). doi: 10.1016/j.pcad.2014.02.006
31. P. Mathieu, R. Bouchareb & M. C. Boulanger. Innate and adaptive immunity in calcific aortic valve disease. *J Immunol Res.* 2015, 851945 (2014). doi: 10.1155/2015/851945
32. C. García-Rodríguez, *et al.* Toll-Like receptors, inflammation, and calcific aortic valve disease. *Frontiers in Physiology.* 9, 201 (2018). doi: 10.3389/fphys.2018.00201
33. N. Coté, *et al.* Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation.* 36, 573-581 (2013). doi: 10.1007/s10753-012-9579-6

34. T. Lawrence. The nuclear factor NK-kB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1, a001651 (2009). doi: 10.1101/cshperspect.a001651
35. A. C. Lui, V. R. Joag & A. I. Gotlieb. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 171, 1407-1418 (2007). doi: 10.2353/ajpath.2007.070251
36. M. S. Ali, *et al.* Correlation between valvular interstitial cell morphology and phenotypes: A novel way to detect activation. *Tissue Cell.* 54, 38-46 (2018). doi: 10.1016/j.tice.2018.07.004
37. E. Aikawa, M. Farber, M. Aikawa & F. J. Schoen. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis.* 13, 841-847 (2004). PMID: 15473488
38. A. N. Porras, N. C. A. van Engeland, *et al.* Robust generation of quiescent porcine valvular interstitial cell cultures. *J Am Heart Assoc.* 6, 3 (2017). doi: 10.1161/JAHA.116.005041
39. N. Latif, *et al.* Modulation of human valve interstitial cell phenotype and function using a fibroblast growth factor 2 formulation. *PLoS One.* 10, e0127844 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0127844
40. J. Hjortnaes, E. Aikawa, *et al.* Simulation fo early calcific aortic valve disease in a 3D platform: A role for myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol.* 94, 13-20 (2016). doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.004
41. Q. Ke & M. Costa. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 70, 1469-1480 (2006). doi: 10.1124/mol.106.027029
42. G. N. Masoud & W. Li. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sini B.* 5, 378-389 (2015). doi:10.1016/j.apsb.2015.05.007
43. I. Perrota, *et al.* HIF-1 α and VEGF: immunohistochemical profile and possible function in human aortic valve stenosis. *Ultrastruct Pathol.* 39, 198-206 (2015). doi: 10.3109/01913123.991884
44. I. Parra-Izquierdo, *et al.* Lipopolysaccharide and interferon- γ team up to activate HIF-1 α via STAT1 in normoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1865, 2168-2179 (2019). doi: 10.1016/j.bbadis.2019.04.014
45. B. C. Mulukutla, *et al.* Regulation of glucose metabolism - A perspective from cell bioprocessing. *Trends biotechnol.* 38, 638-651 (2016). doi: 10.1016/j.tibtech.2016.04.012
46. N. Y. Spencer & R. C. Stanton. The Warburg effect, lactate, and nearly a century of trying to cure cancer. *Semin Nephrol.* 39, 380-393 (2019). doi: 10.1016/j.semnephrol.2019.04.007
47. X. Meng, *et al.* Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 un human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294, C29-C35 (2007). doi: 10.1152/ajpcell.00137.2007
48. J. López, *et al.* Viral and bacterial patterns induce TLR-mediated sustained inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells. *Int J Cardiol.* 158, 18-25 (2012). doi: 10.1016/j.ijcard.2010.12.089
49. D. C. van der Valk, *et al.* Engineering a 3D-bioprinted model of human heart valve disease using nanoindentation-based biomechanics. *Nanomaterials (Basel).* 8, 296 (2018). doi: 10.3390/nano8050296

50. S. E. Corcoran & L. A. J. O'Neill. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest.* 126, 3699-3707 (2016). doi: 10.1172/JCI84431

