



# UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Medicina - Escuela de Doctorado  
Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM)

## MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y TERAPIAS AVANZADAS

### TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

*“Papel de la glutamina en la calcificación e inflamación de las células intersticiales de la válvula aórtica”*

**Autora:**

Dalia Lizette Magaña Pérez

**Directora de Proyecto:**

Dra. María del Carmen García Rodríguez

**Valladolid, Julio 2024**

## Índice

Abreviaturas .....	2
1. Abstract.....	3
2. Introducción .....	3
2.1. Válvula aórtica humana: Estructura y composición celular .....	3
2.2. Enfermedad de la válvula aórtica calcificada.....	3
2.2.1. Diagnóstico y tratamiento de la CAVD.....	4
2.2.2. Fisiopatología de la CAVD .....	5
2.3. Papel de la inflamación y la inmunidad en la patogenia de la CAVD .....	6
2.4. Metabolismo energético celular en enfermedades cardiovasculares como la CAVD ...	7
2.4.1. La ruta de la glicólisis en enfermedades cardiovasculares como la CAVD .....	7
2.4.2. Rol de la glutamina en patologías cardiovasculares .....	7
2.4.3. Ruta de la glutaminólisis .....	8
3. Hipótesis y objetivos .....	9
3.1. Hipótesis .....	9
3.2. Objetivos: .....	9
4. Materiales y Métodos.....	10
4.1. Cultivo primario de células explantadas de válvulas aórticas humanas.....	10
4.2. Activación de células para ensayos de Western blot y RT-qPCR .....	10
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) .....	10
4.3.1. Extracción de ARN .....	10
4.3.2. Retrotranscripción para obtención de ADNc.....	11
4.3.3. PCR cuantitativa (qPCR) .....	11
4.4. Inmunodetección de proteínas en ensayos de Western Blot .....	11
4.4.1. Extracción y cuantificación de proteínas mediante el ensayo de proteínas de ácido bicinconínico (BCA) .....	11
4.4.2. Procedimiento de Western Blot: SDS-PAGE y transferencia .....	12
4.4.3. Inmunodetección de proteínas y visualización por quimioluminiscencia .....	12
4.5. Ensayo de calcificación In vitro.....	13
4.5.1. Detección de la mineralización por tinción con rojo de Alizarina (ARS) .....	13
4.6. Análisis metabólico en tiempo real mediante la tecnología Seahorse y el kit de Cell Mito Stress.....	13
5. Resultados.....	15
5.1. La inhibición de la enzima clave en la glutaminólisis, GLS1, aumenta la calcificación in vitro de las VIC explantadas de pacientes sin enfermedad valvular. ....	15
5.2. La carencia de la glutamina en el medio de cultivo celular no modifica la calcificación de las VIC.....	16
5.3. La inhibición de la enzima GLS1 no afecta a los niveles de transcritos del gen IL-8 ni a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y muestra una tendencia a reducir la expresión de IL-6 bajo condiciones inflamatorias.....	16
5.5. La inhibición de la glutaminólisis no afecta a la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ en las VIC bajo estimulación inflamatoria. ....	19
5.6. La privación de la glutamina extracelular tiende a disminuir la estabilización de HIF-1 $\alpha$ por agentes inflamatorios en las VIC .....	20
5.7. La inhibición de la glutaminólisis no afecta a la reprogramación metabólica inducida por agentes inflamatorios .....	21
6. Discusión .....	23
7. Conclusiones .....	25
8. Bibliografía .....	26
9. Anexo I. Lista de materiales y preparación de soluciones .....	29

## **Abreviaturas**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN Complementario

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**CAVD:** Enfermedad de válvula aórtica calcificada

**dNTPs:** Desoxinucleótidos

**ECAR:** Tasa de acidificación extracelular

**GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**GLS1:** Glutaminasa 1

**GLUT1:** Transportador de Glucosa 1

**HIF-1 $\alpha$ :** Factor Inducible por Hipoxia 1-alfa

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IL:** Interleucina

**JAK:** Janus Kinase

**LPS:** Lipopolisacárido

**NF- $\kappa$ B:** Factor Nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas

**OCR:** Tasa de consumo de oxígeno

**qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

**RT:** Transcriptasa Inversa

**STAT:** Transductor de Señales y Activador de la Transcripción

**TLR:** Receptor Tipo Toll

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**VEC:** Células Endoteliales de la válvula aórtica

**VIC:** Células intersticiales de la válvula aórtica

## 1. Abstract

Este presente estudio se centra en la enfermedad valvular aórtica calcificada y explora el papel de la glutamina y la glutaminólisis en la calcificación e inflamación de las células intersticiales de la válvula aórtica (VIC) de pacientes sin enfermedad valvular. Basado en estudios del grupo que demuestran reducción de la expresión de la enzima glutaminasa 1 (GLS1) en VIC humanas bajo condiciones inflamatorias, se investigó el impacto de su inhibición farmacológica en estas células. Los resultados de calcificación *in vitro* revelan que la inhibición de GLS1 aumenta la calcificación de las VIC humanas, aunque ésta no cambia en ausencia de glutamina exógena. La inhibición de GLS1 no altera la activación de NF-κB ni la expresión del gen *IL-8* en células activadas con IFN-γ y LPS, aunque muestra una tendencia a reducir los transcritos de *IL-6*. Además, tampoco afecta a la estabilización del regulador transcripcional HIF-1α en las VIC bajo estimulación inflamatoria y normoxia, mientras que la privación de la glutamina exógena tiende a disminuir su estabilización. Finalmente, el análisis preliminar del metabolismo celular en tiempo real sugiere que la inhibición de la glutaminólisis a 24 h no altera la reprogramación glucolítica inducida por IFN-γ y LPS. En conclusión, este estudio sugiere que la glutaminólisis contribuye, al menos en parte, a la calcificación mediada por inflamación de las VIC y la glutamina participa en parte en la estabilización normóxica de HIF-1α en un entorno inflamatorio. Esto es relevante en procesos patogénicos claves en las fases iniciales de la enfermedad valvular.

## 2. Introducción

El corazón humano se divide en cuatro cámaras: dos aurículas superiores (izquierda y derecha) y dos ventrículos inferiores (izquierdo y derecho). Las aurículas reciben sangre que entra al corazón, mientras que los ventrículos bombean la sangre fuera del corazón. Posee cuatro válvulas principales (tricúspide, mitral, pulmonar y aórtica) que regulan el flujo sanguíneo unidireccional a través de sus cámaras y hacia los grandes vasos. Estas estructuras trabajan juntas para mantener un flujo sanguíneo eficiente y continuo por todo el organismo.

### 2.1. Válvula aórtica humana: Estructura y composición celular

La válvula aórtica humana es una estructura trilaminar con capas fibrosa, esponjosa y ventricular, que le dan las propiedades biomecánicas necesarias para soportar la tensión cíclica repetitiva. La capa fibrosa y la ventricular, enfrentadas a la aorta y al ventrículo izquierdo respectivamente, están compuestas de colágeno y fibras elásticas<sup>1</sup>.

Durante el desarrollo embrionario, las células intersticiales de la válvula aórtica (VIC) son generadas por la transición de células endocárdicas a mesenquimatosas. Las VIC son una población diversa de células, que incluye a los fibroblastos y células de músculo liso que mantienen la matriz extracelular. Se ha observado que a medida que la red de fibras se vuelve más gruesa, tanto las tensiones principales (mayores tensiones en una dirección específica) como las tensiones de corte (fuerzas tangenciales dentro del tejido) aumentan, lo que incrementa la probabilidad de que el tejido sufra daños estructurales<sup>2</sup>.

Las células endoteliales de la válvula aórtica (VEC), que se encuentran en contacto con el flujo sanguíneo, son mecanosensibles y responden a cambios en los factores circulantes<sup>3</sup>. A diferencia del endotelio vascular, las VEC están expuestas a patrones de flujo más complejos y, en el lado ventricular de la válvula, se orientan perpendicularmente al flujo sanguíneo<sup>1</sup>.

### 2.2. Enfermedad de la válvula aórtica calcificada

La estenosis de la válvula aórtica es la enfermedad valvular cardíaca más frecuente en el mundo. Esta afección surge principalmente de tres causas subyacentes: una anomalía valvular congénita (válvulas unicúspides o bicúspides), la enfermedad cardíaca reumática, y por un proceso fibrótico y calcificante que afecta a las valvas de

la válvula aórtica calcificante<sup>4</sup>. La última, mal llamada estenosis de la válvula aórtica calcificante degenerativa es la más prevalente y objeto de estudio en este TFM.

La enfermedad de la válvula aórtica calcificada (CAVD, en inglés) es una enfermedad crónica caracterizada por el endurecimiento y la calcificación de las valvas de la válvula aórtica<sup>5</sup>. Se caracteriza por una remodelación fibrocalcificada progresiva y el engrosamiento de las valvas de la válvula aórtica, lo que lleva a su obstrucción<sup>1,6,7</sup>. Este proceso, ahora reconocido como no degenerativo sino activo, se caracteriza por la acumulación de depósitos de calcio y fibrosis en las valvas, lo que provoca rigidez, estrechamiento y obstrucción del flujo sanguíneo a través de la válvula impidiendo su apertura completa en respuesta al aumento de presión ventricular<sup>2,5</sup>. Este progresivo estrechamiento, junto con la sobrecarga de presión y la hipertrofia del ventrículo izquierdo, resulta en los síntomas clásicos: insuficiencia cardíaca, síncope y angina<sup>8</sup>.

La prevalencia de esta enfermedad es notablemente mayor en hombres y mantiene una tendencia ascendente a medida que avanza la edad<sup>9</sup>, afectando a más del 2% de las personas mayores de 75 años y al 8% de las mayores de 84 años.

Los factores de riesgo de CAVD incluyen el estilo de vida sedentario, obesidad, dislipidemia, diabetes mellitus e hipertensión, la mayoría de los pacientes no experimentan síntomas hasta la séptima u octava década de la vida<sup>10</sup>. Una vez que los síntomas se manifiestan, la progresión de la enfermedad es rápida, lo que lleva a la mayoría de los pacientes a someterse a un reemplazo quirúrgico de la válvula aórtica o a un implante transcáteter de la válvula aórtica<sup>1,7</sup>. La fisiopatología de la CAVD es compleja y multifactorial, e implica una combinación de factores genéticos y ambientales, así como diversos mecanismos celulares y moleculares.

Aunque las opciones de tratamiento han avanzado rápidamente en los últimos años, la estenosis de la válvula aórtica sintomática sigue estando asociada con una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Hasta ahora, no se ha establecido ningún tratamiento farmacológico efectivo para prevenirla.

### *2.2.1. Diagnóstico y tratamiento de la CAVD*

El diagnóstico y el seguimiento de la CAVD se realizan principalmente mediante técnicas de imagen no invasivas. La ecocardiografía es la herramienta más utilizada, proporcionando datos sobre la gravedad de la enfermedad, el grosor de la pared ventricular, y permitiendo la estimación de la calcificación valvular. La tomografía computarizada sin contraste ofrece un sistema de puntuación de calcificación más detallado y reproducible. Además, la tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica avanzada que proporciona información sobre la actividad de procesos biológicos específicos, como la inflamación y la calcificación<sup>11,12</sup>.

En las etapas avanzadas de la CAVD, el tratamiento más común para la estenosis aórtica calcificada grave es el reemplazo quirúrgico de la válvula aórtica. Este procedimiento implica la sustitución de las valvas calcificadas por una válvula mecánica o bioprotésica<sup>13</sup>. Sin embargo, debido a los riesgos asociados con la cirugía a corazón abierto y las complicaciones postoperatorias, se ha desarrollado una técnica mínimamente invasiva conocida como TAVI (Implante Transcáteter de Válvula Aórtica)<sup>14</sup>. Aunque el TAVI es considerado actualmente el tratamiento más efectivo con bajo riesgo de mortalidad, su durabilidad es limitada y puede requerir intervenciones adicionales a corto plazo. Por estas razones, su uso está limitado en la práctica moderna y se realiza solo en algunos centros especializados<sup>10,13,16</sup>.

En el contexto farmacológico, actualmente, no existen terapias efectivas y aprobadas para la CAVD. Diversos tratamientos probados, como estatinas, antihipertensivos y medicamentos dirigidos a las vías de fosforilación y calcificación no han logrado frenar la progresión natural de la enfermedad<sup>15</sup>. Principalmente, esta ausencia de farmacoterapia se debe a la limitada comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la homeostasis valvular y la progresión de la enfermedad, la situación se ve

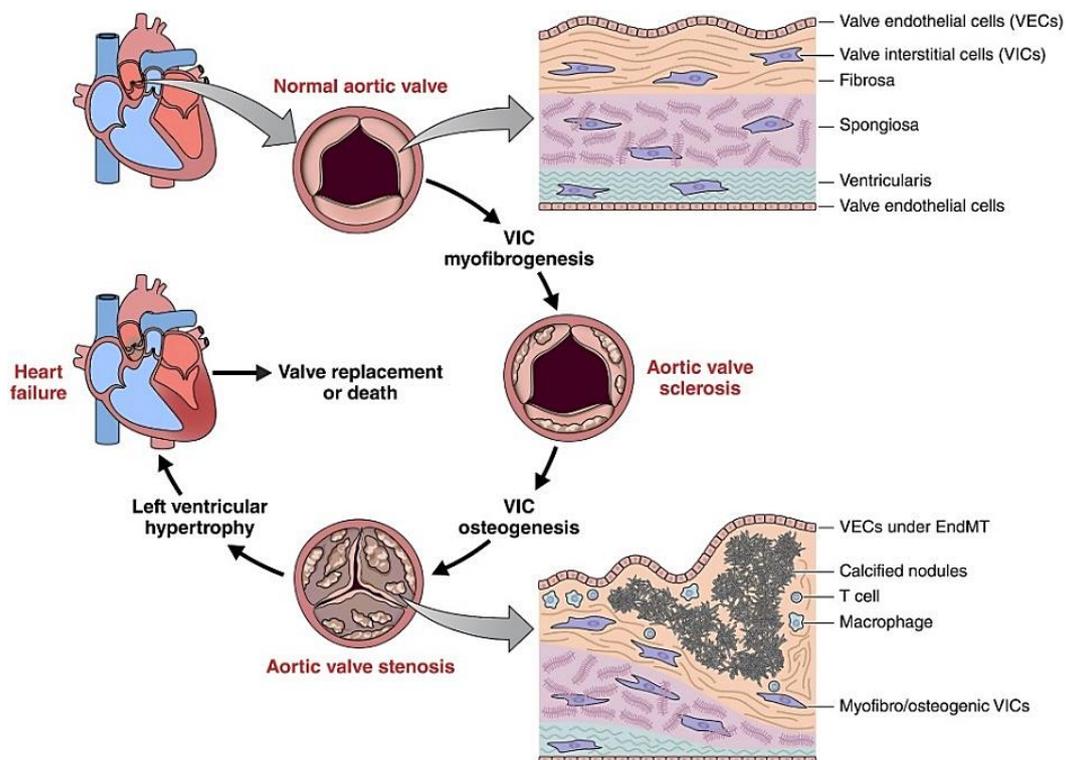
agravada por la compleja estructura, composición celular y el microambiente de la válvula aórtica<sup>16</sup>.

