

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

# Estenosis aórtica calcificada y proteínas de la matriz extracelular

---

Trabajo de Fin de Máster

**Irene Castaños-Mollor Morcillo**

Septiembre de 2014



Trabajo de fin de Master, realizado en el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid, por la Universidad de Valladolid, bajo la dirección de la Dra. Carmen García Rodríguez

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. ESTENOSIS AÓRTICA CALCIFICADA	3
2. RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)	5
3. TLR Y ENFERMEDADES CARRDIOVASCULARES	6
4. COLÁGENO XIII	7
<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
1. MATERIALES	11
1 Soluciones y tampones	11
2 Agonistas	11
3 Reactivos	11
4 Anticuerpos	12
2. MÉTODOS	12
1 Cultivo celular	12
2 Análisis de la expresión de colágeno XIII por citometría de flujo	12
3 Análisis de la expresión de colágeno XIII por inmunofluorescencia	13
4 Análisis estadístico	14
<b>RESULTADOS</b>	<b>15</b>
1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COLÁGENO XIII EN AVIC	15
1 AVIC control en reposo y activadas con un ligando de TLR3	15
2 AVIC estenóticas en reposo y activadas con un ligando de TLR3	18
3 Análisis comparativo entre AVIC estenóticas y controles	19
1. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE COLÁGENO XIII en AVIC	21
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>26</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>27</b>

## ABREVIATURAS

ACE	Enzima convertasa de angiotensina
AVIC	Células intersticiales de la válvula aórtica
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
ECM	Matriz extracelular
IRF	Interferón regulador factor 3
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MyD88	Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide.
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PFA	Paraformaldehído
Poly I:C	Ácido poli-inosínico/ policitídílico (ligando de TLR3)
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
TLR	Receptores tipo Toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral

# INTRODUCCIÓN

## 1. Estenosis aórtica calcificada

La estenosis de la válvula aórtica es una enfermedad crónica que afecta al 2-3% de la población mayor de 65 años, aumentando su frecuencia con la edad, y siendo la valvulopatía más común en países desarrollados [1-6]. Consiste en el engrosamiento y calcificación de la válvula aórtica (Imagen I) que conduce a la obstrucción del flujo ventricular [3, 6]. En la actualidad la única cura que existe para remediarlo es la cirugía de reemplazo valvular con buena supervivencia posoperatoria [2, 7], o la colocación de una válvula mediante el procedimiento de transcáteter para aquellos pacientes que no puedan someterse a la cirugía [6, 8-9]. Los factores de riesgo descritos son: género masculino, tabaco, hipertensión, diabetes, y altos niveles de colesterol en sangre [1, 3-7, 10].

La válvula aórtica está compuesta por tres valvas semilunares, muy finas y flexibles, que se unen para cerrar el orificio durante la diástole [7]. De forma poco habitual, hay pacientes con tan solo dos valvas, siendo más susceptibles de padecer la enfermedad, y a más temprana edad debido al mayor estrés mecánico al que están sometidas [2-3]. Su estructura está formada por tres capas: fibrosa (fibras de colágeno compactas), ventricular (colágeno y elastina) y esponjosa, en el centro, compuesta por glicosaminoglicanos [1-2, 7]. En condiciones normales, la válvula es avascular, ya que su grosor es suficientemente fino (<1mm) como para poder recibir nutrientes por difusión directa [7].

Los principales tipos celulares contenidos en este tejido son células endoteliales y células intersticiales [7,11]. Las células endoteliales recubren la capa fibrosa que se encuentra en contacto con la aorta, formando una monocapa [7]. Por debajo de ésta, se encuentra la membrana basal y bajo ella la matriz extracelular (ECM) [11]. La ECM es de naturaleza proteica y está compuesta mayoritariamente por colágeno, elastina y glicosaminoglicanos, responsables de aportar la flexibilidad necesaria para amortiguar los diferentes cambios estructurales a los que se ve sometido, permitiendo una resistencia elevada ante el estrés hemodinámico [12]. Las células intersticiales de válvula aórtica (AVIC) se encuentran en la matriz, y son una población heterogénea que presenta generalmente un fenotipo fibroblástico o miofibroblástico. Las AVIC son responsables de la remodelación de la ECM y de la producción de factores de crecimiento, citocinas y quemocinas. Cultivadas *In vitro*, el fenotipo predominante es el de miofibroblasto, que presenta capacidad contráctil y de remodelación de la ECM [7].

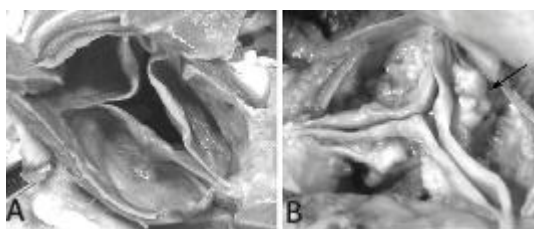


Figura I: Válvula aórtica control (A) y válvula aórtica estenótica (B), donde se pueden observar depósitos lipocalcificados (flecha). Imagen tomada de [2].

La estenosis aórtica calcificada comparte similitudes etiopatológicas con la enfermedad de la aterosclerosis [1, 10]. Durante décadas se pensaba que era una enfermedad degenerativa, pero recientes evidencias sugieren que es resultante de un proceso inflamatorio activo [3, 5, 10]. Presenta engrosamiento de la válvula, acumulación de masas fibro-calcificadas irregulares, desorganización de las fibras de colágeno, e infiltración de células inflamatorias [1, 5, 10].

La inflamación comienza con la finalidad de aislar el agente dañino y reparar el daño ocasionado [13]. Clásicamente, la inflamación se caracteriza por cinco síntomas: enrojecimiento, hinchazón, dolor, calor y pérdida de función del tejido [13]. Esto es debido a que durante la inflamación se produce vasodilatación [1], aumenta el riesgo sanguíneo, y el transvase de moléculas y de leucocitos que van a entrar en el tejido afectado. Cuando los macrófagos reconocen un patrón de daño, producen citoquinas proinflamatorias como Interleuquina 1 (IL-1), IL-6, y TNF $\alpha$  (factor de necrosis celular  $\alpha$ ) [14]. Los macrófagos que van a producir la síntesis de citoquinas, van a encargarse de mantener la inflamación, y al final, de su resolución. Las células endoteliales de los vasos son activadas por los mediadores, expresando distintas moléculas en sus membranas, que van a contribuir al reclamo de leucocitos y van a permitir la migración trans-endotelial hacia el foco de la inflamación [14]. Estos mediadores van a inducir la vasodilatación en la zona afectada. Además se ha demostrado expresión angiogénica intensa así como de algunos de sus reguladores más importantes [5, 15]. La angiogénesis aparece siempre que hay inflamación crónica, ya que está vinculada a la proliferación, migración y reclutamiento de las células inflamatorias al tejido [15]. En condiciones normales la inflamación dura poco tiempo y se resuelve una vez reparado el daño [14, 16]. Los macrófagos van a estimular a los fibroblastos a sintetizar colágeno y a las endoteliales a generar nuevos vasos. Pero de manera anómala, la señalización prolongada provoca que los macrófagos no manden señales anti-inflamatorias, sino que continúa habiendo señalización [16] activando la respuesta inmune adaptativa.

La válvula aórtica es responsable de que no haya reflujo [7], y está sometida a una enorme presión [11]. En esas zonas de mayor presión, se produce un primer daño o lesión [1, 7, 10-11] que va a desencadenar un proceso inflamatorio. La acumulación de lípidos en disposición paralela a las fibras de colágeno [10], la aparición de bacterias gram negativas (*C. pneumoniae*) [1, 5, 16] en el tejido afectado, y el consecuente incremento de citoquinas, van a activar a las células intersticiales. Al proceso inflamatorio contribuyen además tanto el depósito y la oxidación de LDL, que van a suponer un engrosamiento valvular, como la infiltración de células inmunes [2-3, 10], y van a provocar fibrosis y osteogénesis activa en ese punto [1-3, 5, 10], en la cara fibrosa de la válvula [7], momento a partir del cual la enfermedad se puede detectar. Además, cuando se produce el engrosamiento de la válvula, ya no puede alimentarse el tejido por difusión, por lo que aparece una situación de hipoxia, y comienza a expresarse factor de crecimiento de los vasos (VEGF) [6-7].

En cuanto a los mecanismos patogénicos, se ha descrito también la implicación de altos niveles de mediadores pro-osteogénicos (BMP2) [1, 17] por mediación de TNF acelerando la calcificación [18]. Es importante destacar que su expresión es inducible por lipopolisacárido (LPS) y por LDL oxidado [17]. También se ha encontrado en las lesiones la presencia de la enzima convertasa de angiotensina (ACE) activa junto a los depósitos de LDL [2, 5], que aumenta el estrés oxidativo [3] y por lo tanto acelera el desarrollo de la enfermedad [4]. Estos

indicios llevaron a probar distintos tratamientos de la enfermedad con estatinas (para reducir los niveles de colesterol) o inhibidores de ACE, pero que no han dado el resultado esperado [1]. Por lo que en la actualidad no hay alternativas terapéuticas farmacológicas a la cirugía de reemplazo [5, 17].