ANEXO I - MATERIAL

1.-Reactivos químicos

- Acrilamida/bis acrilamida: Bio-Rad, Hercules, CA; Ref. 1610158.
- Azida sódica: Merck, Darmstadt, Germany; Ref. 6688.
- Azul de bromofenol: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. B8026.
- Cloruro potásico (KCl): Merck, Darmstadt, Germany; Ref. 4938.
- Cloruro sódico (NaCl): Merck, Darmstadt, Germany; Ref. 4936.
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄): Merck, Darmstadt, Germany; Ref. 4873.1000.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. 436143.
- Glicerol: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. G5516.
- Glicina: Merck, Darmstadt, Germany; Ref. AC04061000.
- Hidrógeno fosfato de sodio (Na₂HPO₄): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. 255793.
- Tri(hidroximetil) aminometano (Tris; C₄H₁₁NO₃): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. TR0424000.
- Tris-clorhídrico (Tris-HCl): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. RES3098T-B7.
- TRizol: Thermo Scientific, Carlsbad, CA; Ref. 10296010.
- Tween-20: Scharlab, Barcelona, Spain; Ref. TW00220100.

2.-Disolventes

- Cloroformo (CHCl₃): Merck, Darmstadt, Germany; Ref. 1.02445.1000.
- Etanol (C₂H₆O): Panreac, Barcelona, Spain; Ref. 141091.1214.
- Isopropanol (2-propanol; C₃H₈O): Thermo Scientific, Waltham, MA; Ref. A461-4.
- Metanol (CH₄O): Panreac, Barcelona, Spain; Ref. 141091.1224.

3.-Cultivos celulares

- Agentes antibióticos-antimicóticos (100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 0.25 mg/mL anfotericina B): Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA; Ref. 15240-062.
- FGF2: Thermo Scientific, Waltham, MA; Ref. PHG0026.
- Insulina: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. I9278.
- L-glutamina: BioWhittaker, Lonza Basel, Switzerland; Ref. BE17-605.
- Medio M199: Corning, Tewksbury, MA; Ref. 10-060-CVR.
- Placas de 6 pocillos (10 cm²/pocillo): Corning, Tewksbury, MA; Ref. 3506.
- Suero bovino fetal inactivado (FBSi): Hyclone, Carlsbad, CA; Ref. SV30160.03.
- Tampón fosfato salino (PBS): 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4.
- Tripsina-EDTA: BioWhittaker, Lonza Basel, Switzerland; Ref. BE17-161F.

4.-Tratamientos celulares (estímulos y medios de cultivo)

- IFN-γ: Peprotech Inc, London, UK; Ref: 300-02.

- LPS procedente de *Escherichia coli* O111B4: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. L2630.
- Medio de activación (MA): M199 suplementado con agentes antibióticos/antimicóticos, 2% (v/v) FBS_i y 2mM de L-glutamina.
- Medio de válvulas (MV): M199 suplementado con agentes antibióticos/antimicóticos y 10% (v/v) FBS_i.
- Medio control (MC): M199 suplementado con agentes antibióticos/antimicóticos, 10% (v/v) FBS_i y 2mM de L-glutamina.
- Medio fibroblástico (FIB): M199 suplementado con agentes antibióticos/antimicóticos, 2% (v/v), 2mM de L-glutamina, 50 ng/mL insulina y 10 ng/mL FGF2.
- Medio Seahorse (SH): medio comercial, 0.001% (v/v) piruvato, 0.025% (v/v) glucosa y 0.001% (v/v) L-glutamina.

6.-Western blot

- Anticuerpos primarios: TTBS, 5% (p/v) de leche en polvo, 0.02% (v/v) azida sódica y el volumen adecuado del anticuerpo según su concentración de empeno.

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpo primario	Concentración de empleo	Peso molecular (kDa)	Casa comercial Referencia
α -SMA (humano)	1:200	43	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany; Ref. sc-32251
β -Tubulina (humano)	1:20000	55	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO Ref. T7816
HIF-1 α (humano)	1:1000	110, 120	Novus Biologicals, Colorado, USA Ref. NB1000-449

- Anticuerpos secundarios: TTBS, 3% (p/v) de leche en polvo y el volumen adecuado del anticuerpo según su concentración de empeno.

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados.