### 2.2.2. Fisiopatología de la CAVD

El inicio y la progresión de la enfermedad son multifactoriales, involucrando varios procesos como la acumulación de lípidos, la inflamación, la osteogénesis, la biosíntesis y agregación de vesículas extracelulares, la activación plaquetaria, la osteocondrogénesis, el remodelado de la matriz extracelular, la senescencia celular y las fuerzas biomecánicas<sup>16</sup>.

Durante la última década, estudios clínicos han proporcionado evidencia de que la fisiopatología de la CAVD ocurre en tres fases distintas: fase de iniciación, de propagación y final de calcificación, y se sabe que la inflamación participa en las dos primeras fases<sup>15</sup>. La fase de iniciación, similar a la aterosclerosis, se caracteriza por un daño del endotelio valvular, la infiltración de lípidos y células inmunes e inflamación. La fase de propagación implica que las VIC adquieren un fenotipo similar al de los osteoblastos, lo que impulsa un ciclo continuo de calcificación y fibrosis valvular, con similitudes a la formación del hueso esquelético. Las fases pueden coexistir simultáneamente en diferentes grados y en diversas áreas de la válvula durante el curso de la enfermedad<sup>15,17,18</sup>.

En las etapas iniciales de la CAVD, se observa un engrosamiento esclerótico/fibrótico y una calcificación distrófica de las valvas, afectando principalmente a la capa fibrosa (**Figura I**). A medida que la fibrosis y la calcificación avanzan, el estrechamiento del orificio aórtico impide el gasto cardíaco, causando angina, dolor torácico, menor tolerancia al ejercicio y remodelación del ventrículo izquierdo, lo que eventualmente puede requerir el reemplazo de la válvula aórtica o llevar a la muerte<sup>16</sup>.



**Figura I. Patogenia de la valvulopatía aórtica calcificada.** El ciclo de la CAVD muestra cómo la válvula entre el ventrículo izquierdo y la aorta se ve afectada. A medida que avanza la enfermedad, se observa el engrosamiento y la calcificación de los tejidos valvulares, lo que dificulta la apertura y cierre de la válvula<sup>16</sup>.

Debido a que tanto la detección y el diagnóstico clínico de los pacientes como la investigación básica actual se enfocan principalmente en las etapas finales de la enfermedad, se dificulta el estudio y la comprensión de las fases iniciales y progresivas de la CAVD<sup>7</sup>. Una de las principales razones de esta limitación es la falta de modelos animales adecuados que reproduzcan fielmente la enfermedad<sup>5</sup>. Abordar esta brecha en la investigación es crucial para desarrollar intervenciones tempranas y más efectivas que puedan mejorar los resultados para los pacientes.

### *2.3. Papel de la inflamación y la inmunidad en la patogenia de la CAVD*

Numerosas evidencias experimentales apoyan el modelo actual que propone que la inflamación está implicada en el desarrollo y progresión de la CAVD<sup>12,19,20</sup>. Una respuesta inflamatoria desregulada en las etapas de inicio de la enfermedad conduce a la osteogénesis en las etapas media y tardía<sup>21</sup>. La disrupción del endotelio valvular permite la infiltración de células inmunitarias, con un aumento notable de linfocitos T, monocitos y células presentadoras de antígenos, como macrófagos, leucocitos y células B, en válvulas estenóticas. En este contexto, los linfocitos T promueven la secreción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que también regula otras vías inmunitarias<sup>20</sup>. Se ha demostrado que el IFN- $\gamma$ , junto con el lipopolisacárido (LPS), induce la polarización de macrófagos infiltrados hacia un estado inflamatorio tipo M1, facilitando a su vez la liberación de interleucinas (ILs) inflamatorias y colaborando con células osteogénicas en la formación ósea en regiones calcificadas<sup>20</sup>. Entre las citosinas asociadas a la CAVD está IL-6, que es un péptido proinflamatorio circulante producido por diversos tipos de células, como linfocitos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales, cuya alta expresión en la válvula aórtica se ha demostrado que favorece la mineralización<sup>22</sup>.

El factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NF- $\kappa$ B) forma parte de una importante familia de factores de transcripción involucrado en muchas patologías cardiovasculares<sup>23</sup>. La activación de NF- $\kappa$ B en las válvulas aórticas se desencadena cuando citocinas proinflamatorias y productos microbianos se unen a receptores en la superficie celular. Esto activa una cascada de señalización que fosforila y degrada la proteína I $\kappa$ B, liberando NF- $\kappa$ B. Después, NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo y activa genes proinflamatorios, contribuyendo a la inflamación, calcificación y degeneración de las válvulas aórticas<sup>22,23</sup>.

El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 $\alpha$ ) es un mediador transcripcional clave en la respuesta hipóxica y un regulador maestro de la homeostasis del O<sub>2</sub>. HIF-1 $\alpha$  participa en cada paso de la angiogénesis, estableciendo una relación fundamental con los factores pro-angiogénicos durante la formación de capilares en condiciones de hipoxia<sup>24</sup>. Estudios previos han demostrado que la expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y del factor pro-angiogénico VEGF es significativamente mayor en las zonas calcificadas de la válvula aórtica<sup>25</sup>. En el contexto de la CAVD, recientemente se ha demostrado la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , por agentes inflamatorios e inmunitarios en normoxia con la calcificación de VICs humanas<sup>21,26</sup>. Esto podría ser relevante en las etapas iniciales de la CAVD debido a que HIF-1 $\alpha$  regula genes metabólicos, principalmente aquellos que controlan la glicólisis como GLUT1.

Paralelamente, las vías de la Janus quinasa (JAK) y los transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) se han asociado recientemente con la CAVD. Estas rutas reguladoras responden a citocinas, como IL-6 y los IFNs, promoviendo la mineralización de las VIC. En particular, el IFN- $\gamma$  actúa a través del receptor heterodimérico IFNGR, que activa las vías JAK/STAT, desencadenando una amplia gama de efectos<sup>27</sup>. En este contexto, se han utilizado inhibidores de JAK de uso clínico para prevenir la inflamación y la calcificación inducidas por IFN- $\gamma$  y LPS en VIC demostrando que el eje JAK-STAT/HIF está implicado en la calcificación mediada por inflamación<sup>26</sup>.

## 2.4. Metabolismo energético celular en enfermedades cardiovasculares como la CAVD

Recientemente, los cambios en el metabolismo celular de la CAVD han recibido una atención creciente, considerándose una respuesta adaptativa a estímulos mecánicos y esenciales para las transiciones del destino celular. Estudios recientes demostraron que la inflamación reprograma el metabolismo de las VIC para favorecer procesos patogénicos como la calcificación y la diferenciación osteoblástica. Esto se logra mediante la regulación negativa de la vía oxidativa de las pentosas fosfato y el aumento del flujo glucolítico y el estrés oxidativo. Estos hallazgos reflejan el perfil metabólico de las VIC estenóticas y ofrecen nuevas pistas terapéuticas prometedoras<sup>28</sup>.

### 2.4.1. La ruta de la glicólisis en enfermedades cardiovasculares como la CAVD

En los últimos años, se ha observado una desregulación de la glicólisis en enfermedades del sistema cardiovascular<sup>29,30</sup>, y en particular en patológicos de la CAVD, lo que ha abierto nuevas direcciones terapéuticas potenciales para su tratamiento<sup>31</sup>. La glicólisis, que ocurre en el citoplasma, transforma la glucosa para producir piruvato y es una vía esencial del metabolismo de la glucosa. Este proceso está relacionado con el metabolismo energético, la homeostasis y funciones fisiológicas como el movimiento muscular, el desarrollo y la neurotransmisión. Además, la glicólisis produce piruvato y una cantidad limitada de ATP para satisfacer las demandas energéticas, así como metabolitos que desempeñan un papel crucial en la función celular<sup>32,33</sup>.

En los cardiomiocitos, la glucosa se convierte inicialmente en glucosa-6-fosfato (G6P) por acción de la hexoquinasa. Luego, puede seguir diferentes rutas metabólicas como la glicólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP), la síntesis de hexosaminas (HBP) y la biosíntesis de serina. Un exceso de flujo de glucosa por estas vías está asociado con el estrés oxidativo y el desarrollo de complicaciones cardiovasculares<sup>29,30</sup>.

La glicólisis se activa por genes regulados por HIF-1 $\alpha$ , incluyendo transportadores de glucosa como GLUT1, y enzimas glucolíticas como la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB1-4), la hexoquinasa II (HKII) y la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA). Además, HIF-1 $\alpha$  regula genes que disminuyen el metabolismo oxidativo mitocondrial, como la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1)<sup>34,35</sup>.

En el contexto de la CAVD, tres estudios recientes demuestran un fenotipo hiperglicolítico en válvulas de enfermos con CAVD<sup>5,28,30</sup>. El aumento de glicólisis se ha asociado al proceso de calcificación; tanto agentes mecánicos, inflamatorios e hiperfosfatemia promueven el aumento de la glicólisis que mimetiza el cambio metabólico en la enfermedad valvular<sup>5,28,30</sup>. Además, el aumento temprano de GLUT1 sugiere un intento del miocardio de incrementar la captación de glucosa desde las fases iniciales de la enfermedad. Un estudio reciente sobre hipertrofia cardiaca demostró que HIF-1 $\alpha$  se eleva durante la progresión de la CAVD, lo que podría estar relacionado con el aumento de GLUT1 observado<sup>36</sup>.

### 2.4.2. Rol de la glutamina en patologías cardiovasculares

La glutamina es el aminoácido más abundante en el organismo y constituye hasta el 40% de la reserva de aminoácidos libres en el músculo cardiaco<sup>37</sup>. Funciona como sustrato para la síntesis de ADN, ATP, péptidos, proteínas, lípidos y antioxidantes, y juega un papel crucial en procesos celulares como la proliferación, la migración, la apoptosis y la senescencia celular<sup>38</sup>.

La glutamina juega un papel importante en la fisiopatología cardiovascular. En situaciones de isquemia-reperfusión la glutamina muestra beneficios significativos al reducir el estrés oxidativo y nitrosativo, así como al mitigar la inflamación mediante la inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios y la expresión de moléculas de adhesión<sup>38</sup>. Además, promueve la expresión de hemo oxigenasa-1, proteínas de choque térmico y glutatión, y optimiza la síntesis de óxido nítrico como precursor de la arginina<sup>39</sup>.

Favorece también la activación de macrófagos tipo M2, que contribuyen a la inhibición de la inflamación<sup>39</sup>.

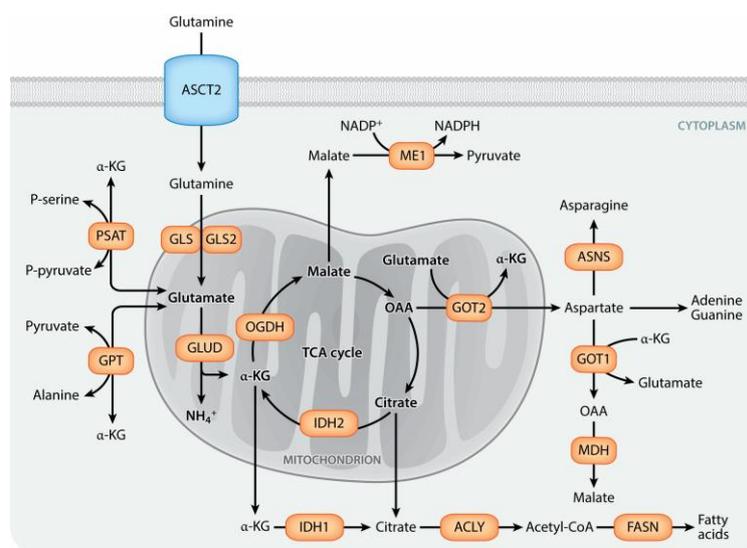
La glutamina desempeña un papel importante en la fisiología y patología cardiovascular mitigando factores de riesgo como hipertensión, hiperlipidemia, intolerancia a la glucosa, obesidad y diabetes. Estudios han demostrado que la suplementación con la glutamina protege contra enfermedades cardiometabólicas<sup>40</sup>, lesiones por isquemia-reperusión, anemia de células falciformes y lesiones cardíacas, siendo beneficiosa para pacientes con insuficiencia cardíaca<sup>39</sup>. Aunque no se ha determinado con certeza si su metabolismo influye directamente en la estructura y función de los cardiomiocitos<sup>37</sup>, es importante considerar que el exceso de glutamina en el ciclo de Krebs puede desencadenar respuestas angiogénicas aberrantes e hipertensión arterial.