## 2. Receptores tipo Toll (TLR)

Los TLRs son sensores de la respuesta inmune innata con capacidad de detectar tanto patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMPs), e inducir una respuesta inmune e inflamatoria [19]. Reciben este nombre por su homología con los receptores Toll de *D. melanogaster*, y pertenecen al grupo de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que actúan en la inmunidad innata, pero sin embargo se han encontrado también en células no implicadas en inmunidad, y de hecho se ha sugerido que el corazón posee un sistema inmune innato destinado a reparar daños y mantener la homeostasis, y que esa respuesta está mediada por los TLRs [16, 20]. Su activación desencadena fagocitosis, activación del sistema del complemento, inducción de la apoptosis, regulación de genes, inicio de la respuesta inmune adquirida, y activación de la maduración de las células presentadoras de antígenos [13]. Su regulación es muy precisa, aunque cuando ésta deja de serlo por una activación exagerada o por falta de control, los efectos pueden volverse sostenidos y excesivos volviéndose contraproducentes, lo que puede causar enfermedades como aterosclerosis, síndromes coronarios, sepsis, o fallo cardíaco entre otras [16].

Se han descrito 13 TLRs en mamíferos, de los cuales 10 están presentes en humanos [13, 16, 20]. Funcionan siempre como dímeros, o bien como homodímeros, o bien como heterodímeros en el caso de TLR1-TLR2, y TLR2-TLR6 [16]. Como se ha comentado antes, reconocen tanto PAMPs como DAMPs [13, 16], es decir, tanto lo infeccioso no propio como lo propio no infeccioso.

Según su localización subcelular, en la membrana plasmática encontramos:

- TLR1: que junto con TLR2 reconoce la pared celular de hongos y bacterias gram positivas, y triacil-lipopéptidos.
- TLR2: reconoce lipoproteína y peptidoglicano de las bacterias gram positivas.
- TLR4: reconoce LPS de las bacterias gram negativas, causante del choque séptico más común [13].
- TLR5: reconoce flagelina bacteriana.
- TLR6: que junto con TLR2 va a reconocer el zimosano de la pared de las levaduras, y ácidos lipoteicoicos (diacil-lipopéptidos).

Los TLRs endosomales son:

- TLR3: reconoce RNA de doble cadena de virus
- TLR7: reconoce RNA monocatenario de virus
- TLR8: reconoce RNA monocatenario de virus y U1snRNA entre otros.
- TLR9: reconoce islas CpGs de DNAs bacterianos [13, 16].

En cuanto a las cascadas de señalización, todos los receptores salvo TLR3 van a interactuar vía TIR con el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que a su vez va a activar la ruta de las MAP kinasas, que va a acabar con la degradación por ubiquitinación en el proteosoma de IκB, proteína inhibidora de NF-κB, por lo que ésta queda libre y se trasloca al núcleo, en donde realiza su función de regulación de numerosos genes implicados, entre otros, en inflamación [13, 20].

Por otro lado, TLR3 y TLR4 van a actuar por medio del adaptador proteico TRIF, por una vía independiente de MyD88 (figura II), activando desde ahí la ruta de las MAP kinasas [13, 16].

Las cascadas de señalización activan a NF-κB y genes dependientes de NF-κB, e IRF3, que a su vez van a inducir la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN1, que va a provocar la respuesta inmune y más tarde su resolución y fin de la respuesta inflamatoria. NF-κB va a regular la expresión de moléculas de adhesión y quemocinas que van a reclutar a macrófagos y neutrófilos [16, 20], células dendríticas que son células presentadoras de antígenos, y células T, que van a diferenciarse para producir la respuesta adaptativa [20].

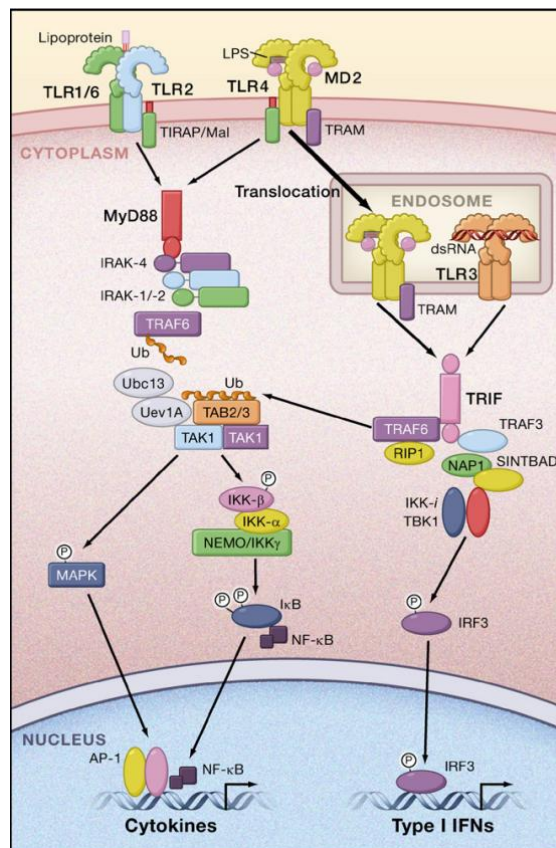


Figura II: Rutas de señalización de TLR4 y TLR3 entre otras. Rutas dependiente e independiente de MyD88. Imagen tomada de [13].

### 3. TLR y enfermedades cardiovasculares.

Como se ha dicho, los receptores TLR son esenciales para la respuesta inmune en el caso de una infección, pero sin embargo, su activación mantenida puede contribuir a procesos inflamatorios agudos y crónicos, y por tanto a la patogenia de enfermedades, entre ellas las

del sistema cardiovascular [16]. Además, estudios recientes han propuesto que las moléculas endógenas derivadas de células muertas o de ciertas condiciones patológicas también estimulan a los TLR acelerando las enfermedades inflamatorias y autoinmunes [20].

Por otro lado, también se ha descrito que en el sistema cardiovascular, los TLR se han relacionado con enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis [21]. Estudios recientes sugieren que el corazón posee componentes del sistema inmune innato entre ellos expresan varios TLRs [16], y más recientemente, se han relacionado los TLR con la estenosis aórtica [19], ya que en la válvula aórtica calcificada se ha detectado un incremento tanto de los niveles de receptores TLR2 y TLR4, como de su activación vía NF- $\kappa$ B [19]. Las AVIC procedentes de válvulas control expresan todos los TLR salvo el TLR8, siendo TLR4 el más abundante, seguido de TLR1, TLR3 y TLR6. En AVIC procedentes de válvulas estenóticas los niveles de TLR2 y TLR4 se ven aumentados [19, 22-23].

La activación *in vitro* de las AVIC con diferentes estímulos activa a los receptores TLR2, TLR4 y TLR3, promoviendo el aumento de la expresión de mediadores inflamatorios como IL-8, MCP-1, y citocinas como VEGF y OPG. Así, como ocurre en la estenosis de la válvula aórtica, las LDL oxidadas son reconocidas por TLR4 [19, 12]. Por otro lado, también se ha visto que la activación de TLR3 por Poly I:C, un polímero de ácido inosínico y citidílico que simula la respuesta de virus de dsRNA, en células AVIC induce la misma activación sostenida de producción de NF- $\kappa$ B, produciendo las mismas citoquinas proinflamatorias que TLR4, e induciendo la actividad de calcificación [19]. Esto sugiere un posible papel de infección viral en la enfermedad [19].

Además se induce la expresión de marcadores pro-osteogénicos como BMP2, Runx2 y el marcador de calcificación temprana, fosfatasa alcalina, así como la formación de nódulos de calcificación *in vitro* [19, 23]. Por último se ha descrito que BMP2 está involucrada en potenciar la actividad de ALP inducida por estimulación de TLR en AVIC [23].

#### 4. Colágeno XIII

Como ya se ha mencionado, se sabe que el colágeno es un componente estructural de las válvulas cardíacas [2, 11] y está además implicado en remodelación de la membrana extracelular [3]. La superfamilia de proteínas de colágeno está formada por varias proteínas transmembrana. No hay datos en la literatura que relacionen a un miembro de la familia, colágeno XIII, con la patología de la estenosis de la válvula aórtica, pero en el laboratorio se llevó a cabo un análisis genómico completo sobre células intersticiales de la válvula por microarrays, cuyos resultados demuestran la sobreexpresión del gen col13a1 (gen del colágeno XIII) en células de válvulas estenóticas con respecto a válvulas control (datos no publicados).

El colágeno XIII forma parte del subgrupo de proteínas transmembrana de tipo II dentro de la superfamilia de colágeno junto con los colágenos XXIII y XXV con los que comparte similitud estructural [24]. Como se observa en la figura III, posee un corto dominio citosólico, uno transmembrana, y un largo ectodominio que puede ser cortado y liberado en la ECM [24]. Se



expresa fundamentalmente en tejidos mesenquimales, pero siempre a bajos niveles, sin embargo, se ha visto que éstos aumentan en ciertas condiciones patológicas como el cáncer [24].

Hasta fechas recientes se había adjudicado al colágeno XIII un papel meramente estructural, como molécula de adhesión debido a sus numerosas interacciones con la membrana basal y otras proteínas de la matriz extracelular estableciendo uniones matriz-célula y célula-célula [24]. Sin embargo, gracias a estudios realizados *in vivo* con ratones modificados genéticamente, conocemos que también posee un papel funcional en el desarrollo, maduración y diferenciación de tejidos musculoesqueléticos y vasculares, y en el mantenimiento de la integridad de los tejidos [24]. Se sabe además que su expresión aumenta en ciertas condiciones patológicas tumorales, y se cree que tiene un papel de protección contra el desarrollo del cáncer.

Estudios *in vitro* sugieren un doble papel para el colágeno XIII como proteína transmembrana y de cubierta, cuyas proporciones varían en función del tipo celular. Se localiza en las uniones focales de cultivos celulares y su ectodominio queda incorporado a la matriz extracelular [24]. Su escisión puede darse de forma intracelular en el aparato de Golgi y posteriormente sería liberado por transporte vesicular, o bien esa proteólisis se puede dar en la membrana plasmática donde su secreción está regulada por la propia membrana en función de su inclusión en las balsas lipídicas ricas en colesterol, pero el destino de la parte escindida aún es desconocido, aunque podría relacionarse con regulación por retroalimentación del propio colágeno XIII [24].