Anticuerpo secundario	Concentración de empleo	Casa comercial Referencia
IgG anti-ratón (cabra)	1:3000	Bio-Rad, Hercules, CA Ref. 170-6516
IgG anti-conejo (cabra)	1:2000	Agilent Technologies, Santa Clara, CA Ref. P0448

- Gel running al 10%: 40% (v/v) H₂O milli-Q, 33% (v/v) acrilamida/bis acrilamida, 25% (v/v) Tris pH 8.8, 1% (v/v) SDS, 1% (v/v) APS y 0.4% (v/v) TEMED.
- Gel stacking al 5%: 68% (v/v) H₂O milli-Q, 17% (v/v) acrilamida/bis acrilamida, 13% (v/v) Tris pH 8.8, 1% (v/v) SDS, 1% (v/v) APS y 0.1% (v/v) TEMED.
- Kit Pierce™ BCA protein assay: Thermo Scientific, Carlsbad, CA; Ref. 23227.
- Kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate: Thermo Scientific, Waltham, MA; Ref. 32106.
- Marcador de pesos moleculares: Thermo Scientific, Carlsbad, CA; Ref. 26634.
- Películas autorradiográficas: Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan; Ref.
- Raspador celular: Corning, Tewksbury, MA; Ref. 3008.
- Solución de bloqueo: TTBS y 5% (p/v) de leche en polvo.

-Tampón de carga 5X: 325 mM Tris-HCl pH 7.5, 50% (v/v) glicerol, 10% (p/v) SDS, 0.01 mg/mL azul de bromofenol y 5% (v/v) DTT.

-Tampón de electroforesis: 25 mM Tris hidroximetil aminometano, 192 mM glicina y 0.1% (p/v) SDS, pH 8.3.

-Tampón de lisis celular: TNE+NP40, 0.1% (v/v) leupeptina, 0.1% (v/v) AP, 10% (v/v) PMSF, 0.5% Na₃VO₄, 0.01% NaF.

-Tampón de transferencia: 25 mM Tris hidroximetil aminometano, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol y 0.03% (p/v) SDS.

-TBS: 10 mM Tris-HCl pH 7.6 y 137 mM NaCl.

-TTBS: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl y 0.05% (v/v) Tween-20.

7.-RT-qPCR

-Cebadores: Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA; Ref. P/N 58875.

Tabla 3. Secuencias de cebadores empleados para RT-qPCR.

Gen	Secuencia del cebador sentido	Secuencia del cebador anti-sentido
<i>GAPDH</i>	5'-TGCCAAATATGATGACATCAAGAA-3'	5'-GGAGTGGGTGTCGCTGTTG-3'
<i>GLUT1</i>	5'-GAAGAGAGTCGGCAGATGAT-3'	5'-AATAGAAGACAGCGTTGATGC-3'
<i>HKII</i>	5'-TAGGGCTTGAGAGCACCTGT-3'	5'-CCACACCCACTGTCACTTTG-3'
<i>PDK4</i>	5'-CCCCTGTCCATGAAGCAGC-3'	5'-CCAATGTGGCTTGGGTTTCC-3'
<i>PFKFB3</i>	5'-CCGTTGGAAGTACGCAGA-3'	5'-CACAGGATCTGGGCAACGAG-3'
<i>PKM2</i>	5'-CTATCCTCTGGAGGCTGTGC-3'	5'-ACGATTATGGCCCCACTGCA-3'

-Dietilpirocarbonato (DEPC): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Ref. D-5758.

-Inhibidor de ribonucleasas RNAsin: Promega, Madiwon, Wisconsin; Ref. N251B.

-Mezcla 1: por condición: 1 µL de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 ng/mL) y 1 µL de 10 mM dNTP Mix (10 mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro).

-Mezcla 2: por condición: 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 2 µL de 0.1 M DTT y 0.5 µL de Rnase OUT.

-Mezcla desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP): Amersham Biosciences, London, UK; Ref. 10297-018.

-SYBRgreen: Kapa Biosystems; Wilmington; MA; Ref. KK4610.

-Tampón First-Strand 5X: Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA; Ref. P/N Y02321.

-Transcriptasa reversa M-MLV: Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA; Ref. 28025-013.

8.-Análisis metabólico en tiempo real

-Flux Packs: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Ref. 102340100

-Kit Seahorse XF Cell Mito Stress Test: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Ref. 103010-1000.

-Seahorse XF calibrante: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Ref. 100840-000.

-Seahorse XF medio y suplementos: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; Ref. 103681-100.