En este sentido, la terapia dirigida a enzimas involucradas en la glutaminólisis, como la glutaminasa-1, la glutamina sintetasa, la glutamato deshidrogenasa y el aminoácido transaminasa, muestra potencial en modelos preclínicos<sup>39</sup>. Aunque históricamente la investigación y aplicación clínica de la terapia con aminoácidos en enfermedades cardiovasculares se ha centrado en la L-arginina, ahora se reconoce la importancia de la glutamina<sup>39</sup>.

Además, se ha demostrado recientemente que la captación de glutamina y su catabolismo son cruciales para la diferenciación a miofibroblastos en el contexto de la hipertrofia cardíaca, lo cual proporciona una justificación sólida para evaluar nuevos objetivos terapéuticos para tratar la fibrosis cardíaca<sup>40</sup>.

#### 2.4.3. Ruta de la glutaminólisis

La glutaminólisis es el proceso mediante el cual las células convierten la glutamina en metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) a través de diversas enzimas. Inicialmente, la glutamina se transforma en glutamato por acción de la enzima glutaminasa (GLS/GLS2). Luego, el glutamato se convierte en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) mediante la glutamato deshidrogenasa (GLUD) o un grupo de transaminasas, como GOT, GPT y PSAT (**Figura II**). El flujo a través de GLUD genera amonio, que puede inducir autofagia, y cofactores como NADH y NADPH, mientras que las transaminasas promueven la producción de aminoácidos no esenciales, como aspartato, alanina y fosfoserina. El  $\alpha$ -KG generado puede servir como sustrato anaplerótico en el ciclo del TCA, y el citrato se forma cuando el oxalacetato derivado de la glutamina se condensa con el acetato proveniente del acetil-CoA<sup>41</sup>.



**Figura II. Anaplerosis de la glutamina en el ciclo de TCA.** La anaplerosis de glutamina en el ciclo del TCA es el proceso mediante el cual la glutamina se convierte en intermediarios del ciclo TCA para reponer y mantener los niveles de estos compuestos. Esto ayuda a mantener la función del ciclo, que es crucial para la producción de energía y la síntesis de biomoléculas en la célula.

La generación de acetil-CoA y otros a través de la glutaminólisis puede influir en la acetilación de histonas, afectando la expresión de genes <sup>42</sup>. Recientemente se ha descrito que la acetilación de histonas en el contexto de CAVD. Un estudio reciente demuestra la asociación entre el estrés mecánico y el metabolismo de la glutamina en el contexto de CAVD, en concreto en el proceso de la diferenciación osteoblástica de VIC<sup>43</sup>. Se ha demostrado que la glutaminasa 1 (GLS1), la enzima clave en la glutaminólisis, promueve la diferenciación miofibroblástica y osteogénica de las VIC al aumentar la acetilación de histonas asociada al acetil-CoA<sup>43</sup>. En dicho estudio se utilizó al inhibidor específico de GLS1 bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfuro de etilo (BPTES) para reducir el contenido de nódulos de calcificación y la actividad de la fosfatasa alcalina en VIC<sup>43</sup>. Zhong et al., también demostraron que al eliminar GLS1 en las VIC normales, se reduce tanto la expresión de marcadores osteogénicos y miofibroblásticos como la concentración de acetil-CoA<sup>43</sup>. Estos hallazgos subrayan la importancia del metabolismo de la glutamina y GLS1 en la regulación de la diferenciación celular y ofrecen nuevas perspectivas para el tratamiento de enfermedades valvulares.

Por otro lado, la relación entre la inflamación y el metabolismo de la glutamina, en la patogénesis de la CAVD no se conoce. Su estudio podría identificar biomarcadores precoces y mecanismos patogénicos específicos, lo que, a su vez, podría revelar nuevas alternativas terapéuticas y estrategias preventivas más efectivas que el reemplazo valvular en etapas avanzadas de la enfermedad.

### 3. Hipótesis y objetivos

#### 3.1. Hipótesis

En un estudio realizado por Sánchez-Bayuela T. y colaboradores se demostró cómo las citocinas y patrones moleculares de patógenos promueven una reprogramación metabólica hacia un fenotipo más glucolítico que es necesario para los procesos de diferenciación y calcificación *in vitro*<sup>28</sup>, así como una disminución significativa en la expresión del gen, que codifica para la enzima glutaminasa 1, *GLS1*<sup>44</sup>. Dicha enzima es crucial en el proceso de glutaminólisis, un paso clave en el metabolismo energético celular. Hallazgos recientes subrayan la importancia del metabolismo de la glutamina y GLS1 en la regulación de la diferenciación celular en condiciones de estrés mecánico<sup>43</sup>. A pesar de los avances en comprender cómo la inflamación afecta el metabolismo celular en contextos como CAVD, sigue siendo desconocido el papel exacto del metabolismo de la glutamina en procesos que subyacen en la patología de la CAVD, y su estudio podría proporcionar nuevas alternativas terapéuticas.

En base a estos antecedentes, la hipótesis que se propone es que el metabolismo de la glutamina desempeña un papel en la calcificación mediada por inflamación (citocinas y patrones moleculares de patógenos) en un modelo celular de CAVD, VIC de pacientes controles.

#### 3.2. Objetivos:

- 1) Estudiar el papel de la glutamina en la calcificación de las células intersticiales de válvula aórtica bajo condiciones inflamatorias.
- 2) Evaluar el impacto de la inhibición de la glutaminólisis y de la privación de glutamina en la expresión génica relacionada con el metabolismo energético y la inflamación en células intersticiales de la válvula aórtica.

## 4. Materiales 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.

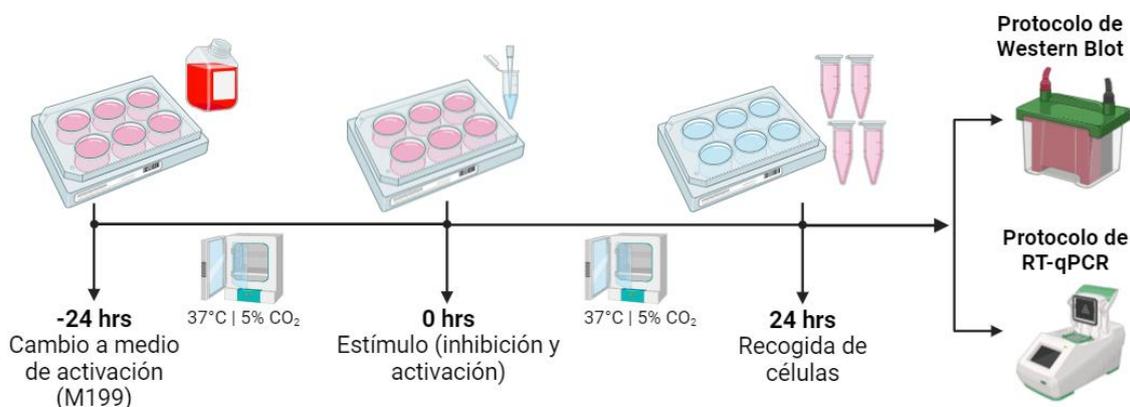
### 4.1. Cultivo primario de células explantadas de válvulas aórticas humanas

Las VIC se aislaron de válvulas aórticas tricúspides humanas explantadas de pacientes receptores de trasplante de corazón sin valvulopatía, intervenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y contó con la aprobación del comité de ética local (protocolo no. PI15-263). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes, varones de  $55 \pm 10$  años.

Las VIC se cultivaron en medio de crecimiento M199, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBSi) y 1% de solución antibiótica-antimicótica. Se cultivaron en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C en una atmósfera húmeda. El medio se reemplazó dos veces por semana. Las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 85-90% y se levantaron usando una solución de tripsina-EDTA, luego se cultivaron con una concentración final de 100,000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Para fines experimentales, solo se utilizaron células entre los pases 3 y 7.

### 4.2. Activación de células para ensayos de Western blot y RT-qPCR

Antes de la activación, las VIC se cultivan durante al menos 24 horas con el medio de activación M199 (suplementado con FBSi al 2 % y solución antimicótica antibiótica al 1 %) y al día siguiente los pocillos indicados se tratan con medio DMEM sin L-glutamina y DMEM con L-glutamina (100ng/mL), ambos medios suplementados con FBSi al 2 % y solución antimicótica antibiótica al 1% en un volumen final de 1 ml/pocillo. Cuando está indicado, el BPTES (3µg/mL) se incuba durante 1 hora antes de la activación celular. Las células se activaron con una combinación de los agentes proinflamatorios IFN-γ (100ng/mL) + LPS (1µg/mL) como en estudios previos (**Figura III**).



**Figura III. Diseño experimental para la activación de células para ensayos Western blot y RT-qPCR.** Ilustración creada en Biorender.

### 4.3. Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR)

La técnica de RT-PCR se emplea para la cuantificación precisa de la expresión de genes específicos. Inicialmente, se sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total mediante el uso de transcriptasa inversa o RT. Posteriormente, este ADNc sirve como plantilla para la reacción de PCR cuantitativa (qPCR), la cual se basa en la medición de un fluoróforo que se incorpora en cada ciclo de amplificación del ADN, como se describe en detalle a continuación.

#### 4.3.1. Extracción de ARN

Para el análisis de VIC humanas, se extrae ARN total con Tri Reagent®, siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando 1 mL de reactivo por cada 100,000 células.

Posteriormente, el ARN total se extrae con cloroformo, 200  $\mu$ L por cada 1 mL de Tri Reagent®. Las muestras se mezclan y centrifugan a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se recolecta la fase acuosa con ARN y se añaden 500  $\mu$ L de isopropanol. Tras mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugan nuevamente a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante, se lava el sedimento con etanol al 75%, se deja secar al aire y se resuspende en 15  $\mu$ L de agua tratada con DEPC. La cantidad de ARN total se mide por espectrofotometría usando un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) analizando la relación entre las absorbancias A260/A280.

#### 4.3.2. Retrotranscripción para obtención de ADNc

Se utilizan de 1-1.5  $\mu$ g de ARN total para generar ADNc mediante retrotranscripción. Primero, se mezcla el ARN con 300 ng de cebadores aleatorios, 1  $\mu$ L de dNTPs a 10 nM y H<sub>2</sub>O mili-Q hasta un volumen de 12.5  $\mu$ L. Las muestras se incuban 5 minutos a 65°C. Luego, se añaden 4  $\mu$ L de 5x First Strand Tampón, 2  $\mu$ L de DTT a 2 mM y 0.5  $\mu$ L de RNAsin®. La mezcla se incubaba 2 minutos a 37°C. Se agrega 1  $\mu$ L de la enzima M-MLV RT a 200 U/ $\mu$ L. Las muestras se incuban 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C.

#### 4.3.3. PCR cuantitativa (qPCR)

Para la reacción de PCR en tiempo real se usan 20 ng de ADNc y Máster Mix que contiene el fluoróforo SYBR Green y la enzima ATP polimerasa. Para ello, se mezclan 9.2  $\mu$ L de ADNc con 0.4  $\mu$ L de cada cebador (sentido y anti-sentido) y 10  $\mu$ L del reactivo SYBR Green a cada pocillo de la placa. La secuencia de los cebadores de los genes humanos de interés utilizados en el estudio se enumera en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Secuencias de los genes utilizados en la qPCR**

<b>Nombre del gen</b>	<b>Secuencia del cebador sentido (5'-3')</b>	<b>Secuencia del cebador anti-sentido (3'-5')</b>
<b>ACTA2 (<math>\alpha</math>-SMA)</b>	CCGACCGAATGCCAGAAGGA	ACAGAGTATTTGCGTCCGAA
<b>GAPDH</b>	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG
<b>IL6</b>	CACCTCTTCAGAACGAATTG	CTAGGTATACCTCAACTCC
<b>IL8</b>	ATGACTTCCAAGCTGGCCCGT	TCCTTGCAAACACTGCACCT
<b>GLUT1</b>	CTGCTCATCAACCGCAAC	CTTCTTCCCCGCATCATCT

La qPCR se realiza en un analizador LightCycler480® bajo las siguientes condiciones: (I) Una fase 5 minutos de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, (II) 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 5 segundos a 72°C, (III) ciclo final de 5 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C y 10 segundos a 4°C. Los niveles de transcripción de cada gen se normalizan respecto a la expresión de GAPDH, un gen de referencia usado como control endógeno. Los datos se expresan como  $2^{-\Delta Ct}$  ( $Ct$ =umbral de ciclo;  $\Delta Ct=Ct$  del gen- $Ct$  de GAPDH).

#### 4.4. Inmunodetección de proteínas en ensayos de Western Blot

Se realiza un análisis de transferencia Western para la identificación y semicuantificación de proteínas diana en extractos de células completas. Las proteínas se separan por tamaño en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis, utilizando el método original SDS-PAGE y condiciones desnaturizantes descritas por el método de Laemmli<sup>45</sup>, seguido de la transferencia a una membrana y la detección inmunológica.

##### 4.4.1. Extracción y cuantificación de proteínas mediante el ensayo de proteínas de ácido bicinonínico (BCA)

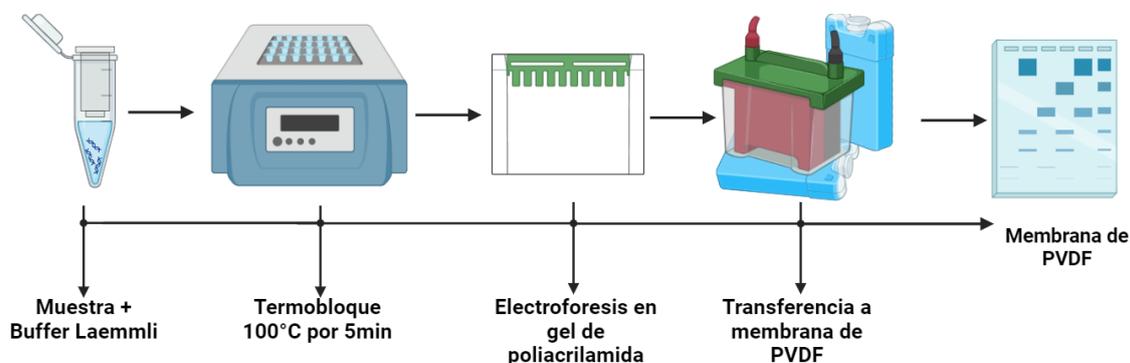
Para aislar los extractos totales de células, éstas se lisan con 75  $\mu$ L/pocillo de tampón de lisis (ver preparación en Anexo I). Las células se raspan, se recogen en un tubo Eppendorf y se centrifugan a 7000 x g durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes que contienen proteínas se recogen en un tubo nuevo.