Se le han atribuido al ectodominio del colágeno XIII propiedades anti-adhesivas, anti-migratorias y anti-proliferativas. Se sabe que se une a fibronectina y perlecán con alta afinidad, y a otras proteínas como colágeno IV o vitronectina con menor afinidad, así como que se une también a receptores celulares de superficie [24], como se ilustra esquemáticamente en la figura III. Por otro lado, se ha sugerido que los dominios transmembrana y soluble puedan tener un papel biológico diferente [24].

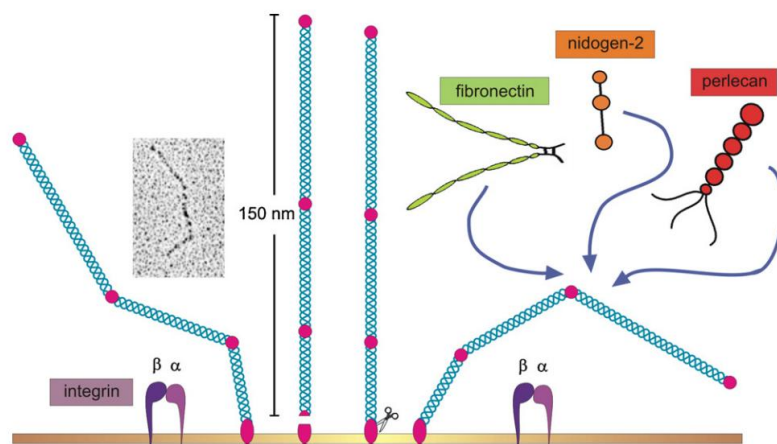


Figura III: Ilustración esquemática del colágeno XIII y sus interacciones con sus ligandos.  
Imagen tomada de [24].

A nivel de tejido, la expresión de colágeno XIII aumenta durante el desarrollo y crecimiento posnatal, y que posteriormente va disminuyendo hacia la edad adulta. Dado que procede de células mesenquimales, se puede encontrar en casi todos los tejidos, asociado a la membrana basal, como en vasos sanguíneos o uniones miotendinosas y neuromusculares, donde probablemente su papel sea mantener la homeostasis tisular [24].

Un aspecto interesante es que se ha relacionado al colágeno XIII con el metabolismo óseo, así sobre-expresando colágeno XIII en osteoblastos de cartílago y periostio en ratones transgénicos, se ha visto un enorme desarrollo óseo producido por un aumento de la capacidad de diferenciación osteoblástica [24]. Además, se ha descrito que el déficit de colágeno XIII atenúa el crecimiento del hueso, lo que confirma que el desarrollo del tejido es dependiente de los niveles de expresión de la proteína. Asimismo, el colágeno XIII contribuye a la diferenciación celular como son los osteoblastos [24].

El colágeno XIII posee además funciones en el sistema vascular. Se ha visto su inducción en hígado inflamado [24]. También se ha visto que afecta al sistema inmune, ya que induce la expresión de genes de respuesta inmune [24].

Según todo lo descrito, dado que el colágeno XIII está asociado al proceso de vasculogénesis e inflamación, y teniendo en cuenta el papel del colágeno XIII en la regulación de la masa ósea [24], se podría pensar que el colágeno XIII puede contribuir en el proceso de diferenciación osteoblástica que acontece en la estenosis de la válvula aórtica. De hecho, como se ha mencionado antes, estudios previos realizados en el laboratorio sobre células AVIC han relacionado por primera vez al colágeno XIII con la estenosis aórtica calcificada (datos no publicados). Así en un análisis del genoma completo de células intersticiales de la válvula aórtica (AVIC) realizados en el laboratorio, se observó una mayor expresión del gen *col13a1*, que codifica para el Colágeno XIII, en las células AVIC estenóticas con respecto a las control (datos no publicados), resultados posteriormente confirmados en ensayos de *Western blot* realizados en el laboratorio, en los que además se pudo apreciar la inducción de la expresión de colágeno XIII en AVIC por el tratamiento de esfingosina 1-fosfato y varios agonistas de TLRs (datos no publicados, proyecto de fin de Máster de Esther Onecha, 2013).

## OBJETIVOS

Por una parte se ha descrito que en el caso de las células estenóticas, existe un aumento de las síntesis y remodelación de la membrana extracelular [25], que posee un alto contenido en colágeno XIII [3], y se conoce que las AVIC son miofibroblastos encargados de la síntesis y el recambio de la matriz [3].

Por otra parte, estudios previos realizados en el laboratorio indican una mayor expresión del colágeno XIII en las células AVIC estenóticas con respecto a las control, y que su expresión se induce por estimulación de varios TLRs (datos no publicados).

Con estos antecedentes, y sabiendo que la estenosis aórtica es una patología que afecta a la válvula aórtica muy frecuentemente, se establecieron los objetivos siguientes:

1. Cuantificación de la expresión de colágeno XIII en:
  1. a. AVIC control en reposo y activadas con un ligando de TLR3
  1. b. AVIC estenóticas en reposo y activadas con un ligando de TLR3
  1. c. Análisis comparativo entre AVIC estenóticas y controles
  
2. Análisis de la localización subcelular de colágeno XIII

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Materiales

### 1. Soluciones y tampones.

#### Cultivo celular:

- Medio de cultivo para células AVIC: medio M199 (L-Glutamina, 1.25 g/L bicarbonato sódico): Lonza (Walkers-ville, MD), suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBSi) (Hyclone Cramlington, UK) y antibiótico antimicótico (Penicilina, Estreptomina, y Anfoterina B), de Lonza (Walkers-ville, MD).
- Medio de estimulación: M199 suplementado con 2% de FBSi y antibiótico antimicótico.
- Medio EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) (1X) líquido: KCl 400mg/L, NaHCO<sub>3</sub> 2200mg/L, NaCl 6800mg/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 140mg/L, D-Glucose 1000mg/L.
- Tripsina-EDTA: Invitrogen (Carlsbad, CA)
- Colagenasa tipo II: GibCo™ Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA).

#### Citometría de flujo:

- Tampón para citometría de flujo: Suero de oveja fetal inactivado (FSSi)-5% en PBS y EDTA 0.5M-0.1%.

#### Inmunofluorescencia:

- PBS (Tampón fosfato alcalino): 154mM NaCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.9mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.4.

### 2. Agonistas.

- Ácido poli-inosínico/ policitidílico (Poly I:C): 1µg/mL. GibCo™ Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Ligando sintético de TLR3.

### 3. Reactivos.

- Suero humano inactivado por calor (SHi): Muestra procedente de donación (Suero/EDTA). Centro de Hemoterapia de Castilla y León.
- Suero de oveja fetal inactivado por calor (FSSi): Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri)

#### Citometría de flujo:

- Reactivos del kit de permeabilización y fijación para citometría de flujo de IntraCell™ (Inmunostep, S.L., Salamanca)

#### Inmunofluorescencia:

- Poli-L-lisina 0.01% Solution. Sigma (St. Louis, Missouri).
- Fibronectina: fibronectina de plasma humano 0.1% Solución de cultivo celular Sigma-Aldrich Quimica, S.A. (St. Louis, Missouri)
- Paraformaldehído (PFA). Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).
- Metanol. Pureza 99.5%. Panreac (Castellar del Valles, Barcelona).
- NP40: Nonidet P40 Substitute. BioChemika. Sigma-Alcrich (St. Louis, Missouri).
- BSA (Albumina de Suero Bovino), Sigma (St. Louis, Missouri).
- DAPI (4,6-diamino-2-Phenyndole, dilactate): 1mg/mL. Sigma-Alcrich (St. Louis, Missouri).

- Gelvatol: 10% (p/v) de alcohol de polivinilo, 24% de glicerol (v/v), 50% de Tris 0.1M pH 8.5 (v/v) y 2.5% 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octano (DABCO). Sigma (St. Louis, Missouri)
4. Anticuerpos.
- IgG obtenido de suero de oveja, para control de isotipo, 10mg/mL. Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).
  - IgG policlonal hecho en oveja anti-Colágeno XIII humano purificado por afinidad, 0.2mg/mL. R&D Systems (Minneapolis, MN).
  - IgG anti-oveja conjugado con Fluoresceína (FITC), hecho en burro y purificado por afinidad. 1.5mg/mL. Jackson ImmunoResearch laboratories, INC (West Baltimore Pike, West Grove, PA).

## 2. Métodos

### 1. Cultivo celular.

Para la realización del estudio se utilizaron células aisladas de pacientes intervenidos en el Hospital Clínico de Valladolid. Estas células provienen de:

- válvula aórtica estenótica: de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo valvular por estenosis aórtica calcificada, que se denominarán AVIC estenóticas.
- válvula aórtica (AVIC control): de pacientes receptores de trasplante cardiaco sin estenosis valvular, que se denominarán AVIC control.

Para aislar las células intersticiales de interés, las válvulas se sometieron a una digestión enzimática con colagenasa tipo II (2.5mg/mL), durante 30 minutos a 37°C en agitación; y posteriormente con 0.8mg/mL, durante 3h a 37°C en agitación.

Las células se resuspendieron en medio de cultivo M199 10% de FBSi y se cultivaron en placas, en incubadores a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 3 ó 4 días el medio se fue renovando para asegurar el aporte de nuevos nutrientes. De la misma manera se fueron haciendo subcultivos al alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia. Para ello fueron controladas periódicamente mediante análisis morfológico al microscopio óptico, y contadas en cada resiembra mediante la cámara de Malassez.