La concentración de proteína total en los lisados celulares se mide usando el método BCA con el kit BCA de Pierce™. Se mezclan 5 µl del extracto proteico con 100 µl de reactivo BCA en una placa de 96 pocillos. El reactivo BCA se prepara con 50 partes de reactivo A y 1 parte de reactivo B. La mezcla se incuba durante 30 minutos a 37°C y la absorbancia se mide a 570 nm en un lector de microplacas Versamax (). La concentración de proteína se calcula interpolando los resultados de absorbancia en una curva estándar de albúmina de suero bovino.

#### 4.4.2. Procedimiento de Western Blot: SDS-PAGE y transferencia

Se preparan 30 µg de lisados proteicos en un volumen final de 75 µL y se mezclan con 17.5 µL de Tampón Laemmli 5X (ver preparación en Anexo I). Las muestras se calientan a 100°C durante 5 minutos. Las proteínas se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8-10% en condiciones desnaturizantes (ver preparación de los geles en Anexo I). La electroforesis se realiza a 25 mA y 200 V, utilizando un marcador de peso molecular como referencia, de la marca Bio-Rad.

Posteriormente, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF mediante un sistema de transferencia en húmedo a 400 mA durante 2 horas. La membrana de PVDF se activa previamente en metanol durante 1 minuto y se lava con agua destilada durante 2 minutos (**Figura IV**).



**Figura IV. Esquema de procedimiento en ensayos de Western Blot.** Ilustración creada en Biorender.

#### 4.4.3. Inmunodetección de proteínas y visualización por quimioluminiscencia

Antes de la inmunodetección, se bloquean las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (ver preparación en Anexo I) en constante agitación. Luego, se incuban con el anticuerpo primario correspondiente durante la noche a 4°C, preparado según las recomendaciones del fabricante, en leche desnatada al 5% en TTBS con azida sódica al 0,02%, como se indica en la Tabla II.

Al día siguiente, las membranas se lavan 3 veces con TTBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado en TTBS con leche al 3%. Después, se lavan nuevamente y se incuban por 1 minuto con sustrato de transferencia HRP ECL. La quimioluminiscencia se detecta exponiendo las membranas a películas de autorradiografía. Las bandas de proteínas se escanean con un densitómetro GS-800 (Bio-Rad) y se cuantifican utilizando el software Quantity One (Bio-Rad).

Se usa anticuerpo anti-β-tubulina como control de carga. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (au) normalizadas al control de carga y referidas a condiciones basales. La lista de anticuerpos utilizados en este estudio se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección**

<b>Proteína de estudio</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Dilución del Anticuerpo primario / Anticuerpo secundario</b>
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	120/110	1:1000 (TTBS-5% leche) / Anti-conejo
<b>p-STAT1</b>	95	1:1000 (TTBS-5% BSA) / Anti-conejo
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>	55	1:20000 (TTBS-5% leche) / Anti-ratón
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	43	1:200 (TTBS-5% leche) / Anti-ratón
<b>p-NF-<math>\kappa</math>B</b>	65	1:1000 (TTBS-5% BSA) / Anti-conejo

#### 4.5. Ensayo de calcificación *In vitro*

Los ensayos de calcificación se realizan utilizando condiciones altas de fosfato inorgánico y bajas en suero como se describe en Villa-Bellosta et al., 2015<sup>46</sup> y en Parra-Izquierdo et al., 2019<sup>26</sup>. Para simular el proceso patológico de la calcificación *in vitro*, las VIC se cultivan hasta una confluencia del 90 % en placas de 8 pocillos y se tratan durante 7 días con los estímulos y medios inductores de calcificación correspondientes:

- a) Medio M199 suplementado con FBSi al 1%, Pi 2,6 mM y solución antibiótica-antimicótica al 1%.
- b) DMEM sin L-glutamina suplementado con FBSi al 1%, Pi 2,6 mM y solución antibiótica-antimicótica al 1%.
- c) DMEM con L-glutamina suplementado con FBSi al 1%, Pi 2,6 mM y solución antibiótica-antimicótica al 1%.
- d) Inhibidor: BPTES 3 $\mu$ g/mL
- e) Agentes proinflamatorios: IFN- $\gamma$  (100ng/mL) + LPS (1 $\mu$ g/mL).

Los medios y estímulos se renuevan cada dos días durante 7 días.

##### 4.5.1. Detección de la mineralización por tinción con rojo de Alizarina (ARS)

La alizarina o 1,2-dihidroxi-antraquinona es un compuesto orgánico utilizado para visualizar y cuantificar la mineralización en cultivos celulares. En este método, las células se tiñen con una solución de rojo de Alizarina, un derivado de la antraquinona, que se une a los cristales de calcio y otros minerales presentes en la matriz extracelular mineralizada. La intensidad de la tinción de rojo de Alizarina se correlaciona con la cantidad de calcificación presente en las muestras.

Las células se lavan con PBS y se tiñen con una solución de tinte ARS (Rojo de Alizarina al 1,4% en agua, pH 4,2) durante 30 minutos en agitación. Las células se lavan de 5 a 6 veces con PBS y se toman imágenes utilizando un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse TS100) conectado a una cámara digital. Para la cuantificación, se extrae el tinte ARS con ácido acético al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación, como se ha reportado anteriormente en Gregory et al., 2004<sup>47</sup>. A continuación, las células se recogen en un tubo tipo eppendorf mediante raspado. Luego, se añade aceite mineral y se calienta a 85 °C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento en hielo durante 5 minutos. Después se centrifuga a 16100 x g durante 20-25 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa que contiene ARS se neutraliza con NH<sub>4</sub>OH al 10% y se transfiere a una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas Versamax. Análisis metabólico de células vivas. La intensidad de la tinción de rojo de Alizarina se correlaciona con la cantidad de calcificación presente en las muestras.

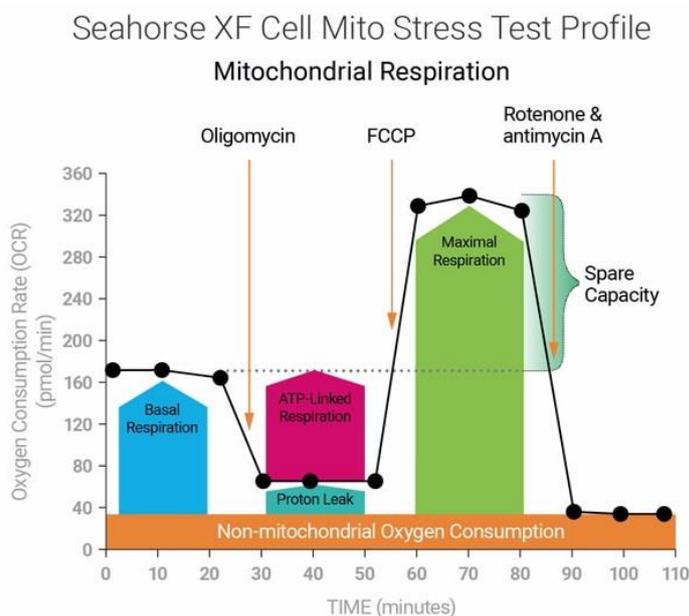
##### 4.6. Análisis metabólico en tiempo real mediante la tecnología Seahorse y el kit de Cell Mito Stress.

El análisis metabólico en tiempo real se realiza utilizando el Agilent Seahorse XFe24. Este equipo mide las dos principales vías metabólicas: la respiración mitocondrial y la glicólisis, evaluando la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) de células vivas en una placa multipocillo. Este método emplea

sondas fluorescentes para detectar O<sub>2</sub> y H<sup>+</sup> libres. Brevemente, el analizador metabólico Seahorse mide las tasas basales de OCR y ECAR antes de agregar inhibidores metabólicos. La OCR se mide en unidades de pmol/minuto y la ECAR en mpH/minuto.

Las VIC se incuban con su pretratamiento y agentes inflamatorios correspondientes 24 hr antes de su análisis. La cantidad de células necesarias va entre 30.000 a 35.000 por pocillo de la placa de Seahorse de 24 pocillos. Los inhibidores, previamente cargados en los puertos de administración de fármacos del cartucho, se inyectan secuencialmente en las células, permitiendo calcular diferentes parámetros metabólicos. Se pueden realizar varios ensayos utilizando distintas combinaciones de inhibidores metabólicos. Posteriormente, se realiza un análisis de datos utilizando el software *Seahorse Analytics*.

La prueba de estrés Agilent Seahorse Cell Mito Stress se basa en la inyección secuencial de tres moduladores de la respiración mitocondrial: oligomicina, cianuro de carbonilo-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) y rotenona/antimicina A (**Figura V**). La inyección de estos moduladores en el orden adecuado permite calcular parámetros clave de la función mitocondrial. Para normalizar los datos, las células se cuantifican mediante tinción de núcleos con Hoechst a 1 µM al final del experimento. El recuento de células se realiza utilizando un lector de microplacas Cytation 5 (Biotek/Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) conectado al analizador Seahorse. Se utiliza el software Seahorse Analytics (<https://seahorseanalytics.agilent.com>), para calcular varios parámetros clave como: ECAR basal (mpH/min/10<sup>4</sup> células), respiración basal (pmol/min/10<sup>4</sup> células), respiración máxima (pmol/min/10<sup>4</sup> células), producción de ATP vinculada a la fosforilación oxidativa (pmol/min/10<sup>4</sup> células), fuga de protones (pmol/min/10<sup>4</sup> células), capacidad respiratoria adicional (pmol/min/10<sup>4</sup> células), y respiración no mitocondrial (pmol/min/10<sup>4</sup> células).



**Oligomicina (1.5µM):** Inhibidor de la ATP sintasa:

- ↓ Respiración mitocondrial
- ↓ Síntesis de ATP

**FCCP (2µM):** Agente desacoplador de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa:

- ↓ Potencial de membrana mitocondrial
- ↑ OCR complejo IV

**Rotenona / antimicina A (0.5µM):**

- Inhibidores del Complejo I/III:
- ↓ Respiración mitocondrial

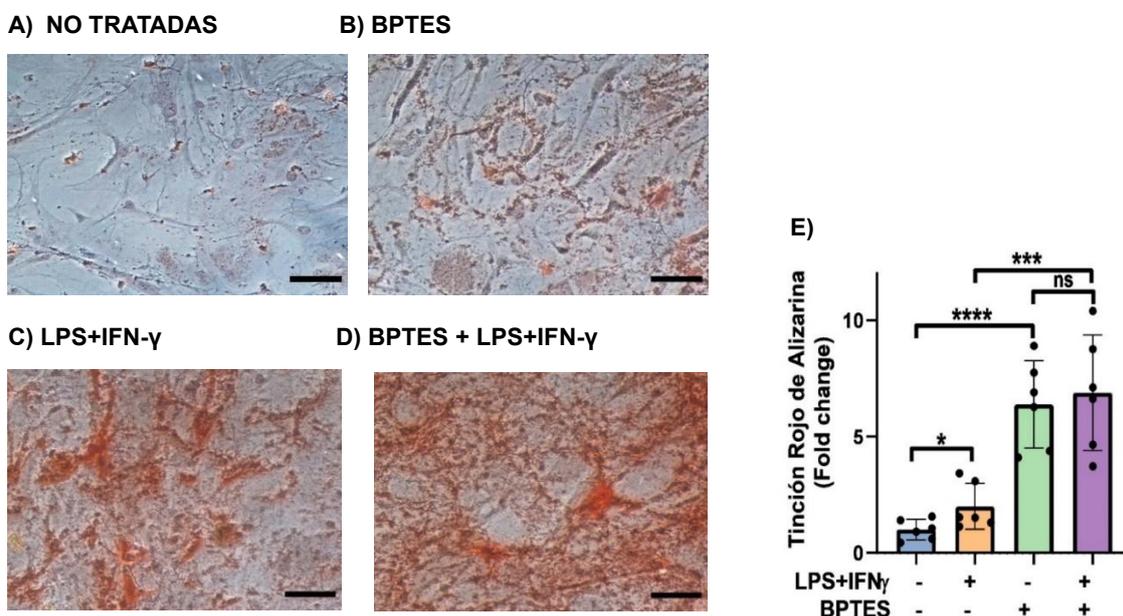
**Figura V. Perfil de la prueba metabólica del ensayo Mito Stress.** Esta figura muestra los parámetros clave de la función mitocondrial y la secuencia de inyecciones de moduladores metabólicos. También ilustra la inyección secuencial de moduladores para el ensayo de Mito Stress, sus concentraciones de uso y su efecto metabólico posterior. Figura tomada de la página web de Agilent - Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit.

## 5. Resultados

### 5.1. La inhibición de la enzima clave en la glutaminolisis, GLS1, aumenta la calcificación *in vitro* de las VIC explantadas de pacientes sin enfermedad valvular.

Como se ha comentado en el apartado de Introducción, estudios del grupo asocian a la inflamación con una reprogramación metabólica de VIC hacia un fenotipo más glucolítico que es necesario para los procesos de diferenciación y calcificación *in vitro*, y muestran que agentes inflamatorios como IFN- $\gamma$  y LPS promueven una disminución significativa en la expresión del gen que codifica para la enzima glutaminasa 1, *GLS1*<sup>28,44</sup>. Con este antecedente, se llevó a cabo una serie de experimentos para investigar el papel del metabolismo de la glutamina y la enzima GLS1 en el proceso de la calcificación de VIC humanas. Para ello se utilizó un inhibidor alostérico y específico de la enzima GLS1, bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2-il) sulfuro de etilo (BPTES). El estudio se realizó en un modelo celular de VIC explantadas de válvulas aórticas de pacientes sin enfermedad valvular y se llevó a cabo la inducción de la calcificación *in vitro* de las VIC durante 7 días y los nódulos de calcificación se visualizaron y se cuantificaron mediante la tinción con rojo de alizarina.

Las imágenes de la tinción de alizarina obtenidas mediante microscopía óptica revelaron un aumento en los nódulos de calcificación en las células tratadas con BPTES (**Figura 1B**) en comparación con las no tratadas (**Figura 1A**). La cuantificación de la tinción revela un aumento estadísticamente significativo de la mineralización en VIC tratadas con BPTES (**Figura 1D**). La co-estimulación con LPS e IFN- $\gamma$  indujo una marcada mineralización (**Figura 1C**), corroborando hallazgos previos<sup>26</sup>. Se detectó una diferencia significativa entre la mineralización de las células tratadas con BPTES y aquellas tratadas con BPTES y activadas con LPS+IFN- $\gamma$ , pero no se observó cambio por el pretratamiento con BPTES en células activadas (**Figura 1D**).

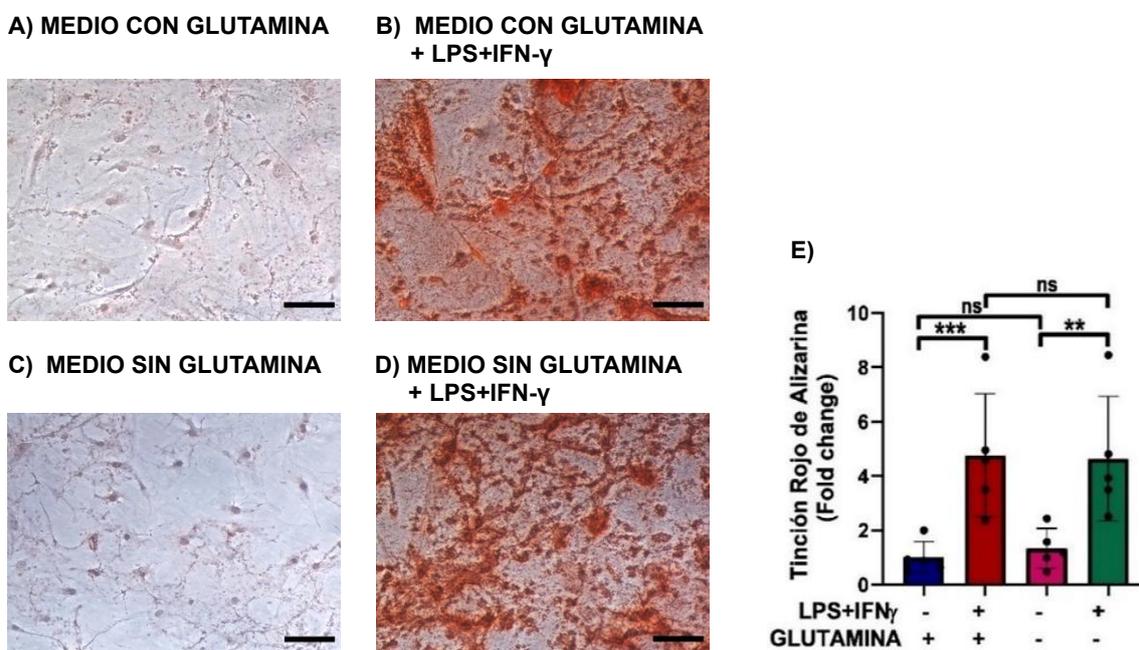


**Figura 1. La inhibición de la actividad de la primera enzima de la ruta de la glutaminolisis GLS1 incrementa la calcificación basal, pero no afecta a la calcificación inducida por inflamación en VIC humanas.** Las VIC se incubaron durante 7 días con medio de calcificación (M199 que contiene glutamina (0,68mM), suplementado con FBSi al 1%, fosfato inorgánico 2,6 mM y solución antibiótica-antimicótica al 1%); las VIC correspondientes se pretrataron con el inhibidor de GLS1, BPTES (3 $\mu$ M) durante 1 hr y se activaron o no con los agentes proinflamatorios IFN- $\gamma$  (100ng/mL) + LPS (1 $\mu$ g/mL). Imágenes representativas de la tinción con Rojo de Alizarina y su respectiva cuantificación. N=6 cultivos aislados de individuos independientes). La barra negra representa la escala de 100 $\mu$ m. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, ns = no significativo. Prueba de ANOVA One-way con el test Tukey's a posteriori.

Los resultados indican que la inhibición de la enzima GLS1 en la ruta de la glutaminólisis aumenta los nódulos de calcificación en VIC. Además, sugieren que esta inhibición no tiene un efecto modulador adicional sobre la calcificación más allá de lo observado en las células activadas con agentes inflamatorios.

### 5.2. La carencia de la glutamina en el medio de cultivo celular no modifica la calcificación de las VIC

El siguiente paso fue investigar el efecto de la privación de la glutamina en la calcificación *in vitro* de las VIC<sup>41,50</sup>. Para ello, las VIC se cultivaron en medio de calcificación DMEM con y sin glutamina durante 7 días, como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Los resultados de la tinción con rojo de alizarina indicaron que la ausencia de la glutamina no tiene efectos significativos en la calcificación de las VIC comparado con el medio con glutamina (**Figura 2A-B, E**). Además, se induce la calcificación mediada por agentes inflamatorios tanto en presencia como en ausencia de glutamina (**Figura 2C-E**). Estos hallazgos sugieren que la captación de glutamina no es relevante en el proceso de mineralización de las VIC.



**Figura 2. La presencia y ausencia de glutamina en el medio de cultivo no altera los niveles de mineralización de VIC tanto a nivel basal como la inducida por agentes inflamatorios.** Las VIC fueron cultivadas durante 7 días con medio de calcificación (DMEM suplementado con FBSi al 1%, fosfato inorgánico 2,6 mM y solución antibiótica-antimicótica al 1%; con o sin glutamina (0.68mM) y las células se activaron con los agentes proinflamatorios como en la Figura 1. Imágenes representativas de la tinción con Rojo de Alizarina y su respectiva cuantificación (N=5). La barra negra representa 100 $\mu$ m. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, ns = no significativo. Análisis de ANOVA Two-way con el test de Sidak a posteriori.

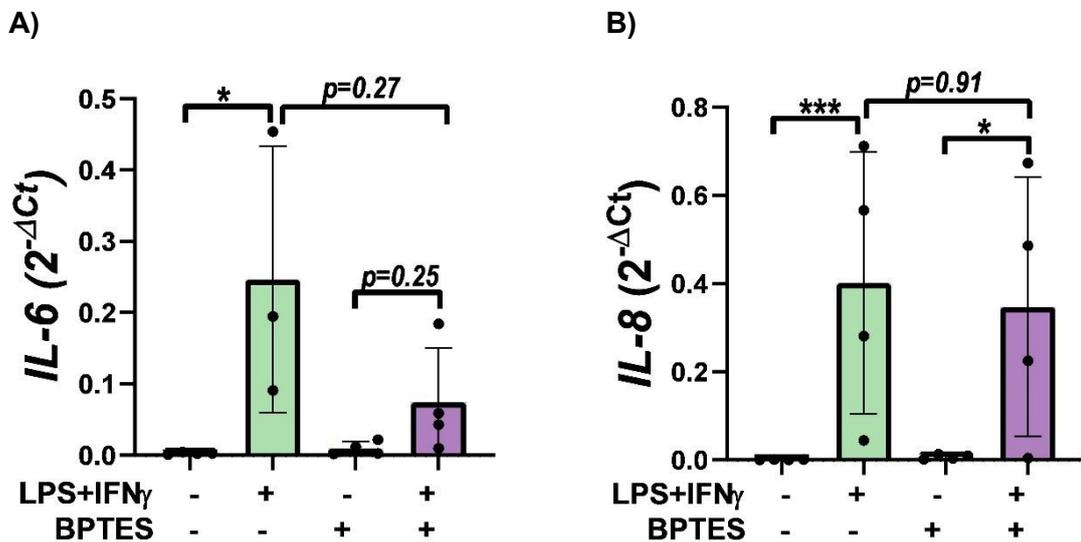
### 5.3. La inhibición de la enzima GLS1 no afecta a los niveles de transcritos del gen IL-8 ni a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y muestra una tendencia a reducir la expresión de IL-6 bajo condiciones inflamatorias

Parra-Izquierdo I, et al.<sup>26</sup>, demostraron que la coestimulación de VIC con IFN- $\gamma$  + LPS induce la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8, que habían sido asociadas a la patogenia de la CAVD contribuyendo a la calcificación y degeneración de las válvulas aórticas<sup>22</sup>, y Sánchez-Bayuela T, et al.<sup>28</sup>, demostraron que la glicólisis es necesaria para la sobreexpresión de citocinas en el contexto de la enfermedad. Así

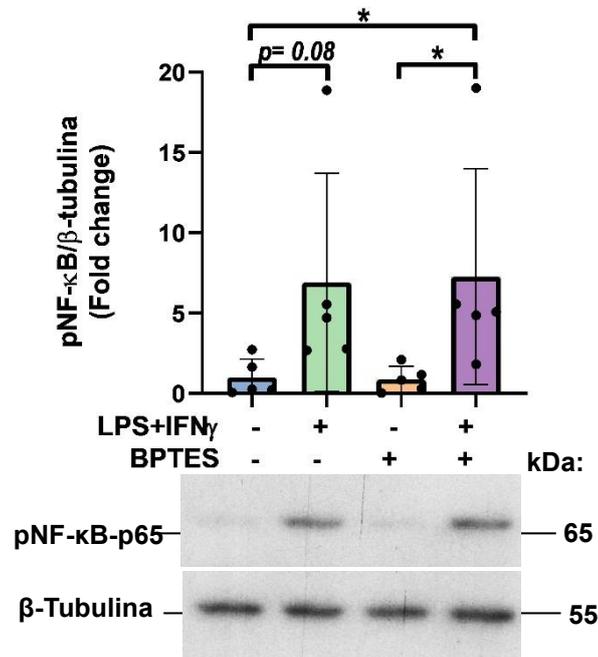
también, se ha demostrado que la citocina proinflamatoria IL-6 se une a receptores en la superficie celular lo que activa una cascada de señalización que lleva al transporte de NF-κB al núcleo donde activa la expresión de genes proinflamatorios,<sup>22</sup>.

Por lo anterior, nuestro trabajo abordó el posible papel de la glutamina en este proceso, y se cuantificaron tanto los niveles de los transcritos de *IL-6* e *IL-8* mediante la técnica de RT-qPCR como la activación de NF-κB mediante ensayo Western Blot con la finalidad de estudiar la inhibición de GLS1 con BPTES y su modificación en la respuesta inflamatoria. En los experimentos realizados en las VIC activadas por IFN-γ + LPS se observó un aumento significativo en la expresión de *IL-6* e *IL-8* respecto a las no tratadas (**Figura 3A-B**), confirmando lo descrito previamente por Parra-Izquierdo I, et al.,<sup>26</sup>. En el caso de *IL-6*, se observó una tendencia a disminuir sus niveles de transcritos en las VIC pretratadas con BPTES y activadas por IFN-γ + LPS respecto a las células activadas sin pretratamiento. (**Figura 3A**). En las células pretratadas con BPTES no se obtuvo un incremento en *IL-8* bajo condiciones inflamatorias, lo que indica que la inhibición de GLS1 no afectó los niveles de transcritos de la *IL-8* (**Figura 3B**). En ambos casos se observó una gran variabilidad de respuesta según los pacientes, con lo que la dispersión de datos sugiere la necesidad de un aumento en el tamaño muestral para que los datos sean concluyentes.

En paralelo, se investigó el posible efecto en la activación de NF-κB analizando la fosforilación de la isoforma p65 en ensayos de Western blot, y usando β-tubulina para normalizar la carga. El análisis de la densitometría de las bandas revela una tendencia a incrementar la fosforilación de NF-κB-p65 por activación con LPS+IFN-γ. Está descrito un aumento significativo de NF-κB por agentes inflamatorios<sup>26</sup>, lo que quizá se explique por la variabilidad observada según los pacientes. Por otra parte, la activación de NF-κB en VIC pretratadas con BPTES y activadas por IFN-γ + LPS no se altera con el pretratamiento con BPTES (**Figura 3C**).