### 2. Análisis de la expresión de colágeno XIII por citometría de flujo.

#### 2.1. Activación celular.

24 horas antes de la activación, a las células se les cambió a medio a M199 con un 2% de FBSi. Pasado este tiempo, las células se mantuvieron en reposo, o se estimularon añadiendo el agonista de TLR3: Poly I:C a la concentración de 1µg/mL durante 48h.

#### 2.2. Cuantificación de la expresión de colágeno XIII.

Las células se levantaron con tripsina, y a continuación se les añadió medio de cultivo de válvulas para neutralizar su efecto. Se centrifugaron durante 5 minutos a 450xg,

para quitar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1mL de tampón de citómetro para hacer un lavado (centrifugación de 5 minutos a 300xg, a 4°C). En este paso las células se mantuvieron a 4°C si no se iban a fijar ni permeabilizar.

En el caso de las células permeabilizadas, primero se fijaron con un reactivo comercial. Para ello, se quitó el sobrenadante, y se añadieron 100µL del reactivo fijativo A de IntraCell, tras lo cual las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, para permeabilizarlas, las células se resuspendieron en 100µL de reactivo B de permeabilización de IntraCell.

El siguiente paso fue incubar las células con el anticuerpo primario anti-Colágeno XIII en agitación durante 40 minutos a 4°C. La concentración final de anticuerpo fue de 0.2µg/100µL (concentración óptima determinada en estudios preliminares del laboratorio). Para el control de isotipo, en este paso se añadió IgG de suero de oveja a la misma concentración que el anticuerpo primario, 0.2µg/µL.

En el siguiente paso, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-oveja conjugado con el marcador fluorescente FITC, en diluciones 1:200 (concentración final de 5µL/mL), y 1:25 para los isotipos (40µL/mL). Este paso se realizó en oscuridad durante 30 minutos en agitación, a 4°C.

Finalmente las células se resuspendieron en 600µL de buffer de citómetro y se transfirieron a un tubo de citometría de flujo para su cuantificación.

Los datos se procesaron con el programa Kaluza, donde se obtuvieron las distribuciones de las poblaciones, y las medianas de la fluorescencia detectada en las distintas células, con los distintos tratamientos y condiciones.

### 3. Análisis de la expresión de colágeno XIII por inmunofluorescencia.

Dado que no hay anticuerpos comerciales para realizar este método, se realizó la puesta a punto usando un anticuerpo específico para la inmunodetección mediante *Western blot*.

#### 3.1 Siembra

Las células se lavaron con EBSS y se levantaron con tripsina. Las células se contaron y se sembraron en el cubreobjetos de 12mm para realizar los experimentos a distintas densidades: 10000 ó 20000, con medio de cultivo de válvulas. Se habían realizado experimentos previos donde se había visto que 30000 células/cubreobjetos era demasiada densidad.

En la puesta a punto se realizaron tres tipos de sustratos distintos: cubreobjetos sin tratar, tratados con poli-L-lisina, o tratados con fibronectina 30 minutos antes de la siembra, según se indique en cada caso.

### 3.2 Activación celular

Se realizó un cambio de medio 24h ó 48h antes de la activación sustituyendo por medio con un 2% de FBSi. Pasado este tiempo las células se estimularon con Poly I:C 1µg/mL, durante 48horas.

### 3.3 Detección del colágeno XIII.

En primer lugar, las células se fijaron con p-formaldehído al 3% en PBS pH7.4, durante media hora a temperatura ambiente, en agitación suave; o con metanol a -20°C durante 5 min. A continuación las células se bloquearon en PBS-10% FSSi, PBS-10% FBSi, o PBS 10% BSA, durante media hora en agitación suave a temperatura ambiente.

Para la permeabilización las células se trataron con un tampón de bloqueo NP40 0.05% y 10% de BSA en PBS durante media hora, y después se fueron lavando con un tampón NP40 0.05% en PBS.

Las células se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1h con el anticuerpo primario anti-colágeno XIII humano, hecho en oveja, en una dilución 1:100 preparado en PBS-5% BSA (concentración final: 2µg/µL), o IgG para los isotipos, preparado en PBS-5% BSA (concentración final: 2µg/µL). A continuación en las mismas condiciones, y protegido de la luz, con un anticuerpo secundario anti oveja, conjugado con FITC, también durante 1h (concentración final: 1.5µg/µL).

Tras las incubaciones con los anticuerpos para la tinción específica del núcleo celular se realizó el marcaje con 0.4µL/mL DAPI. Finalmente, los cubreobjetos con las células se montaron en un portaobjetos usando GELVATOL como líquido de montaje, y las preparaciones fueron selladas con esmalte y guardadas a 4°C protegidas de la luz.

### 3.4. Análisis de Imagen

Se tomaron distintas imágenes de cada cubreobjetos en cada preparación, tomadas en DAPI (Ex: 345nm/ Em: 455nm) para los núcleos marcados con DAPI, y en FITC (Ex: 495nm/ Em: 519nm), para el colágeno marcado en FITC (Ex: 488nm/ Em: 519nm). Posteriormente se realizaron la superposición de ambas imágenes con el programa *Image J*.

## 4. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos de citometría de flujo con el programa Kaluza (datos de la mediana de fluorescencia) usando análisis de la varianza y de test no paramétrico con los programas Microsoft Excel (2010) y GraphPad Prism 4Project (San Diego, CA). Para ello, primero se realizó el análisis de la varianza de un solo factor para comprobar la homogeneidad de los resultados dentro de cada grupo de células, AVIC estenóticas y AVIC controles. Se obtuvo una F crítica mayor que la calculada, de manera que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cada grupo, por lo que asumimos las diferencias encontradas como debidas al error aleatorio (control n=9; estenóticas n=2).

## RESULTADOS

### 1. Cuantificación de la expresión de colágeno XIII en AVIC.

#### 1. AVIC control en reposo y activadas con un ligando de TLR3.

Con el objetivo de analizar la expresión del colágeno XIII en células AVIC, se utilizó la técnica de la citometría de flujo usando un anticuerpo anti-colágeno XIII humano comercial producido en oveja y diseñado para *Western blot*, pero no usado previamente para esta técnica. En primer lugar se realizó la puesta a punto de las condiciones idóneas para realizar los experimentos. Para ello inicialmente se analizaron las células AVIC sin estimular en diferentes condiciones: células no fijadas, fijadas, y fijadas y permeabilizadas (FIG1). En la FIG1 se muestra el número de células frente a la fluorescencia FL1 (FITC). En todos los experimentos se usó un control de isotipo (IgG anti-oveja), que da cuenta de la fluorescencia inespecífica, para poder referir y cuantificar los valores de fluorescencia.

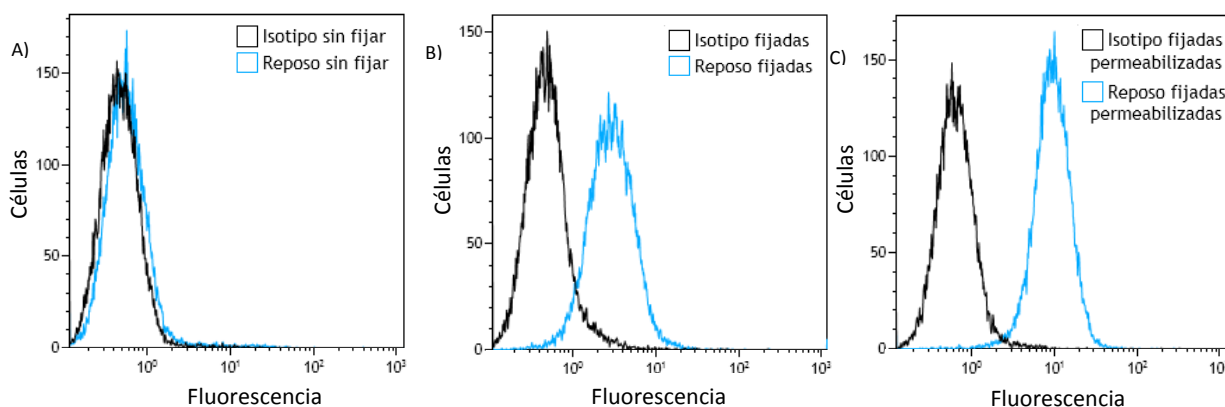


FIG1: Niveles de expresión de colágeno XIII en células AVIC control en reposo. A) Células AVIC sin fijar. B) células AVIC fijadas. C) células AVIC fijadas y permeabilizadas. Las imágenes son representativas de n=2 experimentos independientes. En azul se muestran imágenes obtenidas con el anticuerpo anti-colágeno XIII; en negro con el control de isotipo.

Se observó un ligero desplazamiento con respecto a la IgG control de isotipo (FIG1A), indicando la expresión de colágeno XIII en la superficie celular. Por otra parte, la permeabilización celular promueve un aumento de la fluorescencia (FIG1C), que es parcial en el caso de las células fijadas (FIG1B). En conjunto estos resultados indicaban que las células fijadas sufrían una permeabilización parcial, por lo que para posteriores estudios comparativos, se escogieron las condiciones de células no fijadas, y células fijadas y permeabilizadas para cuantificar la expresión en la superficie y en interior celular, respectivamente.

Usando las células AVIC control, se analizaron los niveles de expresión basal del colágeno XIII, tanto en la superficie celular, como los niveles intracelulares (FIG2).