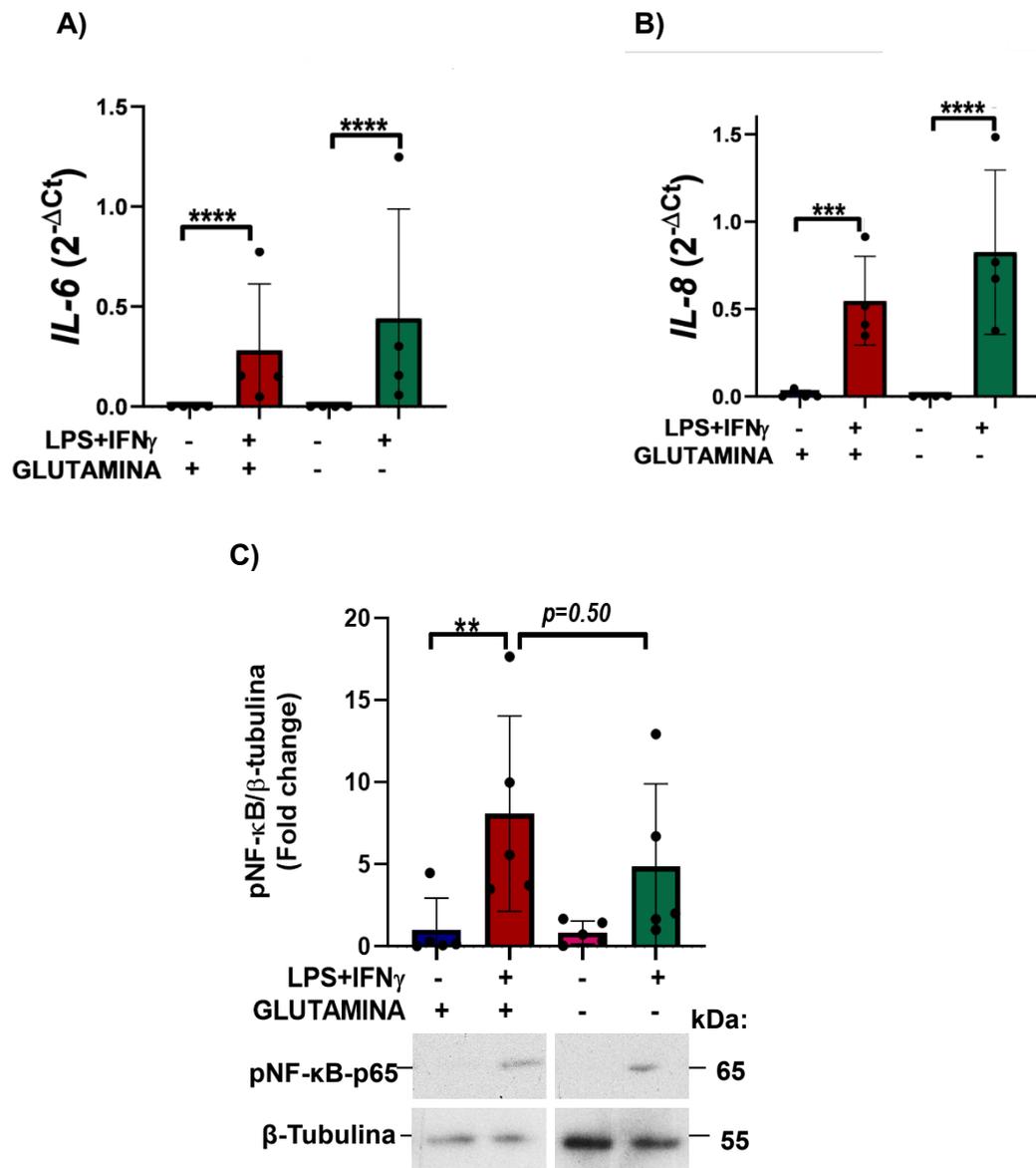
C)



**Figura 3. La inhibición de GLS1 con BPTES no modifica los niveles de transcritos de la *IL-8* ni la activación de NF-κB bajo condiciones inflamatorias, pero tiende a disminuir los niveles de *IL-6* en VIC humanas.** Las células se cultivaron en medio de activación M199 que contiene glutamina (0,68mM), suplementado con FBSi al 2 % y solución antimicótica antibiótica al 1 %. Las VIC correspondientes se pretrataron con BPTES durante 1 hr y se activaron con los agentes proinflamatorios durante 24 h con las dosis indicadas en la Figura 1. (A-B) La cuantificación de los niveles de transcritos de *IL-6*, *IL-8* se realizó mediante RT-qPCR (N=4). (C) Se evaluó la activación de pNF-κB-65 (B) n=5 mediante ensayo de Western Blot \*p<0.05, \*\*\*p<0.001. ns = no significativo. ANOVA One-way con el test de Sidak a posteriori.

**5.4. La privación de la glutamina en el medio de cultivo no afecta a la expresión de los genes *IL-6* e *IL-8* ni a la activación de NF-κB bajo condiciones inflamatorias.**

El siguiente paso fue medir los niveles de los transcritos de los genes *IL-6* e *IL-8* y la activación de NF-κB en células privadas de glutamina exógena bajo condiciones inflamatorias<sup>23,20</sup>. En nuestro ensayo se utilizó un medio de cultivo que carecía de glutamina y se coestimuló con los agentes inflamatorios IFN- $\gamma$  y LPS. Los resultados del análisis de RT-qPCR indican que la privación de glutamina en VIC bajo condiciones inflamatorias no tiene un impacto en la expresión génica puesto que no se observaron cambios en los niveles de los transcritos de los genes *IL-6* e *IL-8* de las células que fueron privadas de glutamina exógena respecto con las que recibieron glutamina en el mismo entorno inflamatorio (**Figura 4A-B**). No se observó diferencia en la activación de pNF-κB en ausencia de glutamina bajo condiciones inflamatorias (**Figura 4C**). Estos hallazgos sugieren que en ausencia de glutamina en el medio extracelular no se modifica la expresión de citocinas relevantes en inflamación ni la activación del factor de transcripción NF-κB.



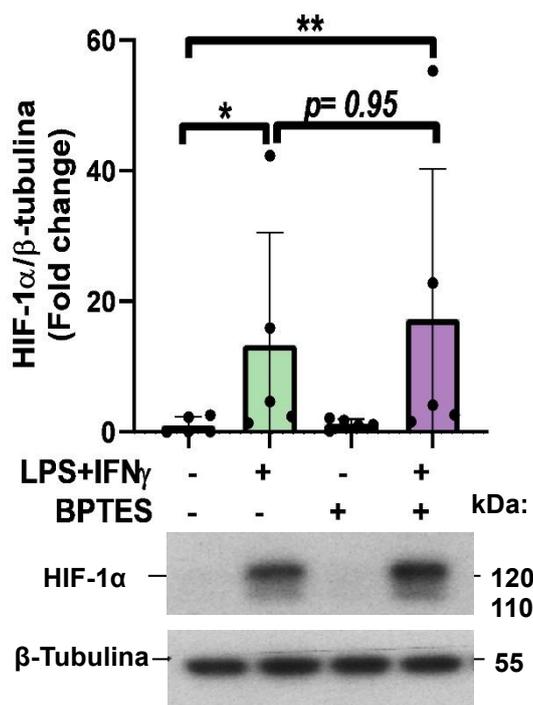
**Figura 4. La privación de la glutamina en el medio de cultivo no afecta la expresión de los genes *IL-6* e *IL-8* ni la activación de NF-κB bajo condiciones inflamatorias.** Las células fueron cultivadas medio DMEM sin glutamina suplementado con FBSi al 2 % y solución antimicótica antibiótica al 1 %; previamente en el medio correspondiente se adicionó glutamina (0.68mM) y las células se activaron con los agentes proinflamatorios IFN-γ (100ng/mL) + LPS (1μg/mL) durante 24 h. (A-B) La cuantificación de los transcritos de *IL-6*, *IL-8* se realizó el análisis mediante qPCR (N=4). (C) Se evaluó la activación de pNF-κB-65 (B) n=5 mediante ensayo de Western Blot, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Prueba de ANOVA Two-way con el test de Sidak a posteriori.

**5.5. La inhibición de la glutaminólisis no afecta a la estabilización de la proteína HIF-1α en las VIC bajo estimulación inflamatoria.**

En el contexto de la CAVD, de acuerdo con los estudios realizados por Parra-Izquierdo *et al.*<sup>26</sup> la combinación de LPS e IFN-γ induce la estabilización del factor HIF-1α en condiciones normóxicas en las VIC a través de un mecanismo mediado por la ruta JAK/STAT<sup>26</sup>. Esto podría ser relevante en las etapas iniciales de la CAVD debido a que HIF-1α regula genes metabólicos, principalmente aquellos que controlan la glicólisis como GLUT1. Para explorar el papel de la glutaminólisis en la activación del eje JAK-

STAT/ HIF, se realizó un ensayo de Western analizando la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ .

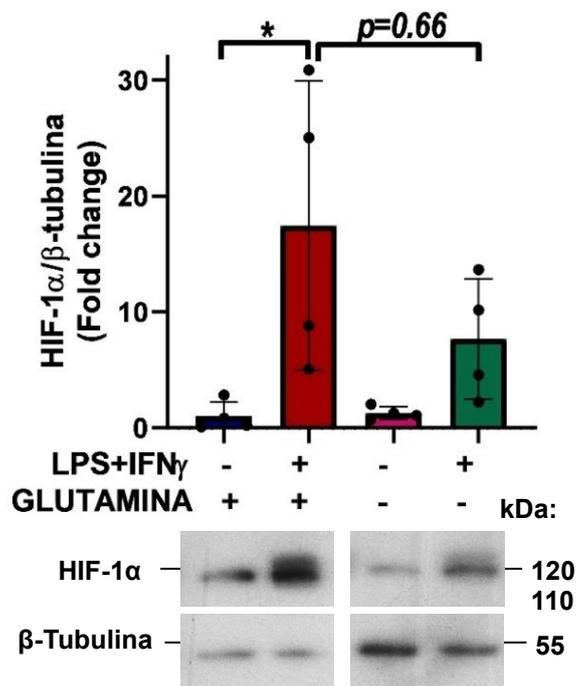
Los resultados del análisis de Western blot no muestran un cambio en la cantidad de la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$  en células pretratadas con BPTES y coestimuladas con IFN- $\gamma$  + LPS con relación a las células activadas por los agentes inflamatorios sin pretratar (**Figura 5**). Los datos indican un incremento en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en las células activadas con IFN- $\gamma$  + LPS comparado a las VIC no tratadas (**Figura 5**), lo cual confirma estudios previos reportados. Estos hallazgos indican que la inhibición de la glutaminólisis y coestimulación con IFN- $\gamma$  + LPS no afecta la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en las células.



**Figura 5. BPTES no altera el aumento en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en VIC activadas con agentes inflamatorios.** Las células fueron cultivadas en medio de activación M199 que contiene glutamina (0,68mM), suplementado con FBSi al 2 % y solución antimicótica antibiótica al 1 % . Las VIC correspondientes se pretrataron con BPTES (3 $\mu$ M), se preincubaron durante 1 hr y se activaron con IFN- $\gamma$  (100ng/mL) + LPS (1 $\mu$ g/mL) durante 24h. El análisis de la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$  mediante ensayos de Western Blot (N= 5) \*p<0.05, \*\*p<0.01. Prueba de ANOVA One-way con el test de Tukey's a posteriori.

### 5.6. La privación de la glutamina extracelular tiende a disminuir la estabilización de HIF-1 $\alpha$ por agentes inflamatorios en las VIC

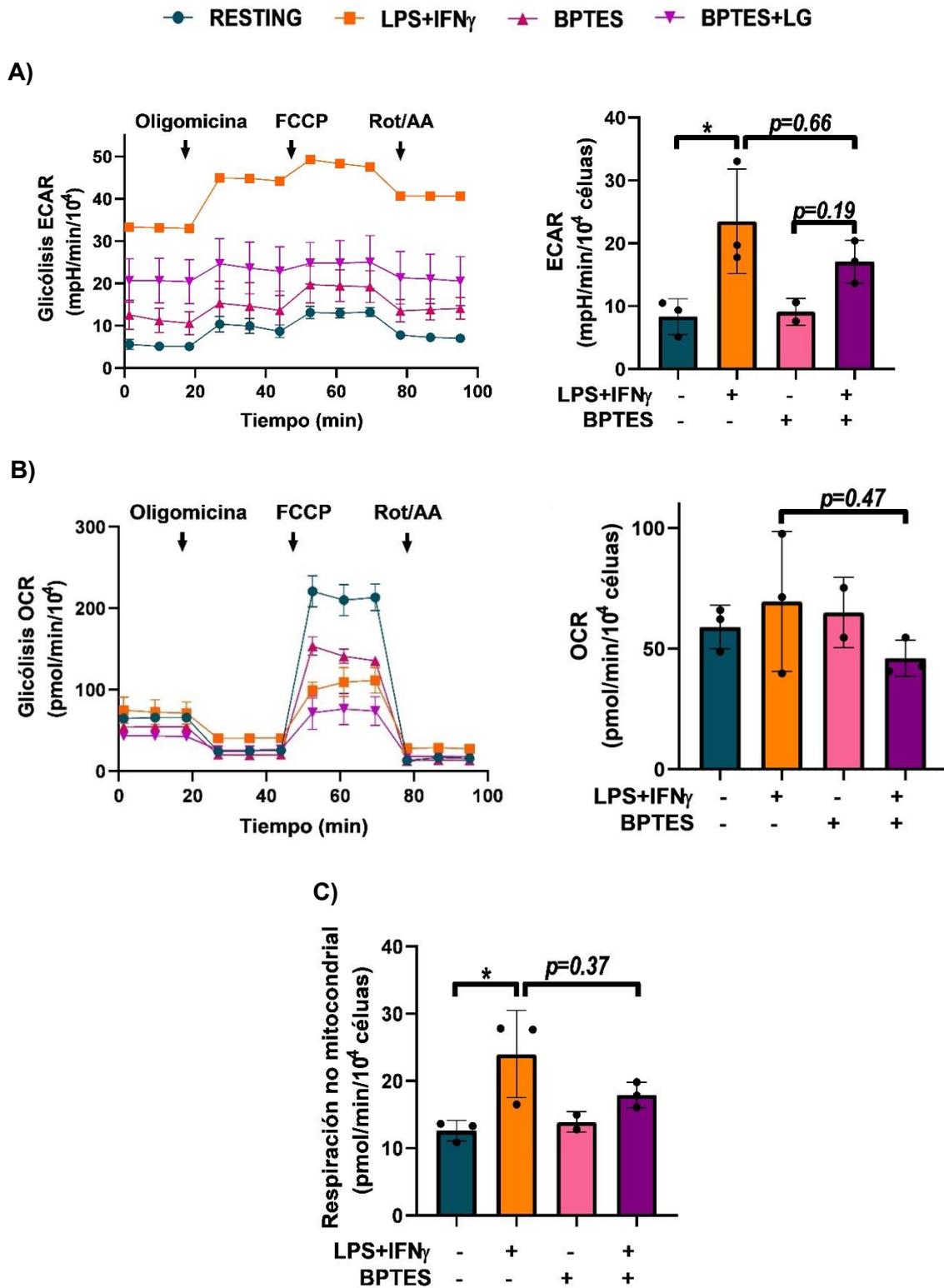
Seguidamente, para estudiar el impacto de la privación de glutamina bajo condiciones inflamatorias en la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ , se diseñó un experimento donde las VIC fueron cultivadas en medios con y sin glutamina, y posteriormente coestimuladas con agentes inflamatorios como IFN- $\gamma$  + LPS. Todos los experimentos revelaron que en células cultivadas sin glutamina existe una reducción aproximada del 50% en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en relación con las células privadas de glutamina activadas con IFN- $\gamma$  + LPS (**Figura 6**). La variabilidad de las respuestas en los individuos explica que se precise aumentar el tamaño muestral para obtener significancia estadística. Estos hallazgos sugieren que la glutamina desempeña un papel crucial como regulador de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en contextos inflamatorio.



**Figura 6. La privación de glutamina tiende a disminuir la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en VIC en condiciones inflamatorias.** Las células fueron cultivadas medio DMEM sin glutamina suplementado con FBSi al 2 % y solución antimicótica antibiótica al 1 %; previamente en el medio correspondiente se adicionó glutamina (0.68mM) y las células se activaron con los agentes proinflamatorios IFN- $\gamma$  (100ng/mL) + LPS (1 $\mu$ g/mL) durante 24h. Posteriormente, se evaluó la estabilización de HIF-1 $\alpha$  (A) n=4 mediante técnicas de transferencia Western. \*p<0.05. ANOVA Two-way con test de Sidak a posteriori.

### 5.7. La inhibición de la glutaminólisis no afecta a la reprogramación metabólica inducida por agentes inflamatorios

En estudios recientes realizados por T. Sánchez-Bayuela et al., se observó que la presencia de IFN- $\gamma$  y patrones moleculares de patógenos induce una reprogramación metabólica en VIC caracterizada entre otros por una mayor tasa de acidificación celular (ECAR)<sup>28</sup>. El análisis metabólico mediante la tecnología Seahorse y el kit de Cell Mito Stress reveló un aumento en ECAR en VIC cuando son coestimuladas con IFN- $\gamma$  y LPS (**Figura 7A**), corroborando que estos agentes inflamatorios estimulan el metabolismo celular hacia una mayor actividad glucolítica. Cuando las VIC son pretratadas con BPTES y posteriormente activadas con IFN- $\gamma$  y LPS durante 24h, también se observa una tendencia al aumento en ECAR, pero de menor magnitud en comparación con las células activadas. Por otro lado, no hubo ningún efecto significativo de activación con agentes proinflamatorios sobre la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (**Figura 7B**). El consumo de oxígeno no mitocondrial aumentó de manera significativa con el tratamiento con IFN- $\gamma$  y LPS, como se había descrito<sup>28</sup>, pero no se observaron cambios relevantes en células pretratadas con BPTES (**Figura 7C**).



**Figura 7. La inhibición de la glutaminólisis no afecta la reprogramación metabólica inducida por agentes inflamatorios.** Análisis metabólico en tiempo real utilizando el ensayo de Seahorse Cell Mito Stress realizado en VIC tratado con BPTES (3 $\mu$ g/mL), IFN- $\gamma$  (100ng/mL) + LPS (1 $\mu$ g/mL) durante 24h. (A) Gráfico de ECAR representativo (N = 3) (B) Cuantificación de OCR (N = 3). Los datos se expresan N=3. \* $p$ <0.05. Prueba de ANOVA One-way con el test Tukey's a posteriori.

## 6. Discusión

En las etapas iniciales de la CAVD la inflamación promueve el proceso de la calcificación de válvulas aórticas y se ha descrito recientemente que a nivel celular las VIC humanas expuestas a un entorno inflamatorio sufren una reprogramación metabólica hacia una hiperglicólisis que controla el proceso de la calcificación<sup>28</sup>. El presente estudio se basó en estudios preliminares del grupo en los que agentes proinflamatorios alteran la expresión de genes metabólicos, en concreto reducen la expresión de *GLS1* en VIC<sup>44</sup> y en investigaciones previas que subrayan la importancia de la glutamina en la fisiología y patología cardiovascular<sup>37,39</sup>. Los resultados de este estudio ofrecen nuevas perspectivas sobre el papel de la glutamina y la glutaminólisis en la calcificación mediada por inflamación de las VIC humanas.

Los estudios iniciales se enfocaron en investigar el efecto de la inhibición de *GLS1* en la calcificación de VIC humanas usando una aproximación farmacológica con un inhibidor selectivo de la enzima y un medio de calcificación con alto fosfato que recapitula la calcificación tipo osteogénica y distrófica. Los resultados revelaron un aumento estadísticamente significativo en la calcificación en células pretratadas con BPTES, aunque inferior al incremento de mineralización observado en células inflamadas. Estos datos junto con la bajada de la expresión de *GLS1* en VIC inflamadas<sup>44</sup>, sugieren que la inhibición de la glutaminólisis por agentes inflamatorios podría contribuir, al menos en parte, a la calcificación de VIC en un entorno inflamatorio. Esto apunta a que la glutaminólisis podría jugar un papel homeostático en VIC humanas. Por otra parte, la inhibición de la glutaminólisis no alteró la calcificación mediada por agentes inflamatorios; se podría especular que la potente calcificación en células inflamadas está ya en niveles máximos. Recientemente, Zhong et al.<sup>43</sup> quienes llevaron a cabo estudios *in vitro* con VIC, demostraron que la inhibición de la enzima *GLS1* con BPTES y en condiciones de estrés mecánico reduce la diferenciación osteogénica inducida y mediada por el canal iónico Piezo en VIC calcificadas en un medio osteogénico<sup>43</sup>. Esta disparidad aparente con nuestros resultados se podría explicar por el diferente tipo de calcificación analizada y/o por el diferente ambiente celular. Por una parte, Zhong et al estudian una calcificación osteogénica, por diferenciación celular a estirpe tipo osteoblasto, en el presente estudio se usó medio de calcificación con alto fosfato que recapitula la calcificación tipo distrófica, con nucleación y mineralización sobre cuerpos apoptóticos;. Ambos tipos de calcificaciones se han detectado en válvulas de enfermos con CAVD<sup>48</sup>. Por otra parte, el estudio de Zhong et al se realizó en condiciones de estrés mecánico, mientras que nuestro estudio se hizo en condiciones estáticas, y en su caso se observan efectos opuestos en *GLS1* según el flujo es oscilatorio o laminar, y no muestran el efecto de BPTES solo. Finalmente, otra explicación especulativa es que si en el proceso de la glutaminólisis se genera glutatión (GSH), un antioxidante que elimina especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la acción de la glutatión peroxidasa<sup>49</sup>, la inhibición de este proceso por BPTES podría afectar a la homeostasis redox, potencialmente induciendo estrés oxidativo y contribuyendo a la calcificación tipo distrófica en VIC. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para aclarar y profundizar en estos mecanismos.

A continuación, para investigar el efecto de la captación de glutamina, se estudió el impacto de la presencia/ausencia de glutamina en el medio de cultivo en la calcificación *in vitro* y se encontró que la privación de glutamina no modifica la calcificación de las VIC a nivel basal ni bajo condiciones inflamatorias. Esto sugiere que la captación de glutamina no es determinante en este proceso. Por otra parte, se ha descrito que un aumento de la glicólisis y el estrés oxidativo son cruciales en el proceso de calcificación de VIC en medio de alto fosfato<sup>28</sup>. Es importante destacar que la variabilidad en los datos se debe a la diversidad de muestras de VIC utilizadas, obtenidas de pacientes con distintos perfiles médicos y metabólicos y hacen necesario un incremento en el tamaño muestral para confirmar estos datos.

En el contexto de la inflamación, el estudio de Parra-Izquierdo I, et al<sup>26</sup>, ha descrito que la coestimulación de las VIC con IFN- $\gamma$  + LPS induce significativamente la secreción de las citocinas proinflamatorias, conocidas por ser características de la CAVD. Sánchez-Bayuela T<sup>44</sup> demostró que un aumento de la glicólisis es fundamental para dichos procesos. Con este precedente, nuestros resultados de PCR y Western blot indican que la inhibición de la glutaminólisis no afecta a los niveles de transcritos del gen *IL-8* ni en la activación de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción regulador de genes inflamatorios entre otros, en VIC expuestas a condiciones inflamatorias. Esto sugiere que, bajo estas condiciones experimentales, podrían participar otras rutas metabólicas para mantener la producción de IL-8 y la activación de NF- $\kappa$ B, de hecho un incremento en la glicólisis es necesaria para dichos procesos<sup>44</sup>. No obstante, se ha observado una tendencia hacia la reducción de los niveles de transcritos del gen *IL-6* inducidos por agentes inflamatorios en estas células. Esta tendencia inhibitoria sugiere que la glutaminólisis podría participar en la producción de IL-6 inducida por IFNs y patrones moleculares de patógenos, pero se requieren investigaciones adicionales para obtener resultados concluyentes.

El siguiente paso fue investigar la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , un factor de transcripción que desempeña un papel central en el metabolismo y en particular en la regulación de genes glicolíticos, y cuya inducción normóxica por agentes inflamatorios se ha descrito en VIC humanas<sup>26</sup>. Además, en condiciones normóxicas HIF-1 $\alpha$  se ha asociado al metabolismo de la glutamina<sup>50</sup>. En el estudio, el análisis de la proteína HIF-1 $\alpha$  confirma investigaciones previas del grupo<sup>26</sup>. En nuestros resultados, con respuestas variables y dispares según los individuos, la estabilización de HIF-1 $\alpha$  bajo condiciones inflamatorias no se altera por la inhibición de la glutaminólisis, lo que sugiere que la glutaminólisis no es relevante en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . Recientemente se ha demostrado que la estabilización de HIF-1 $\alpha$  por agentes proinflamatorios depende de la glicólisis<sup>28</sup>. Por otra parte, se encontró en todos los cultivos primarios analizados que la carencia de glutamina exógena tiende a disminuir la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en condiciones inflamatorias. El efecto inhibitorio no es estadísticamente significativo dada la variabilidad de respuestas según el individuo, pero es importante destacar que en los 4 cultivos primarios analizados se observó inhibición de al menos un 50%. Esta reducción parcial HIF-1 $\alpha$  en ausencia de glutamina exógena sugiere que la captación de glutamina podría participar, al menos en parte, en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  por agentes proinflamatorios en normoxia. Este mecanismo se uniría a la contribución de un aumento de la glicólisis a través de la rutas JAK/STAT en la estabilización normóxica de HIF-1 $\alpha$  descrito recientemente por el grupo<sup>28</sup>. Se requieren investigaciones adicionales para obtener resultados concluyentes y profundizar en el papel de la glutamina en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

A continuación, se realizaron estudios de análisis metabólico en tiempo real basados en investigaciones realizadas por Sánchez-Bayuela T en las se observó que la inyección aguda de BPTES reduce la reprogramación metabólica de VIC inducida por agentes inflamatorios, en concreto la acidificación extracelular indicativa de glicólisis y la respiración no mitocondrial<sup>44</sup>. El presente estudio se centró en analizar el efecto a tiempos más largos, 24 h, a los que se había observado bajada de los niveles de transcritos de *GLS1* en células inflamadas. Los resultados preliminares del análisis metabólico en tiempo real de 3 pacientes muestran variaciones en la respuesta; en conjunto sugieren que la inhibición de la glutaminólisis durante 24 hr no afecta la reprogramación metabólica inducida por agentes inflamatorios en VIC. Por un lado, los resultados confirman un incremento significativo en la tasa de acidificación extracelular o ECAR y la respiración no mitocondrial en las VIC cuando se coestimulan con IFN- $\gamma$  y LPS<sup>44</sup>. Este aumento en ECAR es indicativo de un cambio hacia un metabolismo celular más glucolítico. Y corroboran que la tasa de consumo de oxígeno (OCR) no se afecta en un entorno inflamatorio. Pero la inhibición de la glutaminólisis no parece afectar de modo significativo ni la tasa de ECAR ni la respiración no mitocondrial, a diferencia de lo observado en tratamientos cortos con BPTES<sup>44</sup>. Hay que tener en cuenta que estos

resultados son preliminares y realizados en cultivos de 3 pacientes con respuestas muy variables. Esto explica la dispersión de datos. Se precisa aumentar el tamaño muestral para obtener resultados concluyentes y se requieren investigaciones adicionales para aclarar el papel de la glutamina en la reprogramación metabólica en un entorno inflamatorio.

Los resultados presentados proporcionan una visión integral del impacto de los estímulos inflamatorios y la inhibición de la glutaminasa en el metabolismo de las VIC. La estimulación inflamatoria claramente impulsa un aumento en el metabolismo glucolítico, un rasgo característico de la activación celular en condiciones inflamatorias. La inhibición de la glutaminasa por BPTES simula este efecto, sugiriendo la participación de las vías metabólicas de glucosa y glutamina en la reprogramación del metabolismo asociado a la fisiopatología de VIC humanas. Estos estudios son relevantes para reproducir la fase inicial de la enfermedad CAVD en la que la inflamación juega un papel patogénico relevante.

## 7. Conclusiones

- La inhibición farmacológica de la enzima GLS1 aumenta la calcificación in vitro de las células valvulares intersticiales humanas. Sugiere que la glutaminólisis podría contribuir, al menos en parte, a la calcificación inducida por inflamación.
- La inhibición de la enzima GLS1 no altera los niveles de transcritos del gen *IL-8* ni la activación del factor NF- $\kappa$ B, pero muestra una tendencia a reducir los niveles de *IL-6* bajo condiciones inflamatorias.
- La ausencia de glutamina exógena no afecta la calcificación de las VIC activadas y no activadas y tampoco afecta a la expresión de los genes *IL-6* e *IL-8* ni a la activación del regulador transcripcional NF- $\kappa$ B bajo condiciones inflamatorias.
- La inhibición de la glutaminólisis no tiene un impacto en la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$  en las VIC bajo estimulación inflamatoria, mientras que la privación de glutamina extracelular tienen a disminuirla.
- La inhibición de la glutaminólisis no afecta directamente a los cambios metabólicos inducidos por agentes inflamatorios en las VIC.