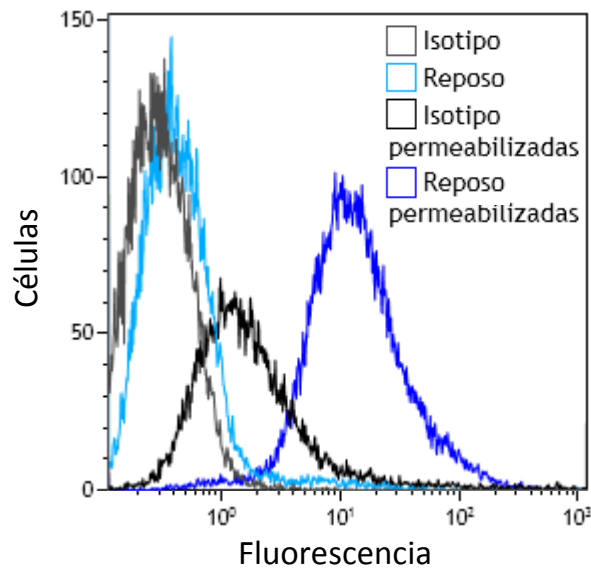


FIG2: Niveles basales de expresión de colágeno XIII en células AVIC control. Las células se analizaron mediante citometría de flujo como en las figuras 1A y 1B. Los niveles de expresión de la superficie se analizaron en células no fijadas, y los niveles intracelulares en células permeabilizadas. La imagen es representativa de n=7 experimentos independientes. En azul se muestran imágenes obtenidas con el anticuerpo anti-colágeno XIII; en negro con el control de isotipo.

A la vista de estos resultados podemos concluir que en condiciones basales la expresión de colágeno XIII en la superficie celular es pequeña, y la mayor parte de esta proteína se encuentra localizada a nivel intracelular.

Una vez conocidos los niveles basales, se estudió el efecto de la activación celular con Poly I:C, ligando de TLR3, en los niveles de expresión de colágeno XIII. Como se observa en la figura 3A tras una exposición de 48 horas en presencia del estímulo se observa un desplazamiento de la curva de fluorescencia con respecto a las condiciones de reposo lo que indica un aumento de la expresión en la superficie. En el caso de las células permeabilizadas, se observa un ligero aumento de la fluorescencia en el caso de las células estimuladas con Poly I:C con respecto a las células permeabilizadas en reposo (FIG3B).

Para cuantificar los niveles de expresión de colágeno XIII, se usaron para el análisis los datos de las medianas de las curvas de fluorescencia obtenidos con el programa Kaluza, expresándose como el cociente entre la mediana obtenida con el anticuerpo anti-colágeno XIII y la mediana obtenida con el control de isotipo.

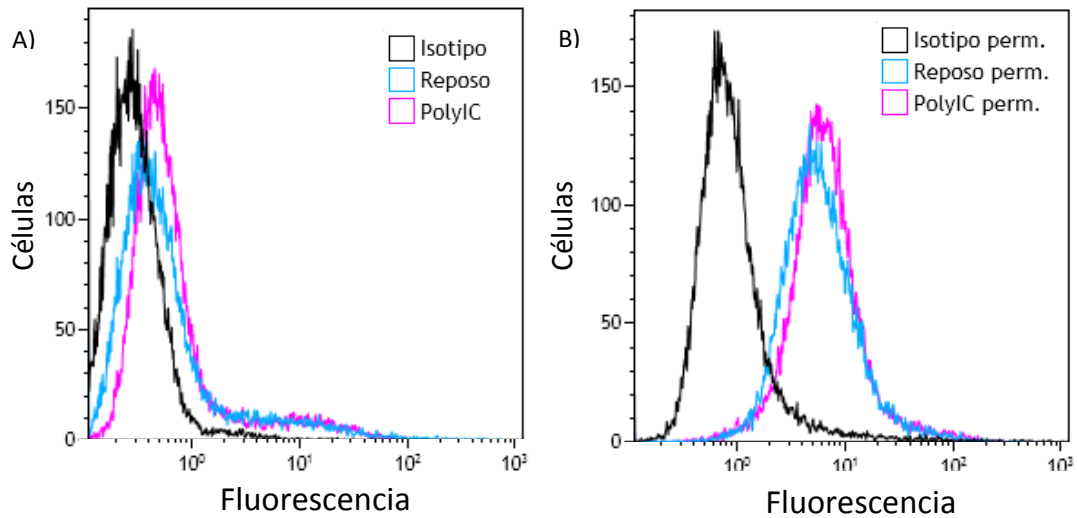


FIG3: Efecto de la activación de TLR3 en la expresión de colágeno XIII en AVIC control. Las células se analizaron mediante citometría de flujo como en las figuras 1A y 1B. Se analizó la expresión tras 48h en presencia de Poly I:C (rosa) con respecto a las condiciones de reposo (azul) y control de isotipo (negro). La imagen es representativa de n=7 experimentos independientes. Perm indica permeabilizadas

Se realizó el test estadístico no paramétrico de Mann Whitney usando el cociente entre la mediana anti-colágeno XIII/ mediana control isotipo. Se realizó el test para las células en reposo con respecto a las activadas por Poly I:C, obteniéndose un P valor de 0.0401, por lo que se asume que con una confianza del 95% que estas medianas son diferentes (FIG4). Para las células permeabilizadas obtenemos un P valor de 1.0000, por lo tanto no hay cambio significativo (FIG4).

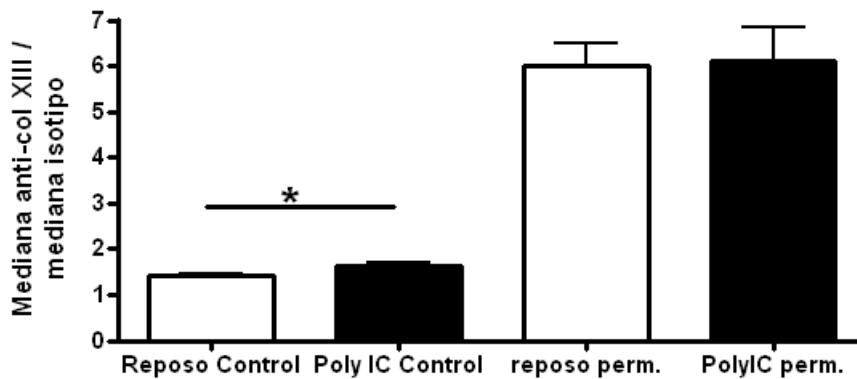


FIG4: Aumento de la expresión de colágeno XIII en la superficie celular por activación de TLR3. AVIC en reposo o tratadas con Poly I:C se analizaron en paralelo. En la gráfica se muestra el valor del cociente de la mediana con el anticuerpo anti-colágeno XIII/ mediana del control de isotipo. Los datos, media  $\pm$  error estándar, corresponden a n=8 experimentos independientes (activadas), y n=9 (reposo).

## 2. AVIC estenóticas en reposo y activadas con un ligando de TLR3.

A continuación se realizó el estudio de la expresión en células estenóticas. En primer lugar se analizaron mediante citometría de flujo células AVIC estenóticas no fijadas y AVIC estenóticas fijadas y permeabilizadas. En la FIG5A vemos que la fluorescencia detectada con el anti-cuerpo anti-colágeno XIII está ligeramente desplazada a la derecha indicando que en condiciones basales se expresa colágeno XIII (FIG3A). En las AVIC estenóticas permeabilizadas vemos un desplazamiento de la curva que indica una mayor cantidad de células que expresan colágeno XIII (FIG5B), lo que sugiere una mayor expresión de colágeno XIII en el interior con respecto a la presente a nivel de superficie. Tanto para las AVIC estenóticas en reposo como para las estimuladas con Poly I:C durante 48h, el máximo de la fluorescencia aumenta hasta 20-30, cuando en las control aumentaba hasta 10. Por lo tanto vemos un aumento de la cantidad de proteína tanto a nivel de superficie como en el interior celular en las células estenóticas con respecto a las controles.

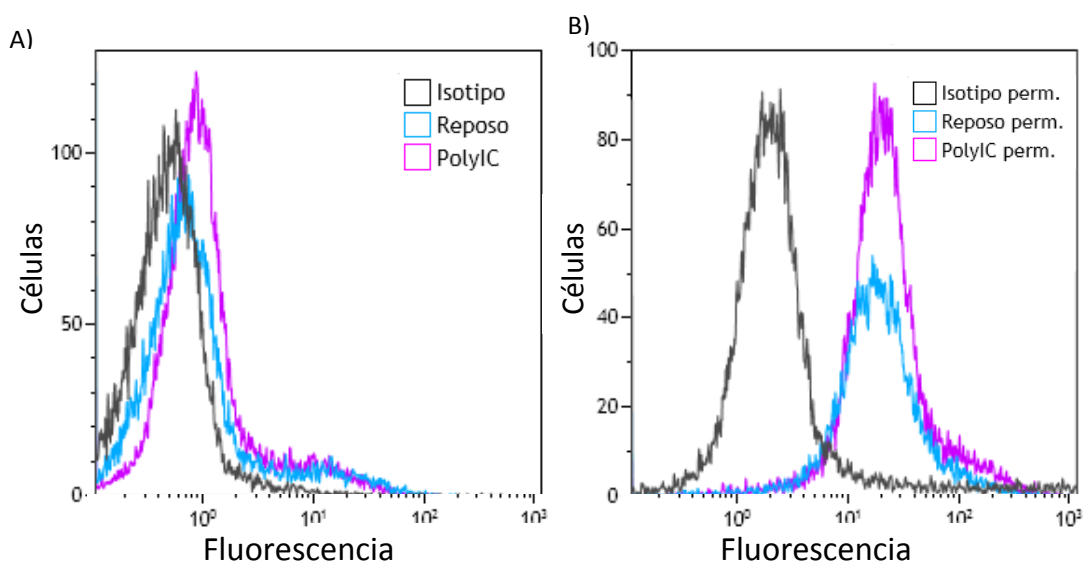


FIG5: Efecto de la activación de TLR3 en la expresión de colágeno XIII en AVIC estenóticas. Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo como en la figura 3. Se analizó la expresión tras 48h en presencia de Poly I:C (rosa) con respecto a las condiciones de reposo (azul) y control de isotipo (negro). La imagen es representativa de n=4 experimentos independientes [A], y n=2 [B].