## 8. Bibliografia

1. Moncla, L. H. M., Briend, M., Bossé, Y. & Mathieu, P. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment. *Nature Reviews Cardiology* vol. 20 546–559 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00845-7> (2023).
2. Vogl, B. J., Niemi, N. R., Griffiths, L. G., Alkhouli, M. A. & Hatoum, H. Impact of calcific aortic valve disease on valve mechanics. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* vol. 21 55–77 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10237-021-01527-4> (2022).
3. Hsu, C.-P. D., Hutcheson, J. D. & Ramaswamy, S. Oscillatory fluid-induced mechanobiology in heart valves with parallels to the vasculature. *Vascular Biology* **2**, R59–R71 (2020).
4. Freeman, R. V. & Otto, C. M. Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation* **111**, 3316–3326 (2005).
5. Zhu, Z. *et al.* Models for calcific aortic valve disease in vivo and in vitro. *Cell Regen* **13**, 6 (2024).
6. Goody, P. R. *et al.* Aortic Valve Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 885–900 (2020).
7. Rajamannan, N. M. *et al.* Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process. *Circulation* **124**, 1783–1791 (2011).
8. Joseph, J., Naqvi, S. Y., Giri, J. & Goldberg, S. Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy. *Am J Med* **130**, 253–263 (2017).
9. Yi, B., Zeng, W., Lv, L. & Hua, P. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging* **13**, 12710–12732 (2021).
10. Jain, H. *et al.* Insights into calcific aortic valve stenosis: a comprehensive overview of the disease and advancing treatment strategies. *Annals of Medicine & Surgery* **86**, 3577–3590 (2024).
11. Mittal, T. K. & Marcus, N. Imaging diagnosis of aortic stenosis. *Clin Radiol* **76**, 3–14 (2021).
12. Otto, C. M. & Prendergast, B. Aortic-Valve Stenosis — From Patients at Risk to Severe Valve Obstruction. *New England Journal of Medicine* **371**, 744–756 (2014).
13. Zebhi, B., Lazkani, M. & Bark, D. Calcific Aortic Stenosis—A Review on Acquired Mechanisms of the Disease and Treatments. *Front Cardiovasc Med* **8**, (2021).
14. Ontario Health (Quality). Transcatheter Aortic Valve Implantation in Patients With Severe, Symptomatic Aortic Valve Stenosis at Intermediate Surgical Risk: A Health Technology Assessment. *Ont Health Technol Assess Ser* **20**, 1–121 (2020).
15. Zheng, K. H., Tzolos, E. & Dweck, M. R. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy. *Cardiol Clin* **38**, 1–12 (2020).
16. Blaser, M. C., Kraler, S., Lüscher, T. F. & Aikawa, E. Multi-Omics Approaches to Define Calcific Aortic Valve Disease Pathogenesis. *Circ Res* **128**, 1371–1397 (2021).
17. Pawade, T. A., Newby, D. E. & Dweck, M. R. Calcification in Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* **66**, 561–577 (2015).

18. Pawade, T., Sheth, T., Guzzetti, E., Dweck, M. R. & Clavel, M.-A. Why and How to Measure Aortic Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *JACC Cardiovasc Imaging* **12**, 1835–1848 (2019).
19. Mathieu, P., Bouchareb, R. & Boulanger, M.-C. Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease. *J Immunol Res* **2015**, 1–11 (2015).
20. Raddatz, M. A., Madhur, M. S. & Merryman, W. D. Adaptive immune cells in calcific aortic valve disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **317**, H141–H155 (2019).
21. Parra-Izquierdo, I. *et al.* Clinically used JAK inhibitor blunts dsRNA-induced inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells. *FEBS J* **288**, 6528–6542 (2021).
22. El Husseini, D. *et al.* P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: Implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol* **72**, 146–156 (2014).
23. Gee, T. *et al.* NFκB (Nuclear Factor κ-Light-Chain Enhancer of Activated B Cells) Activity Regulates Cell-Type-Specific and Context-Specific Susceptibility to Calcification in the Aortic Valve. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 638–655 (2020).
24. Zimna, A. & Kurpisz, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int* **2015**, 1–13 (2015).
25. Perrotta, I., Moraca, F. M., Sciangula, A., Aquila, S. & Mazzulla, S. HIF-1α and VEGF: Immunohistochemical Profile and Possible Function in Human Aortic Valve Stenosis. *Ultrastruct Pathol* **39**, 198–206 (2015).
26. Parra-Izquierdo, I. *et al.* Lipopolysaccharide and interferon-γ team up to activate HIF-1α via STAT1 in normoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1865**, 2168–2179 (2019).
27. Ivashkiv, L. B. IFNγ: signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **18**, 545–558 (2018).
28. Sánchez-Bayuela T. Inflammation via JAK-STAT/HIF-1a drives metabolic changes in pentose phosphate pathway and glycolysis that support aortic valve cell calcification. *Manuscript in review* (2023).
29. Brahma, M. K., Pepin, M. E. & Wende, A. R. My Sweetheart Is Broken: Role of Glucose in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J* **41**, 1 (2017).
30. Tran, D. H. & Wang, Z. V. Glucose Metabolism in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *J Am Heart Assoc* **8**, (2019).
31. Zhou, Y. *et al.* METTL3 boosts glycolysis and cardiac fibroblast proliferation by increasing AR methylation. *Int J Biol Macromol* **223**, 899–915 (2022).
32. Chang, Y.-C. & Kim, C.-H. Molecular Research of Glycolysis. *Int J Mol Sci* **23**, 5052 (2022).
33. Badolia, R. *et al.* The Role of Nonglycolytic Glucose Metabolism in Myocardial Recovery Upon Mechanical Unloading and Circulatory Support in Chronic Heart Failure. *Circulation* **142**, 259–274 (2020).

34. Wheaton, W. W. & Chandel, N. S. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **300**, C385–C393 (2011).
35. Iyer, N. V. *et al.* Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* **12**, 149–162 (1998).
36. Sant'Ana, P. G. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha and Glucose Metabolism during Cardiac Remodeling Progression from Hypertrophy to Heart Failure. *Int J Mol Sci* **24**, 6201 (2023).
37. Shen, Y. *et al.* Glutamine metabolism: from proliferating cells to cardiomyocytes. *Metabolism* **121**, 154778 (2021).
38. Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R. & Newsholme, P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients* **10**, (2018).
39. Durante, W. The Emerging Role of L-Glutamine in Cardiovascular Health and Disease. *Nutrients* **11**, 2092 (2019).
40. Gibb, A. A. *et al.* Glutamine uptake and catabolism is required for myofibroblast formation and persistence. *J Mol Cell Cardiol* **172**, 78–89 (2022).
41. Yang, L., Venneti, S. & Nagrath, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng* **19**, 163–194 (2017).
42. Sabari, B. R., Zhang, D., Allis, C. D. & Zhao, Y. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 90–101 (2017).
43. Zhong, G. *et al.* Activation of Piezo1 promotes osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cell through YAP-dependent glutaminolysis. *Sci Adv* **9**, (2023).
44. Sánchez-Bayuela T. Metabolic rewiring is required for inflammation, calcification, and osteogenic differentiation of human aortic valve interstitial cells exposed to an inflammatory milieu, and mimics the metabolic phenotype in calcified aortic valves. (Universidad de Valladolid, Valladolid, 2023).
45. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
46. Villa-Bellosta, R. & Hamczyk, M. R. Isolation and Culture of Aortic Smooth Muscle Cells and In Vitro Calcification Assay. in 119–129 (2015). doi:10.1007/978-1-4939-2929-0\_8.
47. Gregory, C. A., Grady Gunn, W., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* **329**, 77–84 (2004).
48. Torre, M., Hwang, D. H., Padera, R. F., Mitchell, R. N. & VanderLaan, P. A. Osseous and chondromatous metaplasia in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovascular Pathology* **25**, 18–24 (2016).
49. Choi, Y.-K. & Park, K.-G. Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment. *Biomol Ther (Seoul)* **26**, 19–28 (2018).
50. Kappler, M. *et al.* Causes and Consequences of A Glutamine Induced Normoxic HIF1 Activity for the Tumor Metabolism. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).

## 9. Anexo I. Lista de materiales y preparación de soluciones

### 1. Reactivos químicos

- Acrilamida/bis acrilamida: Bio-Rad, Hercules, CA; REF. 1610158.
- Aprotinina: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. A4529.
- Azida sódica: Merck, Darmstad, Alemania; REF. 6688.
- Azida sódica: Merck, Darmstadt, Germany; REF. 6688.
- Cloruro de potasio (KCl): Merck, Darmstadt, Alemania; REF. 4936.
- Cloruro de sodio (NaCl): Merck, Darmstadt, Alemania; REF. 4936.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. 436143.
- Dodecilsulfato de sodio (SDS): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. 436143.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF): Roche Diagnostics, Barcelona, España; REF. 10236608001.
- Fluoruro de sodio (NaF): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. S-1504.
- Hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH): Sigma-Aldrich St. Louis, MO; REF. 1336-21-6
- Hidróxido de sodio (NaOH): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. 211465.
- Leupeptina: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. L2884
- N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. T9281
- Ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. S6508.
- Persulfato de amonio (APS): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. A-3670.
- Rojo de alizarina: Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri; REF. A5533
- Tri(hidroximetil) aminometano (Tris; C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>): 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 (CHCl<sub>3</sub>): Merck, Darmstadt, Germany; REF. 1.02445.1000.
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O): PANREAC, Barcelona, España; REF. 141091.1214.
- Isopropanol (2-propanol; C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O): Thermo Scientific, Waltham, MA; REF. A461-4
- Metanol (CH<sub>4</sub>O): PANREAC, Barcelona, España; REF. 141091.1224

### 3. Cultivos celulares

- Agentes antibióticos-antimicóticos (100 µg/mL penicilina, 100 µg /mL estreptomina, 0.25 mg/mL anfotericina B): Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA; REF. 15240-062.
- BPTES: Bis-2-5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl ethyl sulfide 3µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- DMEM: Medio Modificado de Eagle de Dulbecco, suplementado con 10% FBSi y 1% de solución antibiótica-antimicótica.
- FBSi: suero fetal bovino inactivado, Hyclone, Carsbad, CA; REF. SV30160.03.
- IFN-γ recombinante humano: Peprotech Inc., Londres, Reino Unido; REF. 300-02.
- L-glutamina: BioWhittaker, Lonza Basel, Switzerland; REF. BE17-605.
- LPS de *Escherichia coli* 0111B4: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. L2630
- M199: Medio de Cultivo 199, suplementado con 10% FBSi y 1% de solución antibiótica-antimicótica.
- Placas de 6 pocillos (10 cm<sup>2</sup>/pocillo): Corning, Tewksbury, MA; REF. 3506.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 Mm pH. 7.4
- Tripsina-EDTA: BioWhittaker, Lonza Basel, Switzerland; REF. BE17-161F.

#### **4. Western Blot**

- Acrilamida 30%: Bio-Rad, Hércules, CA; REF. 1610158
- 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
- Membranas Hybond de difluoruro de polivinilideno (PVDF): Amersham, Marlborough; MA; REF. 1060023.
- Películas de autorradiografía: Fujifilm, Tokio; Japón; REF. 4741019289.
- Rascador de células: Corning, Tewksbury, MA; REF. 3008.
- Solución de bloqueo: TTBS y 5% (p/v) de leche en polvo.
- Tampón de electroforesis: Tris hidroximetil aminometano 25 mM, glicina 192 mM y 0.1% (p/v)
- Tampón de lisis: TNE + NP40 (1%), NaF 0.5M, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200mM, PMSF 0.1M, Leupeptina, Aprotinina
- Tampón de transferencia: tris hidroximetil aminometano 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v) y SDS 0.03% (p/v).
- Tampón Laemli SX: Tris-HCl 325 mM, pH 7.5, glicerol al 50 %, SDS al 10 % (p/v), β-mercaptoetanol al 10 % y azul de bromofenol 0,01 mg/ml.
- TTBS: Solución Salina Amortiguada con Tris y Tween

#### **5. RT-qPCR**

- Cebadores para la reacción de RT: Invitrogen, Carlsbad, CA; REF. Pieza n.º 58875.
- DEPC (pirocarbonato de dietilo): Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; REF. D-5758.
- DTT: Ditiotreitól (solución 0.1 M) Invitrogen, Carlsbad, CA; REF. N/P Y00147.
- Inhibidor de ribonucleasas RNAsin®: Promega, Madison, Wisconsin; REF. N251B.
- Master Mix SYBR Green: Kapa Biosystems, Wilmington, MA; REF. KK4610.
- Mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP): Amersham Biosciences, Londres, Reino Unido; REF. 10297
- M-MLV RT: Transcriptasa Inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney, Invitrogen, Carlsbad, CA; REF. 28025-013

#### **6. Análisis metabólico mediante tecnología Seahorse**

- Antimicina A: inhibidor del complejo mitocondrial 0.5µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- FCCP: cianuro de carbonilo-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona. Agente desacoplador de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa 10µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- Flux Packs: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; REF. 102340100
- Kit Seahorse XF Cell Mito Stress Test: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; REF.103010-1000.
- Medio Seahorse (SH): medio comercial, 0.001% (v/v) piruvato, 0.025% (V/V) glucosa y 0.001% (v/v) L-glutamina.
- Oligomicina: inhibidor de la ATP sintasa 1.5µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- Rotenona: inhibidor del complejo mitocondrial 1µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Seahorse XF calibrador: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; REF. 100840-000.
- Seahorse XF medio y suplementos: Agilent Technologies, Santa Clara, CA; REF.103681-100.