Para cuantificar estos resultados, los datos de las medianas obtenidos con el programa Kaluza se expresaron como el cociente entre la mediana obtenida con el anticuerpo anti-colágeno XIII/ mediana del control de isotipo. Se realizó el test estadístico no paramétrico de Mann Whitney para las células AVIC estenóticas en reposo con respecto a las activadas por Poly I:C, obteniéndose un P valor de 0.0286, por lo que se asume que con una confianza del 95% que estas medianas son diferentes, y que por lo tanto la expresión del colágeno XIII aumenta de modo estadísticamente significativo por estimulación de TLR3 (FIG6).

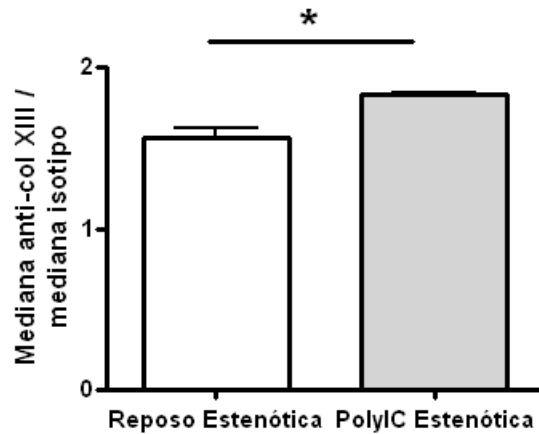


FIG6: Aumento de la expresión de colágeno XIII en AVIC estenóticas activadas con un ligando de TLR3. Análisis de AVIC estenóticas en reposo y tratadas con Poly I:C. Los datos expresados como media  $\pm$  error estándar corresponden a n=4 experimentos independientes.

### 3. Análisis comparativo entre AVIC estenóticas y controles

Cuando se realizó la comparación entre células control con respecto a las estenóticas, se observó que en condiciones basales hay un ligero aumento de la expresión de colágeno XIII en la superficie de células estenóticas con respecto a los controles (FIG7). Para el análisis estadístico comparativo entre células control con respecto a las estenóticas se realizó el test de Mann Whitney usando el valor del cociente de la mediana anti-colágeno XIII / mediana del control de isotipo entre células control con respecto a estenóticas (FIG7A). Se aplicó el test de Mann Whitney, obteniéndose un P valor igual a 0.8518, por lo que estas diferencias se consideran no significativas. Por otro lado, se hizo lo mismo con células activadas con Poly I:C (FIG7B) y en este caso se obtuvo un P valor igual a 0.7308, tampoco significativo.

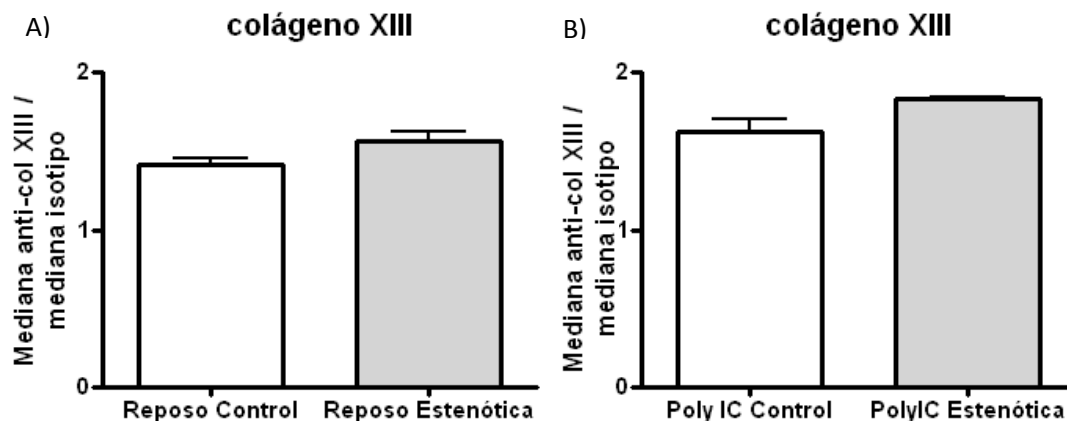


FIG7: Comparación de la expresión de Colágeno XIII entre AVIC controles y estenóticas. En la figura se muestra el cociente mediana anti-colágeno XIII/ valor mediana del control isotipo, en controles (barras blancas) y estenóticas (barras grises) A) en reposo, no habiendo diferencias significativas, (control n=9; estenóticas n=4), y B) activadas con ligando de TLR3, no habiendo tampoco diferencias significativas entre ellas (control n=8; estenóticas n=4).

No habiendo visto diferencias en estas comparaciones, los datos se expresaron como incremento con respecto a condiciones basales y se analizó si existían diferencias de activación entre células AVIC control y AVIC estenóticas (FIG8). Con el test estadístico de Mann Whitney se obtuvo un P valor de 0.7879, que informa de que no podemos considerar que haya diferencias estadísticamente significativas entre ambas.

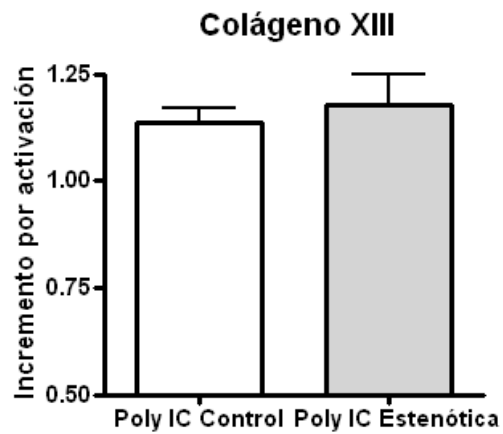


FIG8: Comparación de la activación celular en presencia de Poli I:C entre AVIC control y estenóticas. Los datos son representativos de n=8 AVIC control; n=2 AVIC estenóticas.

## 2. Análisis de la localización subcelular del Colágeno XIII en AVIC.

En paralelo con los estudios anteriores y con el objetivo de analizar la localización subcelular del colágeno XIII, se utilizó la técnica de la detección por inmunofluorescencia. En primer lugar se realizó la puesta a punto de la técnica de inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo comercial que no ha sido validado para llevar a cabo esta técnica. Para comenzar, se buscó establecer el método idóneo de fijación. Para ello se comparó la fijación con metanol, con la fijación con PFA 3%.

Las imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia sugerían que el metanol estaba permeabilizando parcialmente la membrana celular, de tal suerte que el anticuerpo teñía el colágeno XIII del interior celular, por lo que este método de fijación quedó descartado (FIG9).

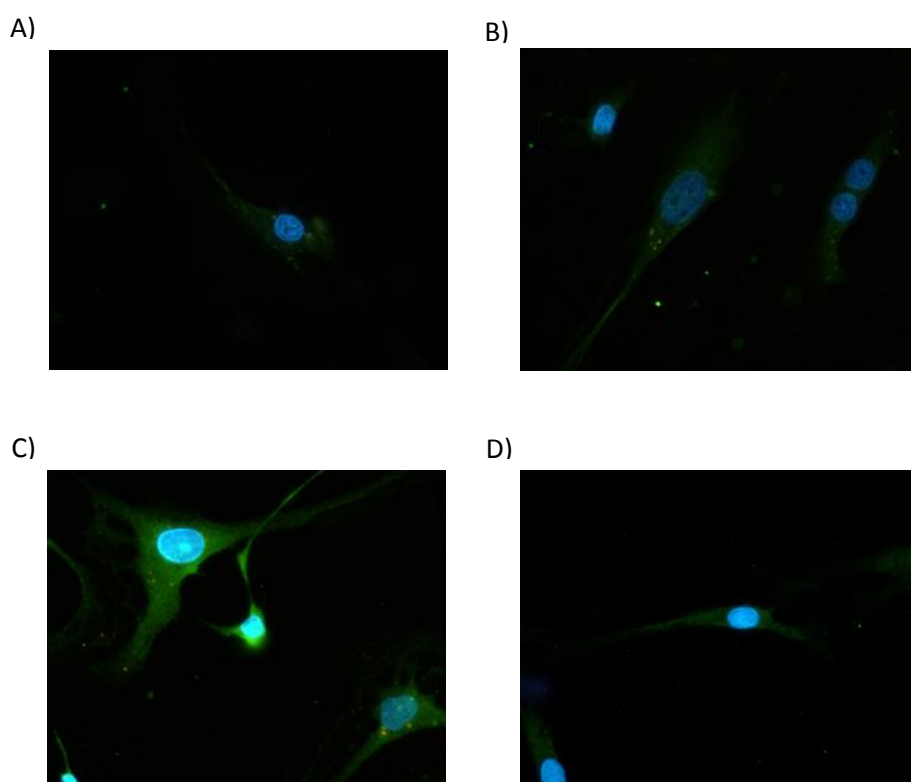


FIG9: Pruebas de fijación celular con metanol frente a PFA 3%. Estos experimentos se realizaron en células AVIC control, en reposo y activadas con Poly I:C (n=4). Se incubaron con anticuerpo anti-colágeno XIII y marcaron con un anticuerpo secundario conjugado con FITC, y posteriormente con DAPI, según se indica en materiales y métodos. A) AVIC control, activadas 48h con poly I:C, fijadas con PFA. B) AVIC control en reposo, fijadas con PFA. C) AVIC control, activadas 48h con poly I:C, y fijadas con metanol. D) AVIC control en reposo, fijadas con metanol. Las imágenes son superpuestas de la tinción nuclear con DAPI (azul) y FITC (verde).

Una vez elegido el método de fijación, se hicieron pruebas para establecer el mejor sustrato sobre el que sembrar las células. Se realizaron pruebas sembrando sobre cubreobjetos sin tratar, o tratado con Poli-L-lisina, o con fibronectina (FIG10).

Vistos los resultados se llegó a la conclusión de que el soporte idóneo eran aquellos cubreobjetos que habían sido tratados con fibronectina, debido a que las células presentaban una mejor morfología que en los otros, especialmente comparado con el caso del cubreobjetos sin tratar.

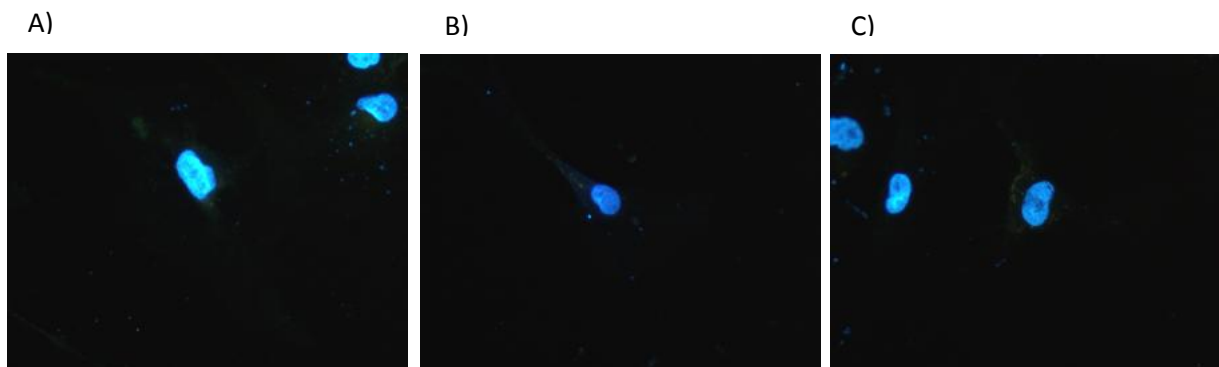


FIG10: Pruebas de elección de sustrato para el sembrado de las células. A) Células AVIC control, sobre cubreobjetos sin tratar. B) Células AVIC control, sobre fibronectina. C) Células AVIC control, sobre Poli-L-lisina.

Después de la puesta a punto anterior, para estudiar la localización subcelular del colágeno XIII, se compararon células no permeabilizadas con células permeabilizadas con NP40 al 0.05%. Vemos en estas pruebas que hay una correspondencia entre lo observado en estudios sobre citometría de flujo y de detección por inmunofluorescencia (FIG2 y 4) dado que podemos observar que el colágeno XIII se encuentra mas expresado en el interior celular que en la superficie, y que por tanto su detección es mucho mayor en las células permeabilizadas (FIG11). El hecho de que el marcaje en la superficie celular sea tan tenue sugiere la necesidad de probar un anticuerpo alternativo.

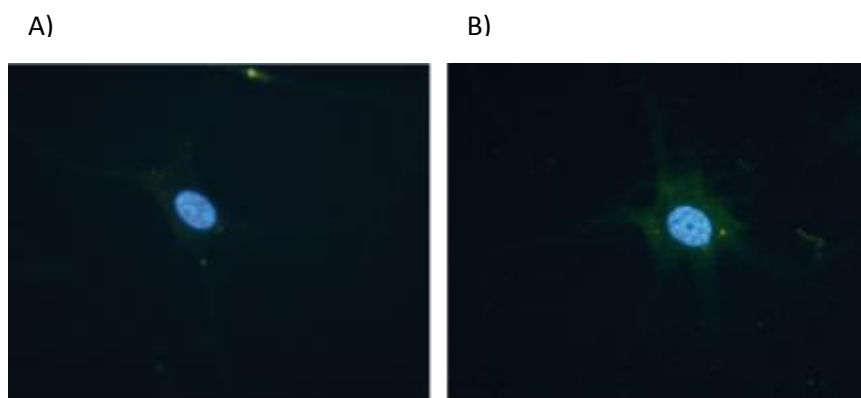


FIG11: Localización preferentemente intracelular del colágeno XIII en células AVIC control. La detección del colágeno XIII sobre la membrana plasmática se realizó como en la figura anterior en AVIC control sin permeabilizar (A) y permeabilizadas (B).

A continuación se realizaron experimentos comparativos entre células controles y estenóticas, atendiendo a la expresión basal de las células en reposo (FIG12). Como se puede observar, los resultados indican que la expresión basal de colágeno XIII en células estenóticas (FIG12A) es

superior a la de las control (FIG12B), lo que está de acuerdo con resultados de *Western blot* (datos del grupo no publicados).

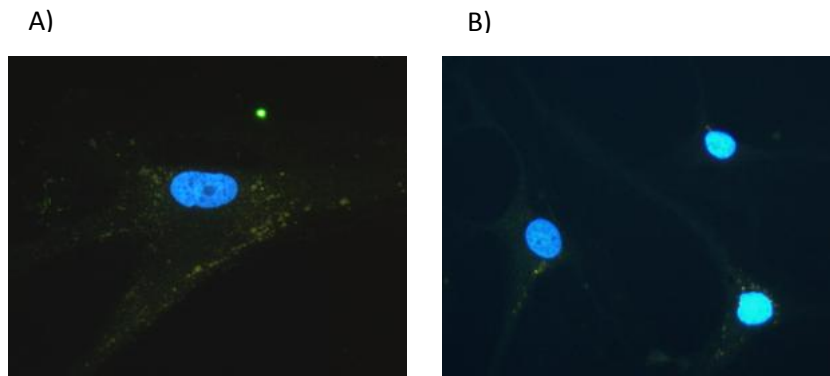


FIG12: Mayor expresión de colágeno XIII en la superficie en: A) AVIC estenóticas, y B) AVIC control en reposo. La tinción se realizó como en FIG11.

Posteriormente se comparó el efecto de la activación del ligando de TLR3, Poly I:C, tanto en células control como en las estenóticas. Apenas se distingue diferencias entre ambas, lo que se debe a que el incremento de señal en la activación en estas células es pequeño, y no se distingue a simple vista (FIG13), aunque como ya se comentó en el apartado de estudios sobre citometría de flujo sobre la expresión y localización subcelular del Colágeno XIII, este incremento es suficiente como para resultar estadísticamente significativo (FIG4 para AVIC control y FIG 6 para las estenóticas).

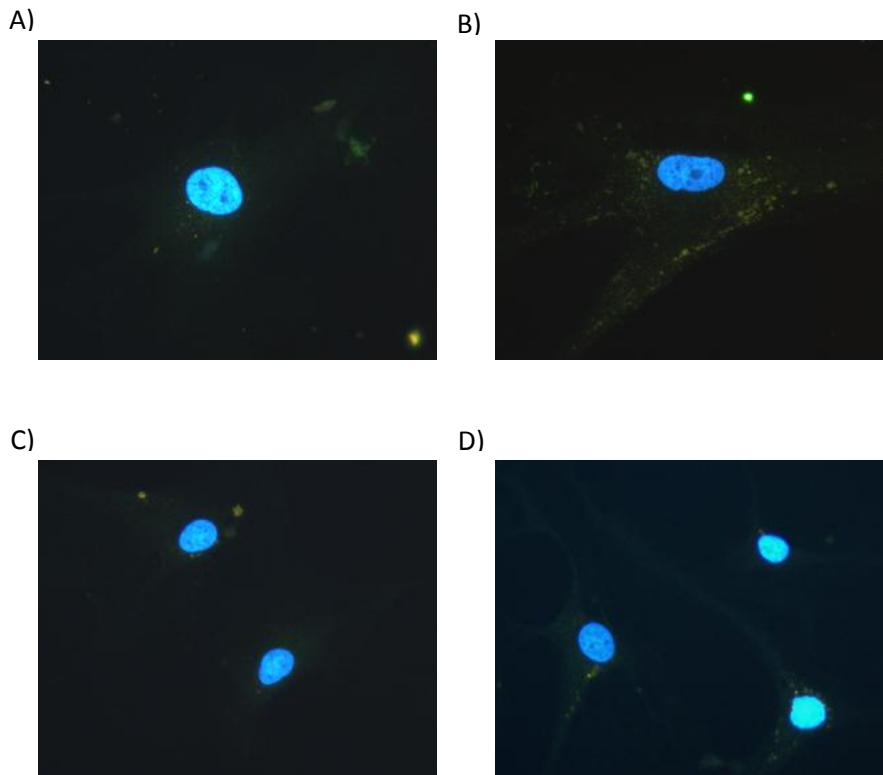


FIG13: Expresión diferencial de colágeno XIII en A) AVIC estenóticas activadas con Poly I:C, B) AVIC estenóticas en reposo, C) AVIC control activadas con Poly I:C, y D) AVIC control en reposo.



## DISCUSIÓN

Por estudios previos realizados en el laboratorio se había relacionado por primera vez al colágeno XIII con la estenosis aórtica calcificada, al estar más expresado en AVIC estenóticas que en control, y por ser inducido por ligandos de TLR como LPS. Lo que aporta el presente estudio es, por un lado, la confirmación por otras técnicas de la expresión de colágeno XIII y de su regulación por un ligando de TLR3, y por otro lado, la cuantificación de su expresión en la superficie e interior celular, y se ha obtenido información sobre su localización subcelular.

En el presente estudio se abordó en primer lugar el análisis de la expresión basal del colágeno XIII en AVIC control mediante citometría de flujo, lo que permite cuantificar la población de células que expresan la proteína. En primer lugar, se vio que en condiciones basales, la expresión de colágeno XIII sobre la superficie celular es pequeña, y que la mayor parte de esta proteína se encuentra localizada a nivel intracelular. Estudios previos de *Western blot* con lisados celulares (datos no publicados, proyecto fin de Máster de Esther Onecha, 2013) no permitían distinguir la localización del colágeno XIII, con lo que los nuevos datos confirman la expresión de colágeno XIII en AVIC y aportan una información adicional.

A continuación se analizó el efecto de la activación con el ligando de TLR3, Poly I:C, sobre los niveles de expresión del colágeno XIII, observándose un aumento de su expresión en superficie. Este resultado se ajusta a lo esperado, informando de que efectivamente durante la enfermedad se dispara la expresión de la proteína, ya que se ha visto que TLR3 activado induce la enfermedad [1], y confirma la inducción de colágeno XIII por TLRs observada en ensayos de *Western blot* (datos no publicados, trabajo de fin de Máster de Esther Onecha, 2013).

También se estudió la expresión en el interior celular empleando en el estudio células permeabilizadas. En este punto vemos que hay correspondencia entre lo observado en estudios sobre citometría de flujo y de detección por inmunofluorescencia, ya que en ambos casos observamos que el colágeno XIII se encuentra a mayor concentración en el interior celular, y que por tanto su detección es mucho mayor en las células permeabilizadas. Este resultado es interesante porque indica que solo una pequeña población está en la superficie, donde realiza su función, mientras la mayor parte del colágeno XIII permanece en compartimentos intracelulares. Una posibilidad es que se sintetice colágeno y quede retenido en el retículo endoplasmático / aparato de Golgi, donde continúe procesándose. De hecho en algunos experimentos de la puesta a punto de inmunofluorescencia se observa tinción localizada en la zona de Golgi (resultados no mostrados). Se necesitarían nuevos experimentos con marcadores del aparato de Golgi para comprobar dicha hipótesis.

Otro aspecto del estudio fue comparar los niveles de colágeno XIII por activación de TLRs en células permeabilizadas. En este caso se observó un aumento de colágeno XIII en las células estimuladas con Poly I:C, lo que indica que la expresión proteica está aumentando sobre la membrana, pero no a nivel intracelular, donde no encontramos diferencias entre activadas y controles.

Ante este hecho podemos plantearnos una serie de interpretaciones o hipótesis:

- 1- El anticuerpo utilizado, al no ser óptimo para las técnicas usadas en el estudio, puede no estar uniéndose con suficiente afinidad, de manera que se pierde señal a nivel extracelular y no detectamos toda su expresión cuando son activadas.
- 2- El exceso de expresión de colágeno XIII esté siendo modulado a nivel de membrana por el sistema de retroalimentación, como se ha sugerido en la literatura [24]. En ese caso, solo una pequeña cantidad de colágeno XIII se expresaría en la cara externa de la membrana extracelular, mientras el resto de la proteína quedaría en el interior celular, por ejemplo en el aparato de Golgi, a la espera de su procesamiento.
- 3- Puede ser que una parte del colágeno XIII haya sido escindido, y secretado al medio extracelular [24], y que eso imposibilite su detección a nivel de membrana [24]. No podemos descartar esta posibilidad, aunque hay que destacar que en los experimentos de *Western blot* anteriormente mencionados (datos no publicados), sí se observaba una alta expresión en lisados celulares tratados del mismo modo que en el presente estudio.

Para resolver estas preguntas habría que hacer nuevos experimentos, con mayor número de muestras, con diferentes anticuerpos, estudios a nivel de orgánulos, y de análisis del medio y de proteínas libres disueltas en él.

Otro objetivo buscado era la comparación y búsqueda de diferencias entre células AVIC aisladas de válvulas sin estenosis con AVIC de válvulas estenóticas. A la hora de comparar la expresión de colágeno XIII (a nivel basal y activadas con un ligando de TLR3) en células control con respecto a estenóticas, se observó una tendencia al aumento, aunque no se observen diferencias significativas. Sin embargo, en estudios previos de *Western blot* (no publicados) sí se había observado un claro aumento de colágeno XIII en AVIC estenóticas. La falta de correspondencia con dichos resultados puede ser debida al escaso número de experimentos de AVIC estenóticas (n=4) con respecto a las controles (n=9), y a la dispersión de los datos y variabilidad individual. En ambos tipos celulares la activación del receptor TLR3 por poly I:C provoca un aumento significativo de Colágeno XIII y hemos visto que esa expresión aumenta tanto a nivel intracelular como a nivel de superficie. Sin embargo las diferencias encontradas entre células control y células estenóticas activadas por Poly I:C no se ha visto que fueran significativamente diferentes, lo cual también puede explicarse por el bajo tamaño muestral, y su dispersión y variabilidad individual.

Con todo esto, llegamos a la conclusión de que habría que realizar nuevos experimentos, aumentando el número muestral, y procurando mejorar las condiciones de detección optimizando la unión del anticuerpo con la proteína.

## CONCLUSIONES

1. En condiciones basales, el colágeno XIII se expresa sobre la superficie celular de células AVIC, aunque la mayor parte de esta proteína se encuentra localizada a nivel intracelular.
2. En AVIC control, la activación del receptor TLR3 con Poly I:C aumenta de modo significativo la expresión de colágeno XIII en la cara externa de la membrana extracelular, pero no su expresión a nivel intracelular.
3. En AVIC estenóticas el colágeno XIII se expresa sobre la superficie celular, aunque la mayor parte de esta proteína se encuentra localizada a nivel intracelular, y su expresión se induce por la activación de TLR3.
4. En cuanto a la comparación entre AVIC estenóticas y controles, en condiciones basales se observa un aumento de la expresión de colágeno XIII, aunque el efecto no es estadísticamente significativo, en células estenóticas con respecto a los controles.

## REFERENCIAS

1. Yetkin E and Waltenberger J. *Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis*. International Journal of Cardiology 2009,135: 4-13
2. Freeman RV and Otto CM. *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. Circulation. 2005; 111: 3316-26.
3. O'Brien KD. *Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 1721-1728.
4. Miller JD, Weiss RM and Heistad DD. *Calcific aortic valve stenosis: methods, models and mechanisms*. Circ Res. 2011; 108: 1392-1412.
5. Helske S et al. *Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process*. Curr Opin Lipidol. 2007; 18: 483-491.
6. Li C, Xu S and Gotlieb AI. *The response to valve injury. A Paradigm to understand the the pathogenesis of heart valve disease*. Cardiovascular Pathology 2011 May-Jun; 20(3): 183-90.
7. Butcher JT, Mahler GJ and Hockaday LA. *Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions*. Advanced Drug Delivery Review. 2011; 63: 242-68.
8. Redberg RF, Dhruva SS. *Transcatheter aortic-valve replacement*. N Engl J Med. 2011 Sep8; 365(19): 958-9
9. Bourantas CV et al. *Future perspectives in transcatheter aortic valve implantation*. Int J Cardiol. 2013 Sep 20; 168(1): 11-8.
10. Otto CM et al. *Characterization of the Early Lesion of 'degenerative' Valvular Aortic Stenosis. Histological and immunohistochemical Studies*. American Heart Association, 1994. Circulation Vol 90, No2; 844-853.
11. Merryman WD. *Mechano-potential etiologies of aortic valve disease*. J. Biomech. 2010; 43 (1): 87-92.
12. Walker GA et al. *Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor- $\beta$ : implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease*. Circ Res. 2004; 95: 253-260
13. Takeuchi O and Akira S. *Pattern Recognition Receptors and inflammation*. Cell 2010; 140: 805-820
14. Weiss RM, Miller JD, Heistad DD. *Fibrocalcific aortic valve disease: opportunity to understand disease mechanisms using mouse models*. Circ Res 2013 Jul 5; 113 (2): 209-22.
15. Soini Y et al. *Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis*. Hum Pathol. 2003; 34 (8): 756-63.
16. Mann DL. *The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls*. Circ Res. 2011; 108: 1133-45

17. Towler DA. *Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease*. Circ Res .2013 Jul 5; 113(2): 198-208.
18. Yu Z et al. *Tumor necrosis factor- $\alpha$  accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway*. J Pharmacol Exp Ther. 2011 Apr; 337(1): 16-23
19. Lopez J et al. *Viral and bacterial patterns induce TLR-mediated sustained inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells*. Int J Cardiol. 2010; 158: 18-25
20. Kawai T and Akira S. *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat immunology. 2010; 11 (5):373-84
21. Curtiss LK and Tobias PS. *Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis*. The Journal of Lipid Research. 2009; 50 (Suppl): S340-S345
22. Meng X et al. *Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis*. Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 294:C29-C35
23. Yang X et al. *Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhancer expression of bone morphogenetic protein 2*. J Am Coll Cardiol. 2009; 53(6): 491-500
24. Heikkinen A et al. *Collagen XIII: a type II transmembrane protein with relevance to musculoskeletal tissues, microvessels and inflammation*. Int J Biochemistry and cell biology. 2012; 44: 714-717
25. Kaden JJ *Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis*. Cardiovascular Pathology. 2005; 14(2): 80-87